

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. — *Utilisation du rotor zonal pour montrer que la myéline humaine est formée d'un continuum de particules de densités différentes.* Note (*) de **Jean-Marie Bourre, Odile Daudu et Nicole Baumann**, présentée par M. Raymond Turpin.

La myéline, isolée à partir de cerveau humain congelé, est formée d'un continuum de particules de densité différente. Ceci a été montré en utilisant un gradient continu de saccharose (0,4-0,85 M) dans un rotor zonal. Les résultats ont été déterminés par mesure de la densité optique de 60 fractions à 280 et 260 m μ , par quantification des protéines par la méthode de Lowry, et calcul de la concentration exacte en saccharose par polarimétrie. Le maximum du profil de densité se trouve dans la région 20-23 % de saccharose (21,5 % exactement, soit 0,63 M saccharose). Après dialyse de 62 h (pour éliminer le sucre) et centrifugation, la pesée et le dosage des protéines montrent que la concentration en protéines augmente depuis les fractions légères vers les lourdes.

Human myelin isolated from frozen brain, consists of a continuum of particles as shown by sucrose continuous gradient (between 0,4 and 0,85 M) on zonal rotor. This was determined by measuring the O. D. at 260 and 280 m μ , the protein concentration by Lowry method and sucrose concentration by polarimetry in 60 fractions. Most of the material is concentrated between 20-23% sucrose, the maximum being found at 21,5% (0,63 M). The fractions are dialyzed for 62 hrs. to remove the sucrose and the pellet obtained after centrifugation shows that the protein concentration increases from the lighter fraction to the heavier.

La myéline animale, principalement de Rat, de Souris ou de Bœuf, a été divisée par gradient discontinu de saccharose en un nombre variable de sous-fractions allant de 2 ⁽¹⁾ à 4 [(¹)-(³)] ou beaucoup plus ⁽⁴⁾. L'utilisation de gradient continu a été proposée ⁽⁵⁾ suggérant donc la possibilité d'utilisation du rotor zonal ⁽⁶⁾. L'isolement de sous-fractions myéliniques présente un intérêt considérable car le profil de densité obtenu est anormal dans certaines dysmyélinisations héréditaires, par exemple le mutant neurologique Quaking chez la Souris ⁽⁴⁾. Le but de ce travail est de montrer que la myéline humaine est ainsi formée d'un continuum de particules de densités différentes et de contenu protéique distinct; pour ce faire, une nouvelle technique est proposée, basée sur l'utilisation du rotor zonal.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Le sujet est décédé à 61 ans, indemne de toute complication neurologique. Le cerveau a été congelé à - 80°C aussitôt après son prélèvement et conservé ainsi 4 mois. Un fragment de 8 g a été ramené à - 30°C; puis à 4°C dans le tampon saccharose 0,32 M. La myéline a été préparée de manière classique ⁽⁷⁾. Cette technique permet l'obtention de la myéline pure sur le tissu frais, la vérification en étant faite par la microscopie électronique ⁽⁸⁾ et les enzymes marqueurs [⁽⁸⁾, ⁽⁹⁾]. Elle a été aussi utilisée sur du tissu congelé [⁽¹⁰⁾, ⁽¹¹⁾]. Le rotor zonal « Ti 14 » monté sur centrifugeuse « Beckman L 2-50 » est constitué de 40 ml d'eau distillée, 50 ml de myéline homogénéisée dans le saccharose 0,32 M, 20 ml de saccharose 0,4 M et 500 ml d'un gradient continu 0,4-0,85 M, 40 ml de sucre 2 M. La charge se fait à 4 000 tr/mn à l'aide d'une pompe à gradient dont le profil de la came a été calculé et dessiné pour ce type de remplissage. Après une centrifugation de 30 mn à 20 000 tr/mn le rotor est déchargé par addition de saccharose 2 M; 60 fractions de 10 ml sont ainsi collectées. La densité optique de chacune est déterminée après dilution à 260 et 280 m μ et sa concentration de saccharose mesurée au polarimètre. Les fractions sont regroupées par 4, la quantité de protéines est déterminée par la méthode de Lowry ⁽¹²⁾; une dialyse contre de l'eau courante pendant 72 h élimine toute trace de sucre (ceci a été vérifié en utilisant le polarimètre ou du saccharose radioactif). Les fractions sont centrifugées 15 mn à 17 500 $\times$ g, les culots obtenus sont lyophilisés et pesés. La pureté de la myéline déposée sur le gradient a été vérifiée par microscopie électronique.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — La figure 1 montre la densité optique de chacune des fractions à 260 et 280 m μ . La plus grande absorption (donc la quantité maximale de matériel) est trouvée à 21,5 % de saccharose (soit 0,63 M) valeur proche de celle proposée pour la Souris (0,64 M) (⁶). L'utilisation de gradient discontinu chez la Souris met en évidence un maximum

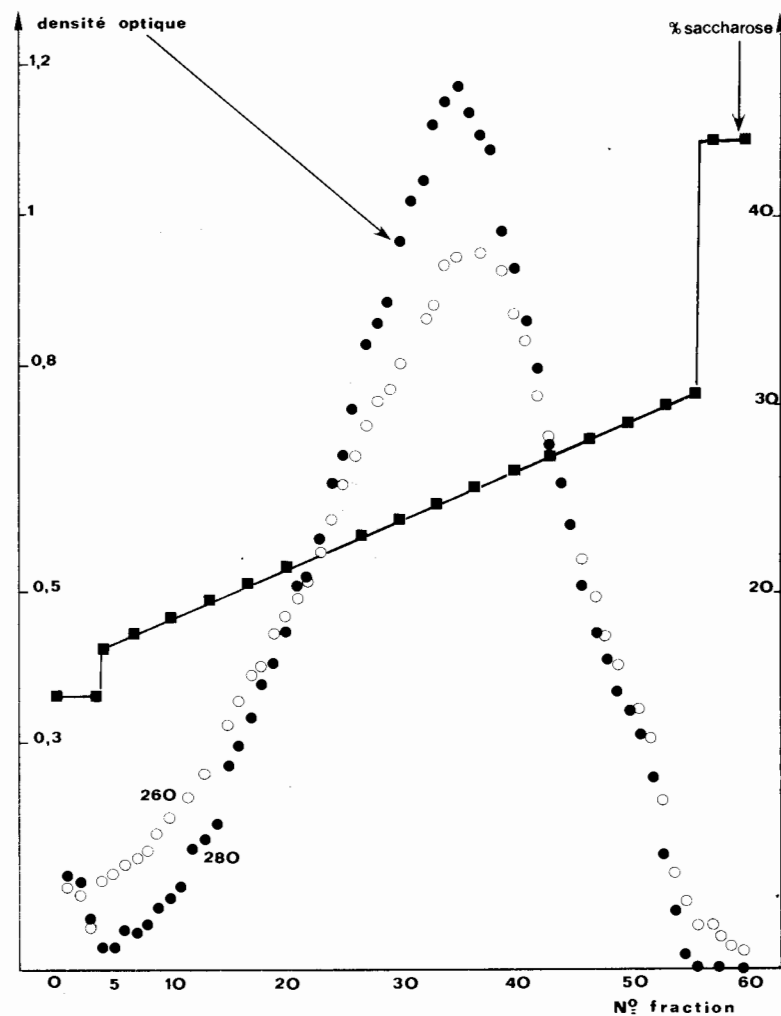


Fig. 1. — Profil de densité de la myéline humaine. 60 fractions ont été collectées au sortir du rotor zonal; sur chacune les densités optiques à 260 m μ (○) et 280 m μ (●) ont été déterminées; la concentration en sucre a été mesurée au polarimètre (■).

à 0,66 M (⁴). Comparée au gradient discontinu, il faut noter que la technique ici présentée est beaucoup plus rapide (quelques heures au lieu de plusieurs jours), plus fiable et plus sensible; elle permet enfin de traiter de plus importantes quantités de matériel. Les 3 premières fractions représentent très vraisemblablement la contamination de la myéline par des microsomes, qui restent en suspension dans le 0,32 M pendant la centrifugation. Les profils de densité optique à 260 et 280 m μ ne sont pas exactement superposables: ceci reflète vraisemblablement une différence de composition en protéines. La figure 2 montre le poids de chaque

sous fraction et sa concentration en protéines. Les variations sont analogues à celles que nous avons observées sur le cerveau frais de Souris ⁽⁴⁾. 75 % environ du poids total de la myéline se retrouve dans 5 fractions seulement. Si l'on isole la myéline à partir du cerveau frais, la même courbe est obtenue pour les fractions 4 à 60 (seule la contamination microsomale des fractions 1 à 3 disparaît).

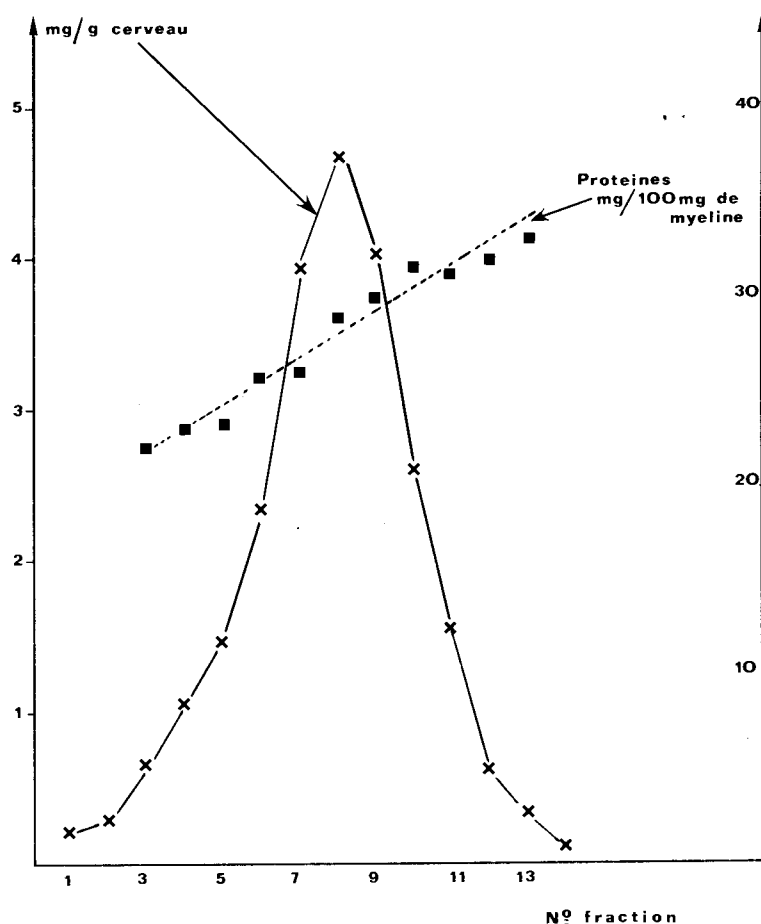


Fig. 2. — Détermination du poids et de la concentration en protéines de 14 sous-fractions de myéline. x, poids des sous-fractions; ■, concentration en protéines (mg/100 mg de myéline lyophilisée). Les 14 fractions sont obtenues en groupant 4 par 4 les sous-fractions décrites dans la figure 1.

L'utilisation du rotor zonal permet donc de montrer que la myéline humaine, préparée à partir de cerveau congelé, est formée d'un continuum de particules de densités différentes. Ces résultats devront être comparés avec ceux obtenus chez diverses leucodystrophies.

(*) Séance du 19 décembre 1977.

⁽¹⁾ L. A. AUTILLO, W. T. NORTON et R. N. TERRY, *J. Neurochem.*, 11, 1964, p. 17-27.

⁽²⁾ J. M. MATTHIEU, R. H. QUARLES, R. O. BRADY et H. DE WEBSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 329, 1973, p. 305-317.

⁽³⁾ J. BENJAMINS, K. MILLER et G. M. MCKHANN, *J. Neurochem.*, 20, 1973, p. 1585-1603.

⁽⁴⁾ J. M. BOURRE, S. POLLET, O. DAUDU, F. LESAUX et N. BAUMANN, *Biochimie*, 10, 1977, p. 819-824.

- (⁵) D. M. ADAMS et M. E. FOX, *Brain Res.*, 14, 1969, p. 647-661.
- (⁶) T. WAEHNELDT, communication personnelle.
- (⁷) W. T. NORTON et S. E. PODUSLO, *J. Neurochem.*, 21, 1973, p. 749-757.
- (⁸) N. BAUMANN, J. M. BOURRE, C. JACQUE et M. L. HARPIN, *J. Neurochem.*, 20, 1973, p. 753-759.
- (⁹) J. M. BOURRE, C. CASSAGNE, S. G. LARROUQUERE-REGNER et D. DARRIET, *J. Neurochem.*, 29, 1977, p. 645-648.
- (¹⁰) J. O'BRIEN et E. SAMPSON, *J. Lipid Res.*, 6, 1965, p. 537-544.
- (¹¹) J. L. EVERLY, R. QUARLES et R. O. BRADY, *J. Neurochem.*, 28, 1977, p. 95-101.
- (¹²) O. H. LOWRY, N. S. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265-275.

Laboratoire de Neurochimie, I.N.S.E.R.M. U. 134,
Hôpital de la Salpêtrière, 75634 Paris Cedex 13.