

## Composition en acides gras des lipides totaux et des cérébrosides cérébraux chez les souris normales et Quaking, en fonction de l'âge.

C. JACQUE, J. M. BOURRE, P. MORENO et N. BAUMANN.  
*Laboratoire de Neurochimie, Hôpital de la Salpêtrière,  
Boulevard de l'Hôpital, Paris 13<sup>e</sup>.*  
(21-7-1971).

*Summary.* — The presence of fatty acids with 24 carbon atoms is revealed in the mouse when myelination occurs. At birth, these constituents do not exist in notable quantities. The cerebrosides containing them are detected later than medium chain cerebrosides. This group of galactolipids does not appear in the Quaking mouse which is a myelin deprived mutant. Long chain fatty acids would thus be necessary to a normal myelination process.

Nous avons montré que chez les souris Quaking [1, 2, 3], le déficit en myéline se traduit par une diminution quantitative des lipides et protéolipides cérébraux de type myélinique, et par une diminution considérable d'un type de galactolipides : ceux qui contiennent des acides gras à longue chaîne saturés et insaturés non hydroxylés. Ceux-ci sont des constituants de la myéline normale [4]. On est dès lors en droit d'établir une corrélation entre la paucité de la myéline et l'absence de ces composés, d'autant que, de tous les constituants lipidiques de la myéline, ce sont les seuls qui lui soient spécifiques ; de plus la myéline est la seule membrane à contenir des acides gras à longue chaîne en grande quantité [4] (dix fois plus que les autres membranes) et l'on pense que ceux-ci joueraient un grand rôle dans la stabilité de cette membrane [5].

La myéline en voie de formation est comparable à la myéline Quaking [13] : les cérébrosides sont présents mais contiennent moins d'acides gras à longue chaîne que chez l'adulte, d'où l'hypothèse qu'au cours de la maturation du système nerveux, les cérébrosides à chaîne moyenne apparaissent avant ceux à longue chaîne.

Nous avons de ce fait étudié la composition en acides gras des lipides cérébraux afin de détecter le moment d'apparition des acides gras à longue chaîne ; nous avons effectué la comparaison entre souris apparemment normales et Quaking et étudié la composition en acides gras des cérébrosides chez la souris normale au cours de la maturation cérébrale.

### MATÉRIEL.

*Souris.* Nous avons utilisé pour cette étude des souris C57 Quaking que nous avons comparées à

des souris C57 homozygotes et hétérozygotes apparemment normales, de notre élevage ; elles étaient identiques à celles utilisées comme témoins lors des études précédentes [1, 2, 3, 6, 11, 12].

Le 1<sup>er</sup> jour après la naissance, il n'était pas possible de détecter le caractère Quaking, donc d'éliminer ces souris du lot des témoins, mais la quantité importante de souris utilisée à cet âge rendait cette « contamination » négligeable. Hémisphères cérébraux, cervelet tronc cérébral, étaient systématiquement prélevés chez des animaux sacrifiés par élévation. La dissection était facilitée par le fait de plonger quelques instants la tête de l'animal dans l'azote liquide.

*Extraction des lipides.* Les lipides étaient extraits selon FOLCH [7] deux fois deux heures à + 3°C après homogénéisation en présence de 20 ml par gramme de chloroforme - méthanol 2:1.

Les lipides totaux étaient débarrassés du cholestérol avant méthylation des acides gras. Ces techniques ont été préalablement décrites [2].

*Purification des cérébrosides.* Les cérébrosides ont été purifiés par chromatographie sur colonne après élimination des phospholipides par méthanolyse sélective selon la technique d'HAJRA et RADIN [8] modifiée [3]. Pour 40 à 100 mg de lipides, on a utilisé des colonnes de 11 mm de diamètre interne contenant 4 g d'acide silicique (Unisil 100-200 mesh). L'élution des esters méthyliques d'acides gras et du cholestérol s'est effectuée par 75 ml de chloroforme, celle des cérébrosides par 125 ml d'un mélange de chloroforme-méthanol 95:5.

*Méthylation des acides gras.* La technique utilisée a été celle de MORRISON et SMITH [9].

Nous avons utilisé pour les cérébrosides celle qui a été décrite pour la sphingomyéline.

Nous avons séparé les esters méthyliques d'acides gras  $\alpha$ -hydroxylés et non hydroxylés par chromatographie sur couche mince selon une technique précédemment décrite [2].

**Chromatographie gazeuse.** Nous avons utilisé essentiellement des colonnes apolaires à 10 p. cent de SE 52 sur Aeropak 100/120 avec l'appareil Aerograph HyFi 600 comportant une programmation de température de 180-300° à raison de 2°/minute.

Les résultats, lorsqu'ils sont exprimés en mg/g de cerveau, ont pu être précisés du fait de l'adjonction d'un étalon interne avant méthylation (0,755 mg de tricosanoate de méthyle pour 10 mg de lipides).

### RÉSULTATS.

— *Composition en acides gras des lipides cérébraux en fonction de l'âge.*

Tous les acides gras cérébraux (fig. 1) augmentent progressivement en fonction de l'âge chez les souris témoins. Il faut noter que l'acide palmitique ( $C_{16}:0$ ) a une concentration maximum à 15 jours et décroît progressivement. L'acide stéarique augmente jusqu'au 25° jour puis décroît, alors que l'acide oléique ( $C_{18}:1$ ) et les acides gras

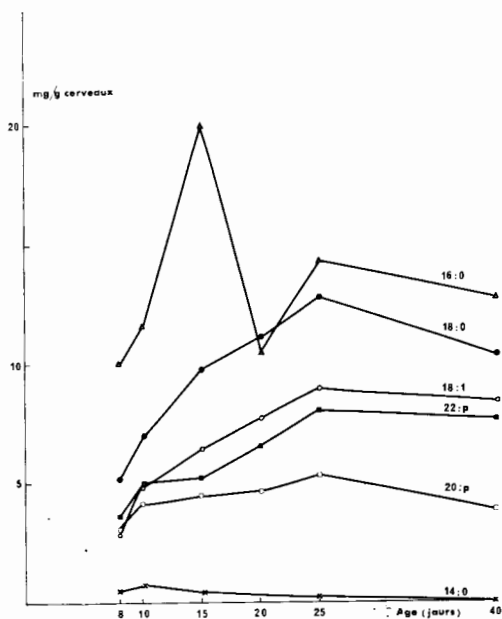


FIG. 1. — Evolution en fonction de l'âge du contenu en acides gras non hydroxylés des lipides totaux : souris témoins.

polyinsaturés à 20 ( $C_{20}:p$ ) et 22 atomes de carbone augmentent pour se stabiliser vers le 25° jour.

Chez les souris Quaking (fig. 2) il est intéressant de constater que la plupart des acides gras évoluent parallèlement avec une concentration maximum au 15° jour. L'augmentation des acides gras à la période de myélinisation s'arrête prématurément au 15° jour. Quant aux acides gras à 24 atomes de carbone, ils apparaissent avec retard puisqu'ils sont détectables le 8° jour chez la souris témoin et seulement le 15° jour chez la « Quaking » ; ils ne subissent pas une augmentation brutale du 15° au 20° jour à l'acmé de la myélinisation (fig. 3).

En conclusion, les acides gras à longue chaîne sont caractéristiques de la période de myélinisation. Ils apparaissent avec retard par rapport aux acides gras à 18 atomes de carbone. Leur absence, chez la souris Quaking, souligne un blocage à une période de la maturation myélinique dont les stigmates biologiques se situeraient avant le 8° jour après la naissance. L'étude de cérébrosides isolés semble confirmer ce fait.

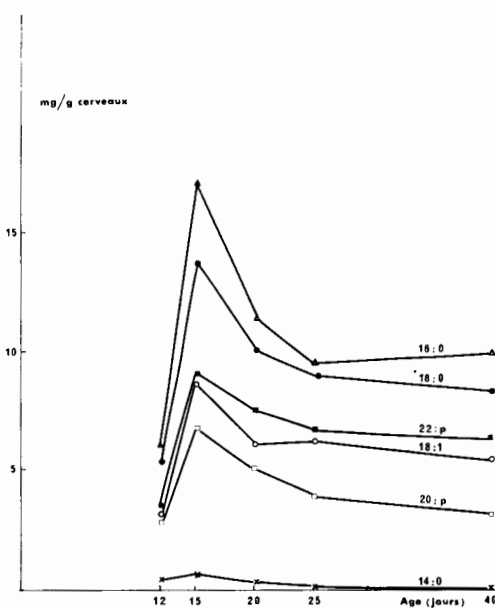


FIG. 2. — Evolution en fonction de l'âge du contenu en acides gras non hydroxylés des lipides totaux : souris Quaking.

— *Variations en fonction de l'âge de la composition en acides gras non  $\alpha$  hydroxylés des cérébrosides cérébraux.*

Du 1<sup>er</sup> jour après la naissance jusqu'au 20° jour, le contenu en acides gras à chaîne moyenne des cérébrosides décroît progressivement (fig. 4). Les

modifications sont particulièrement considérables du 1<sup>er</sup> au 12<sup>e</sup> jour. Au contraire, les acides gras à longue chaîne qui représentent 80 p. cent des acides gras à 20 jours ne représentent que 12 p.

chez la souris Quaking, puisqu'on peut à peine les détecter chez l'adulte [3].

## DISCUSSION.

Il ne faut pas méconnaître que les études en fonction de l'âge sont extrêmement difficiles chez les mammifères et qu'il est ardu de déterminer, avec précision, la survenue en quantité détectable d'un composé. En effet, les variations de poids à un même âge sont considérables à l'intérieur d'une même portée, et d'une portée à une autre chez la souris. Ainsi (Tab. II), à un âge aussi crucial que le 15<sup>e</sup> jour après la naissance, les différences de poids corporel peuvent se traduire par une importante différence de poids de cerveau. Parmi les lipides, seul le pourcentage de galactolipides varie considérablement. Nul doute que dans la maturation du système nerveux, l'âge et le poids interviennent au même titre. Il est donc nécessaire d'établir avec précision le poids moyen pour un âge donné et d'éliminer les extrêmes si l'on désire effectuer une étude en fonction de l'âge.

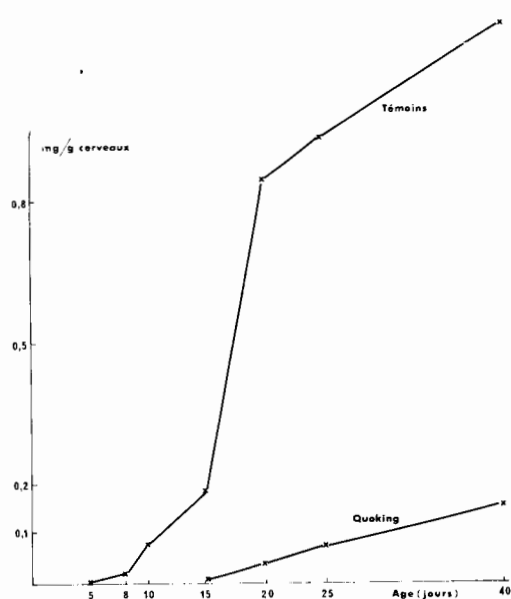


FIG. 3. — Evolution en fonction de l'âge du contenu en acides gras à 24 atomes de carbone.

cent à 1 jour. Il faut noter cependant que les cérébrosides présents avant le 8<sup>e</sup> jour sont en quantité minime [11], on obtient après purification des cérébrosides, 1 mg de substance pour 500 mg de lipides à 1 jour. Seuls les acides gras à 24 atomes de carbone augmentent à partir du 12<sup>e</sup> jour, les acides gras à 18 et 22 atomes de carbone continuent à diminuer progressivement. Les résultats sont résumés dans le tableau I.

Ainsi, il existe deux populations de cérébrosides : celle contenant des acides gras à chaîne moyenne précédant celle contenant des acides gras à longue chaîne, spécifique de la myélinisation. Ceux-ci n'apparaissent qu'en faible quantité

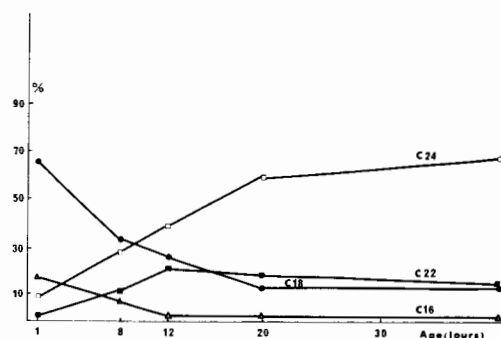


FIG. 4. — Variation en fonction de l'âge de la composition en acides gras des cérébrosides cérébraux chez la souris.

Une fois ces restrictions faites, on peut affirmer que les acides gras à longue chaîne sont un marqueur de la myélinisation, au même titre et

TABLEAU I.  
Pourcentage relatif des acides gras non  $\alpha$ -hydroxylés des cérébrosides cérébraux.

Acides gras	1 jour %	8 jours %	12 jours %	20 jours %	40 jours %
16	18,1	9,8	3,1	2,6	2,6
18:1 + 18:0	67,8	35,7	25,4	14	14,3
20:0	1,9	—	2,9	2,6	1,7
22:0	2,1	11,6	23,4	19	15,5
24:1 + 24:0	10,1	31,5	37,8	59,4	63,1
autres pics	—	11,4	7,4	2,4	2,8

peut-être de manière plus spécifique que les cérébrosides eux-mêmes.

Les cérébrosides à longue chaîne surviennent dans un deuxième temps par rapport à ceux à chaîne moyenne. Ils sont liés à la phase de myélinisation intense.

Ces études sont en accord avec les travaux effectués [10, 14] chez l'homme [10] au cours de la myélinisation. La souris a l'avantage de permettre de suivre tout au long ce processus de maturation cérébrale qui, contrairement à ce qui se passe chez l'homme, se produit après la naissance durant une très courte période de la vie de l'animal.

TABLEAU II.

*Influence du poids corporel sur les lipides cérébraux de la souris.*  
(Souris de 15 jours).

	Lot de petites souris	Lot de grosses souris
Poids moyen (g).....	5,3	7
Poids des cerveaux (g)	3,5	3,9
Lipides cérébraux (mg)	210	255
Cholestérol (*).....	12,1	13,1
Phospholipides (*).....	45	44
Galactolipides (*).....	3,8	5,3

(\*) Exprimés en mg/g de cerveau.

L'apparition des acides gras à longue chaîne, spécifique de la myélinisation et bloquée chez les Quaking, pourrait être un des points cruciaux du contrôle du métabolisme myélinique.

Il semble en tout cas bien établi qu'il existe dans les microsomes un système spécifique d'allongement des acides gras à 24 atomes de carbone, différent de celui donnant lieu à la formation des acides gras à 18 atomes de carbone [12].

Ce travail a pu être effectué grâce à des Conventions de Recherche de l'I.N.S.E.R.M. de la D.G.R.S.T. et de la D.R.M.E.

## RÉSUMÉ.

Les acides gras à 24 atomes de carbone apparaissent lors de la myélinisation chez la souris. Ces constituants n'existent pas en quantité détectable à la naissance. Les cérébrosides qui les contiennent sont détectés plus tard que les cérébrosides à chaîne moyenne. Ce groupe de galactolipides n'apparaît pas chez la

souris Quaking, mutant déficient en myéline. Les acides gras à chaîne longue seraient nécessaires au processus de myélinisation normale.

## ZUSAMMENFASSUNG.

Bei der «Quaking»-Maus ist früher ein Defekt in dem Gehalt an Fettsäuren mit langer Kette der Gehirngalaktolipide festgestellt worden.

Diese Arbeit zeigt eine vergleichende Untersuchung des Gehalts an Fettsäuren des Gehirns während des Reifens in der «Quaking»- und Kontrolle-Maus.

Der Gehalt an Fettsäuren mit mittlerer Kette nimmt normalerweise von 8 Tagen bis zu 25 Tagen zu und bleibt dann unverändert. Ein anderer Vorgang wird für Palmitinsäure beobachtet. Der Gehalt an Fettsäure mit langer Kette (C24) nimmt regelmässig von Null (bei 5 Tagen) bis zum erwachsenen Alter zu, mit einer Hauptzunahme zwischen 15 und 20 Tagen.

In der Quaking-Maus folgen alle Fettsäuren mit mittlerer Kette einen ähnlichen Weg; ihr Gehalt nimmt vom 15. Tag bis zum 25. Tag ab und bleibt dann unverändert. Die Fettsäuren mit langer Kette (LCFA) erscheinen vor dem 15. Tag nicht und nehmen langsam bis zum erwachsenen Alter zu.

In isolierten Cerebrosiden von scheinbar normalen Mäusen nehmen nicht hydroxylierte Fettsäuren mit langer Kette (C24 und C22) zu, während Fettsäuren mit mittlerer Kette (C16 und C18) von der Geburt an bis zum 20. Tag abnehmen und dann unverändert bleiben.

Es gibt zwei Gruppen von Cerebrosiden in Bezug auf ihren Fett-Sauregehalt. Cerebroside, welche Fettsäuren mit mittlerer Kette enthalten, sind von der Geburt an vorhanden, während Cerebroside, welche LCFA enthalten, später erscheinen, wenn die Myelinisation begonnen hat.

## BIBLIOGRAPHIE.

1. BAUMANN N. A., JACQUE C., POLLET S. et HARPIN M. L., *C. R. Acad. Sci.*, **264 D** (1967), 2953.
2. BAUMANN N. A., JACQUE C. M., POLLET S. A., HARPIN M. L., *European J. Biochem.*, **4** (1968), 340.
3. JACQUE C. M., HARPIN M. L. et BAUMANN N. A., *European J. Biochem.*, **11** (1969), 218.
4. O'BRIEN J. S., *Science*, **147** (1965), 1099.
5. VANDENHEUVEL J. S., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, (1963), 455.
6. BAUMANN N. A., HARPIN M. L. et BOURRE J. M., *Nature*, **227** (1970), 960.
7. FOLCH J., LEES M. et SLOANE-STANLEY C. H., *J. Biol. Chem.*, **226** (1957), 497.
8. HAJRA A. K. et RADIN N. S., *J. Lipid. Res.*, **4** (1963), 448.
9. MORRISON W. M. et SMITH L. R., *J. Lipid Res.*, **5** (1964), 600.
10. MENKES J. H., PHILIPPART M. et CONCONE M. C., *J. Lipid Res.*, **7** (1966), 479.
11. JACQUE C. M., BOURRE J. M., MORENO P. et BAUMANN N., *C. R. Acad. Sci.*, **271 D** (1970), 708.
12. BOURRE J. M., POLLET S., DUBOIS G. et BAUMANN N., *C. R. Acad. Sci.*, **271 D** (1970), 1221.
13. JACQUE C., LOUIS Ch., BOURRE J. M. et BAUMANN N., Congrès de Neurochimie, Budapest, 1971, Akadémiai Kiadó, p. 83.
14. SVENNERHOLM L. et STALLBERG-STENHAGEN S., *J. Lipid. Res.*, **9** (1968), 215.