

BIOCHIMIE. — *Evolution des galactolipides et de leurs acides gras dans les microsomes de cerveau de Souris au cours de la maturation cérébrale.* Note (\*) de MM. Jean-Marie Bourre, Serge Pollet, M<sup>lles</sup> Odile Daudu et Nicole Baumann, présentée par M. Jacques Tréfouël.

Dans les microsomes de cerveau de Souris on voit apparaître transitoirement au moment de la myélinisation les galactolipides caractéristiques de la myéline, avec leurs acides gras à très longue chaîne. Les microsomes jouent donc un rôle primordial dans la biosynthèse des constituants des lipides myéliniques.

Cholestérol et phospholipides se retrouvent dans la plupart des constituants cellulaires ; les sphingolipides, notamment ceux formés d'acides gras à longue chaîne (galactolipides et sphingomyélines), sont pour la plus grande partie d'entre eux situés dans la myéline [(1), (2)]. Ils jouent un rôle important dans la stabilité de cette membrane particulière (3). Ceci est lié à la présence d'acides gras à 24 atomes de carbone, qui permettent la formation de complexes dus à l'enchevêtrement des chaînes (4). Les microsomes de cerveau ne contiennent que très peu de galactolipides ; si l'on suppose que cette fraction subcellulaire est le lieu de synthèse des lipides complexes, on doit voir apparaître en leur sein des galactolipides, transitoirement et au moment de la myélinisation. Ils se retrouveront ultérieurement dans la myéline.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les microsomes de cerveau de Souris de différents âges sont préparés selon la méthode habituelle (5), le tampon étant seulement remplacé par un milieu saccharose (0,32 M) NaCl (0,9 ‰). Le culot de microsomes obtenu est repris dans un minimum d'eau distillée et stocké. La quantité de microsomes désirée étant obtenue, les suspensions sont lyophilisées. La pureté des microsomes est vérifiée par microscopie électronique et par des études enzymatiques [glucose-6-P-déhydrogénase (6), malate déhydrogénase (7)]. Dans les préparations il n'y a pas de débris cellulaires, de fragments myéliniques, de synaptosomes, de mitochondries entières ou fragmentées, de particules issues de la fraction soluble.

Les lipides sont extraits par le chloroforme-méthanol 2/1 [(8) modifié (9)] ; un lavage de Folch (10) élimine les gangliosides et surtout la totalité du saccharose issu du milieu de préparation. Cette élimination totale, indispensable pour doser précisément les galactolipides par la méthode à l'orcinoïl (11), est faite en ajoutant aux microsomes lyophilisés du saccharose radioactif. Il ne reste plus alors qu'à vérifier l'absence de toute activité dans les lipides extraits puis lavés. A côté des galactolipides sont dosés le phosphore lipidique (12) et le cholestérol (13). Les esters méthyliques d'acides gras, obtenus par méthanolyse de l'extrait lipidique (14) sont analysés par chromatographie gazeuse sur colonne de SE 52, les pics sont étudiés par découpage et pesés. Il est possible de séparer les esters méthyliques d'acides gras  $\alpha$ -hydroxylés des autres esters sur plaque de gel de silice, le solvant étant éther de pétrole-éther (80-20) (15).

RÉSULTATS. — Rapportés aux mêmes quantités de lipides (100 mg d'extrait lipidique après lavage de Folch qui élimine les gangliosides) il faut noter dans les

TABLEAU I

*Variations des lipides dans les microsomes cérébraux en fonction de l'âge*

Age	6	12	15	18	21	30	Adulte
Poids des souris (g) .....	1,5-4	5,5-7,5	6,5-8,5	6-9,5	7,5-10	8,5-13,5	15-24
Poids moyen du cerveau (mg) ....	193	332	357	368	375	386	401
Poids de microsomes lyophilisés (mg/souris) .....	1,40	1,95	2,85	2,62	2,68	2,76	2,45
Poids des lipides microsomaux après Folch ( $\mu$ g/souris) .....	93	163	192	268	256	329	349
Galactolipides (mg/100 mg de lipides) .....	1,5	2,5	3,1	4,5	3,9	3	2,8
Phospholipides (mg/100 mg de lipides) .....	65	62	62	69	69	67	69
Cholestérol (mg/100 mg de lipides).	23	18	18	17,7	14,5	11,6	16,4

microsomes une relative stabilité des phospholipides avec l'âge, accompagnée d'une légère décroissance du cholestérol. Par contre les galactolipides augmentent jusqu'à 18 jours pour décroître ensuite. Or c'est à cette période que la myélinisation est la plus active. Les valeurs données sont des moyennes calculées à partir de plusieurs dosages sur différentes préparations (au moins 3). Pour un âge donné l'écart est de 30 % sur cette valeur car le dosage du galactose est relativement peu précis et il est délicat d'éliminer les variations dues au poids (<sup>16</sup>).

TABLEAU II

*Acides gras totaux des microsomes en fonction de l'âge (‰)*  
(saturés + insaturés +  $\alpha$ -hydroxylés)

Age	4	6	12	14	15	18	21	30	Adulte
C <sub>14</sub> .....	48	33	14	10	7	6,5	6	2,5	1,5
EC <sub>16</sub> .....	315	316	288	270	262	255	258	250	260
EC <sub>18</sub> + C <sub>16</sub> $\alpha$ OH .....	315	316	325	345	348	360	365	350	348
EC <sub>20</sub> + C <sub>18</sub> $\alpha$ OH .....	106	115	145	150	160	165	150	144	135
EC <sub>22</sub> + C <sub>20</sub> $\alpha$ OH .....	145	155	158	151	158	157	160	172	181
EC <sub>24</sub> + C <sub>22</sub> $\alpha$ OH .....	5,5	6	8	14	15	14	9	10	10

Dans le calcul de pourcentage, il n'est pas tenu compte de la détection plus faible des acides gras  $\alpha$ -hydroxylés.

Sur le deuxième tableau on voit que l'ensemble des acides gras à 16 ou à 18 atomes de carbone (C<sub>16</sub> ou C<sub>18</sub>) varie en sens inverse jusqu'à 21 jours, l'un décroissant pendant que l'autre croît, tandis que le C<sub>14</sub> diminue rapidement en fonction de l'âge pour atteindre à 30 jours 5 % de sa valeur de 4 jours. Les C<sub>20</sub> semblent passer par un maximum à 18 jours alors que les C<sub>22</sub> croissent très légèrement au cours de la maturation cérébrale. Les C<sub>24</sub> ont un profil d'évolution tout à fait particulier : leur courbe de croissance régulière est interrompue entre 12 et 21 jours et présente un maximum vers le 15<sup>e</sup> jour. Celui-ci est contemporain de l'acmé transitoire en galactolipides dans les microsomes.

Si les acides gras  $\alpha$ -hydroxylés sont éliminés (tableau III) les évolutions sont un peu différentes, montrant l'importance de ces acides dans les microsomes. Toutefois, à côté des  $C_{18}$  qui présentent un léger maximum et des  $C_{16}$  qui décroissent, le pic transitoire des  $C_{24}$  est bien mis en évidence. Les  $C_{20}$  et les  $C_{22}$  croissent tous deux jusque vers le 21<sup>e</sup> jour, puis le premier décroît très légèrement pendant que le second se stabilise.

TABLEAU III

*Acides gras microsomaux en fonction de l'âge (°/100) (saturés + insaturés)*

Age	6	12	15	18	21	30	Adulté
$C_{14}$ .....	31	18	15	7	6	2,3	2
$\Sigma C_{16}$ .....	460	440	415	360	320	330	331
$\Sigma C_{18}$ .....	435	450	460	480	450	450	460
$\Sigma C_{20}$ .....	44	63	60	80	120	110	100
$\Sigma C_{22}$ .....	25	25	32	60	100	100	100
$\Sigma C_{24}$ .....	3	5	16	17	9	6,5	6

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Les galactolipides, présents en majeure partie dans la myéline [(<sup>1</sup>), (<sup>3</sup>)], se trouvent aussi dans les microsomes en faible quantité, à côté des phospholipides et du cholestérol qui sont retrouvés dans la plupart des membranes. Seulement pour ces galactolipides il est possible de noter une accumulation passagère, contemporaine de la myélinisation ; les galactolipides microsomaux accumulés seront retrouvés au niveau de la myéline [comme tendent à le prouver des injections de sulfate radioactif dans le cerveau de rat (<sup>17</sup>)]. Le temps de myélinisation révolu, les microsomes recouvrent leur quantité normale de galactolipides.

L'analyse des  $C_{24}$  montre un profil d'évolution analogue à celui des galactolipides, avec un maximum au 15<sup>e</sup> jour. Or les acides gras à très longue chaîne se retrouvent préférentiellement au niveau des sphingolipides (<sup>18</sup>), qui eux-mêmes sont constituants privilégiés de la myéline. Il a été suggéré que les lipides de la fraction microsomale, qui peut contenir la membrane plasmique de cellules gliales, sont utilisés dans la formation de la myéline (<sup>19</sup>). Cette étude montre que les microsomes sont le lieu de synthèse de la membrane myélinique, selon deux processus qui restent à être différenciés. Le premier supposerait que les microsomes contiendraient la membrane plasmique de l'oligodendrocyte s'enroulant autour de l'axone : des données morphologiques ont montré (<sup>20</sup>) que la myéline dérive de cette membrane qui peut sédimenter avec les microsomes. Le second propose la formation, dans les microsomes, soit de protomembranes qui seront ultérieurement fixées sur leurs sites myéliniques [des structures lamellaires non liées à la myéline ont été découvertes dans la cellule de Schwann du système périphérique (<sup>21</sup>)], soit plus simplement des protéolipides complexes transportant depuis les microsomes jusqu'à la myéline certains lipides (<sup>22</sup>). Toujours est-il que tout ou partie des lipides qui seront les

constituants de la myéline sont déjà formés d'acides gras à très longue chaîne au niveau des microsomes.

- (\*) Séance du 13 mars 1972.
- (1) M. PILZ et E. MEHL, *Hoppe Seyler's Z. für physiol. Chem.*, 346, 1966, p. 306-309.
  - (2) W. T. NORTON et L. A. AUTILLO, *J. Neurochem.*, 13, 1966, p. 213-222.
  - (3) J. S. O'BRIEN et E. L. SAMPSON, *Life Sc.*, 8, 1965, p. 1056.
  - (4) VAN DEN HEUVEL, *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, 40, 1963, p. 455.
  - (5) J.-M. BOURRE, S. A. POLLET, G. DUBOIS et N. A. BAUMANN, *Comptes rendus*, 271, Série D, 1970, p. 1221-1223.
  - (6) A. KORNBURG et B. L. HORECKER, *Methods in Enzymology*, 1, p. 323-324.
  - (7) S. ENGLARD et L. SIEGEL, *Methods in Enzymology*, 13, p. 99-100.
  - (8) J. FOLCH, I. ASCOLI, M. LEES, J. A. MEATH et F. N. LEBARON, *J. Biol. Chem.*, 191, 1951, p. 833-841.
  - (9) K. SUZUKI, *J. Neuropath. and Exper. Neurol.*, 26, 1967, p. 537.
  - (10) J. FOLCH, I. ASCOLI, M. LEES et G. M. SLOANE-STANLEY, *J. Biol. Chem.*, 226, 1957, p. 497.
  - (11) N. S. RADIN, F. B. LAVIN et J. R. BROWN, *J. Biol. Chem.*, 217, 1955, p. 789-796.
  - (12) G. R. BARTLETT, *J. Biol. Chem.*, 234, 1959, p. 466.
  - (13) R. L. SEARLY et BERQUIST, *Clin. Chem. Acta*, 5, 1960, p. 192-199.
  - (14) W. R. MORRISON et L. M. SMITH, *J. Lipid Res.*, 5, 1964, p. 600.
  - (15) H. L. MANGOLD, *Chem. and Ind.*, Londres, 1961, p. 1032.
  - (16) C. JACQUE, J. M. BOURRE, P. MORENO et N. BAUMANN, *Biochimie*, 53, 1971, p. 1121-1124.
  - (17) A. N. DAVISON et A. N. GREGSON, *Biochem. J.*, 98, 1966, p. 915-922.
  - (18) O'BRIEN, *Science*, 147, 1965, p. 1099-1107.
  - (19) A. N. DAVISON, M. L. CUZNER, N. L. BANIK et J. OXBERRY, *Nature*, 212, 1966, p. 1373-1374.
  - (20) M. B. BUNGE, R. P. BUNGE et M. HIS, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 10, 1961, p. 67.
  - (21) Cité par L. C. MOKRASCH, R. S. BEAR et F. O. SCHMITT, *Neuroscience Research Program Bulletin*, 4, 1971, p. 472-474.
  - (22) N. HERSCKOWITZ, G. M. MAC KHANN, S. SAXENA, E. M. SHOOTER et R. HERDON, *J. Neurochem.*, 16, 1969, p. 1049.

*Laboratoire de Neurochimie,  
INSERM, Clinique des Maladies du Système Nerveux,  
CHU, Pitié-Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75-Paris, 13<sup>e</sup>,*