

## Caractérisation des phospholipides et des triglycérides par RMN

B. Gillet, S. Bléneau et J.-C. Beloeil

Laboratoire de RMN biologique, ICSN-CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

**Fatty acids are one of the components of living things that have physiologically significant roles. One group, the phospholipids are a major constituent of cell membranes, while another, the triglycerides act as energy reserves. Nuclear Magnetic Resonance is a non-invasive, atraumatic method that can be used to study these biological materials in living animals. The first part of this article describes the nuclei and experiments (1D and 2D) used in the qualitative and quantitative analysis of mixtures of lipids derivatives. The second part is concerned with studies on lipids in living systems that are placed under specific constraints.**

Les acides gras sont des biomolécules insolubles dans l'eau mais très solubles dans les solvants organiques. Ils sont formés d'une longue chaîne carbonée et d'un groupement carboxylique terminal. Ils entrent dans la formation de différents composés ayant des rôles physiologiques importants. Ils sont ainsi un des éléments constitutifs des phospholipides et des glycolipides qui sont les principaux constituants des membranes biologiques. D'autre part, stockés sous forme de triglycérides, ils assurent les fonctions

de molécules énergétiques. Les triglycérides s'accumulent dans le cytoplasme des adipocytes qui jouent le rôle de réserve énergétique. Enfin certains de leurs dérivés ont des fonctions biologiques spécifiques : le phosphatidylinositol-biphosphate est un messenger intracellulaire, la 1-alkyl-2-acyl-phosphatidylcholine est le facteur d'activation des plaquettes et les prostaglandines sont des hormones dérivées de l'acide arachidonique [1].

Nous nous intéresserons ici aux phospholipides et aux triglycérides (ou triacylglycérols). Les phospholipides sont dérivés soit du glycérol, soit de la sphingosine. Ceux dérivés du glycérol sont les glycérophospholipides (appelés aussi phosphoglycérides) constitués d'un squelette glycérol estérifié par acides gras et d'un alcool phosphorylé (sérine, éthanolamine choline, glycérol ou inositol). Parmi les phospholipides, les plasmalogènes, comme la phosphatidylcholine, constituent une famille un peu particulière dans laquelle la chaîne acyle n'est plus liée au glycérol par une liaison ester mais par une liaison éther *a*, *b* insaturée. Si les glycérophospholipides sont très nombreux, il n'en est pas de même pour les dérivés de la sphingosine. En effet, la sphingomyéline est le seul phospholipide membranaire dérivé de la sphingosine (par estérification du groupe hydroxyle primaire par la phosphorylcholine). Les autres dérivés de la sphingosine sont les glycolipides dans lesquels un ou plusieurs oses sont liés au groupe hydroxyle primaire.

Les triacylglycérols, quant à eux, sont des lipides neutres constitués d'un glycérol estérifié par trois chaînes d'acides gras.

Tous ces composés sont formés de différents groupes de constituants : les acides gras, une partie glycérol ou sphingosine et, dans le cas des phospholipides, un alcool phosphorylé. Ils pourront être étudiés à l'aide de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton, du carbone 13 et éventuellement du phosphore. Les triacylglycérols sont généralement étudiés dans le chloroforme où ils sont facilement solubles. En revanche, dans ce type de solvant, les phospholipides s'agrègent facilement. Ceci provoque un élargissement des raies RMN. Pour les étudier, on peut soit utiliser les techniques de RMN du solide (mais ce n'est pas notre propos ici), soit utiliser des techniques plus « classiques », en dissolvant les phospholipides dans des mélanges de solvants qui limitent la formation d'agrégats tels que les mélanges chloroforme/méthanol ou eau/détergents. Les mélanges ternaires de type chloroforme/méthanol/0.2 mol K<sub>2</sub>EDTA dans l'eau permettent d'obtenir des raies suffisamment fines pour identifier, par RMN du phosphore, les pics des différents phospholipides présents dans des extraits de tissus cérébraux [2].

Nous présentons ici les différentes techniques d'analyse RMN mises en oeuvre pour l'étude des trois « parties » de ces composés : chaînes acyles, résidus glycérol ou sphingosine et têtes polaires.

### Étude des chaînes acyles

Les chaînes acyles liées au groupement glycérol sont saturées, mono-, di- ou poly-insaturées. Dans les cellules euca-

ryotes, ces chaînes ne sont pas ramifiées et contiennent un nombre pair de carbones compris généralement entre 14 et 24. Les insaturations sont majoritairement en configuration cis et, dans le cas des chaînes di- et poly- insaturées, il y a répétitions successives du motif CH = CH - CH<sub>2</sub>. Pour illustrer notre propos, nous avons choisi de présenter 5 acides gras répertoriés dans le tableau I.

#### Résonance Magnétique Nucléaire du proton

Les spectres à une dimension (1D) de ces différents acides sont représentés sur la figure 1 et l'attribution des pics aux protons de ces acides est reportée dans le tableau II.

Certains pics de résonance comme le pic B (correspondant aux chaînes CH<sub>2</sub>) et les pics E et C (correspondants respectivement aux carbones 2 et 3) gardent le même déplacement chimique d'un type d'acide à l'autre. La présence d'une insaturation est caractérisée par la présence des pics H et D. Le pic F, quant à lui, apparaît en cas de poly-insaturations.

Le méthyle terminal a le même déplacement chimique dans tous les acides gras, sauf dans l'acide  $\alpha$ -linoléique où il se trouve légèrement déblindé. Dans le cas de l'acide arachidonique, une autre résonance apparaît. Elle correspond aux protons portés par le carbone 4. Ces différences de déplacements chimiques sont très faibles et l'utilisation de la RMN à deux dimensions (2D) permet une analyse plus fiable. Ceci est d'autant plus vrai que l'on peut être amené à travailler dans des solvants différents [2]. En COSY (CORrelation Spectroscopy), les pics de corrélation croisée (pics hors diagonale) traduisent le couplage entre protons (le spectre 1D se retrouve sur la diagonale). Le « motif de couplage » obtenu pour chaque type d'acide gras est donc spécifique et peut être considéré comme « la carte d'identité »

Tableau I. Formules développées des acides gras étudiés par RMN du proton et numérotation des carbones.

nom commun nombre de C	nomenclature	Formules
acide palmitique 16	acide <i>n</i> -hexadécanoïque	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH 16 15-4 3 2 1
acide palmitoléique 16	acide cis - D <sup>9</sup> -hexadécénoïque	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH 16 15-12 11 10 9 8 7-4 3 2 1
acide linoléique 18	acide cis - D <sup>9</sup> ,D <sup>12</sup> - octadécadiénoïque	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH 18 17-15 14 13 12 11 10 9 8 7-4 3 2 1
acide $\alpha$ -linoléique 18	acide cis - D <sup>9</sup> ,D <sup>12</sup> ,D <sup>15</sup> - octadécatriénoïque	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7-4 3 2 1
acide arachidonique 20	acide cis - D <sup>5</sup> ,D <sup>8</sup> ,D <sup>11</sup> ,D <sup>14</sup> - eicosatétraénoïque	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH 20 19-17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Tableau II. Attribution des pics aux différents protons des molécules d'acides gras.

	K 0,90 ppm	A 0,8 ppm	B 1-1,3 ppm	C 1,6 ppm	D 1,9 ppm	D' 2,05 ppm	E 2,4 ppm	F 2,7 ppm	H 5,3 ppm
acide palmitique		16	4-15	3			3		
acide palmitoléique		16	4-7, 12-15	3	8, 11		2		9, 10
acide linoléique		18	4-7, 15-17	3	8, 14		2	11	9, 10, 12,13
acide a-linolénique	18		4-7	3	8, 17		2	11, 14	9, 10, 12, 13, 15, 16
acide arachidonique		20	19-17	3	16	4	2	7, 10, 13	5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15

de chaque type d'acide gras. Conformément aux résultats de RMN 1D, certaines corrélations sont identiques d'un acide gras à l'autre (Fig. 2). Ainsi les corrélations BC et CE (spectre A) se retrouvent dans les spectres 2D des 5 acides gras. La corrélation AB est présente sur tous les spectres 2D sauf sur celui de l'acide a-linolénique où apparaît la corrélation KD (spectre D). On peut noter ici qu'il est plus facile d'identifier, dans un mélange, la présence d'acide a-linolénique par son pic de corrélation croisée KD que par le déplacement chimique du groupe méthyle terminal. Les corrélations BD et DH apparaissent dans les spectres d'acides gras insaturés (spectre B). En cas de poly-insaturations la corrélation FH est également présente (spectre C). L'acide arachidonique est également identifiable par la présence de la corrélation CD' et l'absence de corrélation BC (spectre E).

L'expérience TOCSY (Total COrrélation Spectroscopy) permet de corréler tous les protons d'un même système de spin [3]. Cette expérience réalisée en mode phasé a un meilleur pouvoir de résolution que la COSY et fournit des « cartes d'identité » plus spécifiques (Fig. 3). Les corrélations interprotoniques présentes sur le spectre sont fonction du temps de mélange introduit pendant l'expérience. Ainsi, l'intensité des pics de corrélations entre protons vicinaux de l'acide linoléique est maximale pour un temps de mélange de 40 ms. Ces corrélations correspondent à celles du spectre COSY. Quand le temps de mélange augmente (80 – 100 ms), les corrélations entre protons plus éloignés dans la chaîne apparaissent (BE ou BH) (Fig. 3). Pour des temps supérieurs à 120 ms tous les protons du système de spins sont corrélés (en particulier la corrélation DE entre les protons 8 et 2 est visible). Outre l'aspect qualitatif, cette expérience TOCSY peut être utilisée à des fins d'analyse quantitative [4].

**Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13**

Le carbone 13 a une plage de déplacement chimique beaucoup plus étendue que le proton, donc un pouvoir de résolution plus élevé. Gunstone [5] a déterminé les déplacements

Tableau III. Déplacements chimiques moyens des carbones des chaînes d'acides gras.

	Déplacements chimiques ppm
Carbone du groupe acyle	173
Carbone en a du groupe acyle	34
Carbone en b du groupe acyle	25
Carbone du groupe méthyle	14
Carbone en a du groupe méthyle	23
Carbone en b du groupe méthyle	32
Carbones oléfiniques	130
Carbones allyliques	27 et 25,6
Carbones des chaînes méthylènes	29-29,8

chimiques des différents carbones des chaînes d'acide gras (Tab. III).

Il a analysé plus finement les spectres, ce qui lui a permis, par exemple, de discerner les variations de déplacements chimiques des carbones 1, 2 et 3 en fonction de la liaison (en G1, G3 ou G2) de la chaîne acyle avec le glycérol (Fig. 4). La position et le nombre d'insaturations permettent de distinguer les différents acides gras. À titre d'exemple le tableau IV donne les déplacements chimiques des différents carbones oléfiniques des acides palmitoléique, linoléique et a-linolénique.

Ainsi, grâce aux tables de déplacements chimiques construites par Gunstone, il est possible d'identifier les différents carbones d'un acide gras. Obtenir une analyse quantitative en carbone 13 oblige à prendre en compte le problème du temps de relaxation de ces noyaux. Tous les carbones doivent être revenus à leur état initial entre chaque acquisition et de ce fait les temps d'expérience peuvent devenir rapidement prohibitifs. Pour diminuer la valeur du

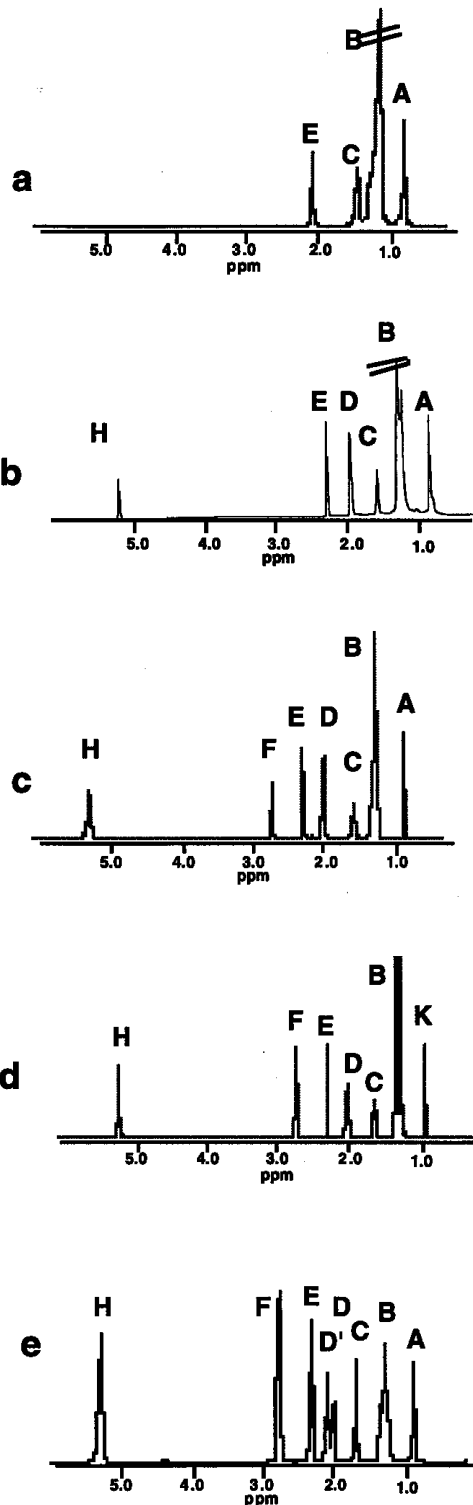


Figure 1. Spectres 1D proton des acides palmitique (a), palmitoléique (b), linoléique (c),  $\alpha$ -linoléique (d) et arachidonique (e), enregistrés à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$ .

décali entre chaque acquisition, on peut ajouter un agent de relaxation comme l'acétylacéonate de chrome. Toutefois, l'obtention d'un spectre carbone 13 (abondance naturelle 1,1 %) nécessite d'utiliser un échantillon suffisamment

Tableau IV. Déplacements chimiques des carbones oléfiniques des acides palmitoléique, linoléique et  $\alpha$ -linoléique.

numéro des carbones :	9	10	12	13	15	16
acide palmitoléique	129,70	129,98				
acide linoléique	129,98	128,09	127,91	130,19		
acide $\alpha$ -linoléique	130,19	127,77	128,24	128,29	127,13	131,93

concentré, ce qui n'est pas toujours possible lorsqu'on travaille sur des extraits tissulaires. Les techniques hétéronucléaires à deux dimensions de type « inverse » peuvent permettre d'accéder aux données carbone 13 car le fait d'acquérir les données en proton (abondance naturelle 100 %) augmente notablement la sensibilité de l'expérience. Les expériences de corrélation de déplacements chimiques HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) [6] ou HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) [7] fournissent des surfaces permettant de relier un carbone aux protons qu'il porte (Fig. 5). Les projections des taches de corrélation donneront dans une dimension les déplacements chimiques proton (dimension d'acquisition) et dans l'autre les déplacements chimiques carbone 13. Il faut toutefois noter que par ces techniques « inverses » les carbones quaternaires n'apparaissent pas, que l'intensité des pics obtenus par projection n'est pas le reflet de la concentration des carbones correspondants et qu'il est donc difficile de faire une analyse quantitative à partir de ces données (Fig. 5).

### Étude du glycérol et de la sphingosine

Les formules d'un triacylglycérol, de la phosphatidylcholine et de la sphingomyéline sont représentées sur la figure 4. Le tableau V répertorie les déplacements chimiques proton et carbone 13 des groupes du résidu glycérol d'un triglycéride et de la phosphatidylcholine.

Dans les triglycérides, le glycérol est symétrique et les groupes G1 et G3 ont les mêmes déplacements chimiques en proton et en carbone 13. Dans les glycérophospholipides les protons du groupe G3 (estérifié par la phosphorylcholine) sont légèrement blindés, par rapport à ceux du groupe G1. Les carbones du glycérol subissent un léger déblindage entre triglycérides et phospholipides mais plus important pour le carbone G3. On peut également noter que d'après les travaux de Gunstone, les déplacements chimiques des carbones 1 des chaînes acyles subissent un très léger déblindage (de l'ordre de 0,05 ppm) entre triglycérides et phospholipides. Le radical sphingosine est facilement identifiable par la présence du proton NH à 7,05 ppm et des protons oléfiniques à 5,72 (proton S7) et 5,47 ppm (proton S8).

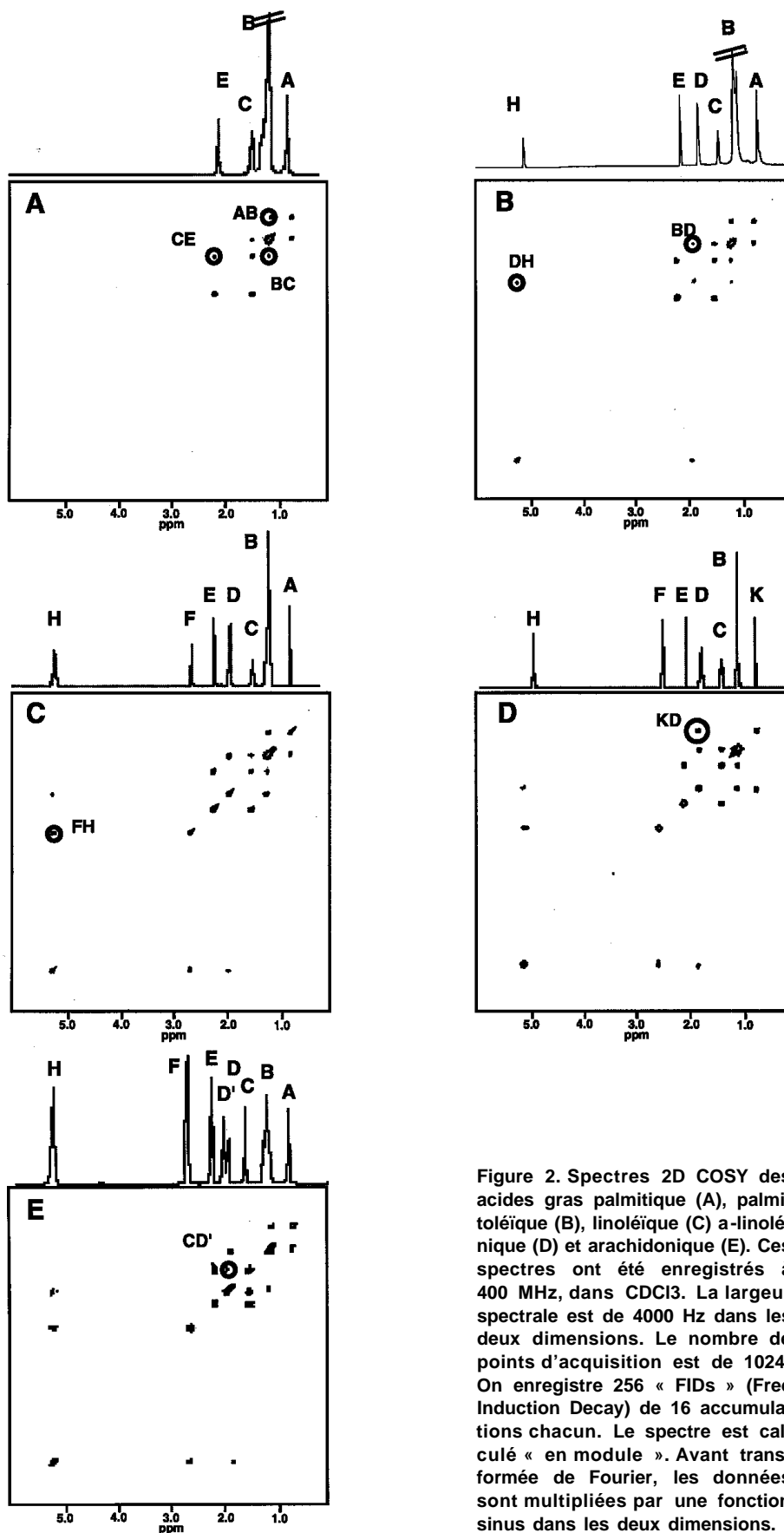


Figure 2. Spectres 2D COSY des acides gras palmitique (A), palmitoléique (B), linoléique (C)  $\alpha$ -linoléique (D) et arachidonique (E). Ces spectres ont été enregistrés à 400 MHz, dans  $\text{CDCl}_3$ . La largeur spectrale est de 4000 Hz dans les deux dimensions. Le nombre de points d'acquisition est de 1024. On enregistre 256 « FIDs » (Free Induction Decay) de 16 accumulations chacun. Le spectre est calculé « en module ». Avant transformée de Fourier, les données sont multipliées par une fonction sinus dans les deux dimensions.

Tableau V. Déplacements chimiques des protons du résidu glycérol dans les triglycérides (a : solvant CDCl<sub>3</sub> Réf. [8]) et dans la phosphatidylcholine (b : solvant mélange ternaire chloroforme/méthanol/eau (K<sub>2</sub>EDTA); 100/16/4, Réf. [9]).

	groupe G1		groupe G2		groupe G3	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
triglycéride	4,1 (a)	62,46	5,2(a)	69,38	4,1(a)	62,46
	4,3 (a)				4,3(a)	
phosphatidylcholine	3,97 (b)	62,86	5,22(b)	70,67	4,16 (b)	63,88
				70,62	4,41 (b)	

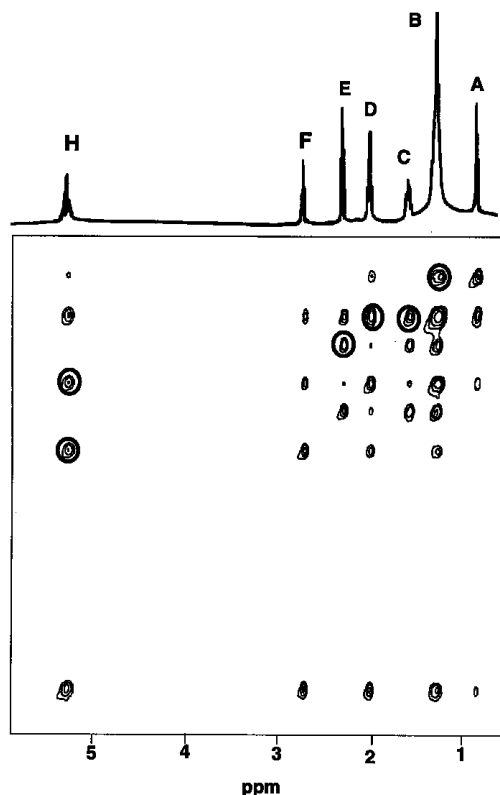


Figure 3. Spectre TOCSY de l'acide linoléique à 400 MHz, dans CDCl<sub>3</sub>. On acquiert 8 FIDs sur 1K points dans le domaine t<sub>2</sub> pour chacun des 256 incréments du domaine t<sub>1</sub>. La largeur spectrale est de 4000 Hz dans les deux dimensions. Les données sont multipliées par une fonction cos<sup>2</sup> dans les deux dimensions et on ajoute des niveaux de zéros (pour obtenir une matrice 2048 × 1024) avant d'effectuer la Transformée de Fourier, calculée en mode « phasé ». Le temps de mélange de l'expérience est de 150 ms. Les taches de corrélation entourées d'un cercle correspondent aux corrélations entre protons vicinaux. Le motif formé par ces corrélations est analogue au motif COSY.

### Étude des têtes polaires

Les déplacements chimiques proton sont caractéristiques de chacun des alcools phosphorylés et sont susceptibles de légères variations en fonction de la composition du mélange ternaire dans lequel ils sont étudiés [9] et Gunstone [5] a identifié les pics carbone 13 des résidus choline et éthanolamine. Toutefois, le phosphore apparaît comme un noyau

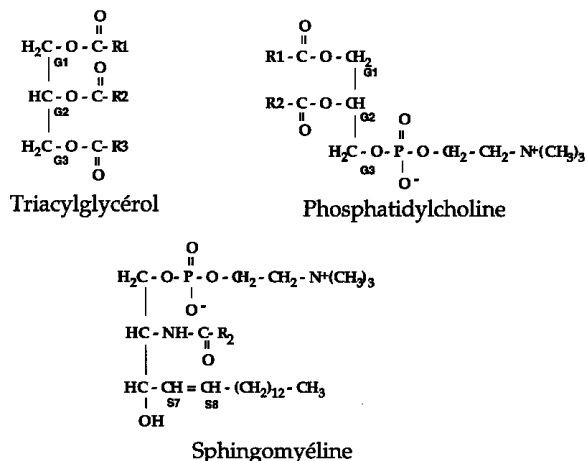


Figure 4. Formules d'un triglycéride, de la phosphatidylcholine et de la sphingomyéline. R1, R2 et R3 représentent les chaînes acyles.

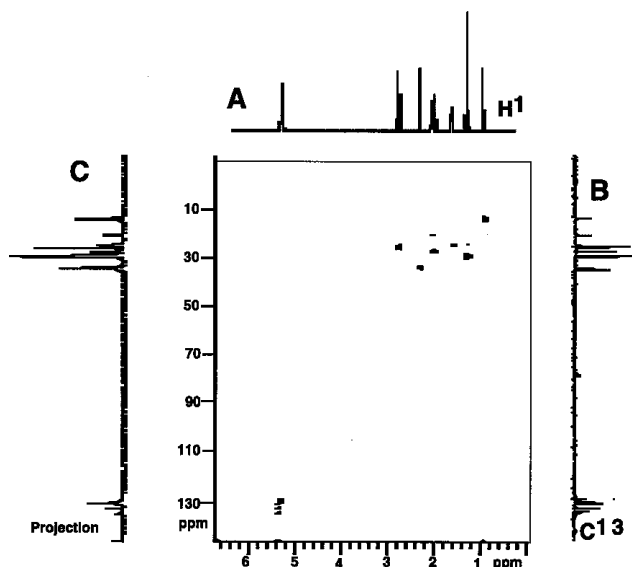


Figure 5. Spectre 2D HMQC de l'acide α-linolénique. à 400 MHz, dans CDCl<sub>3</sub>. La largeur spectrale est de 2700 Hz en dimension 2 (proton) et 15600 Hz en dimension 1 (carbone). On enregistre 256 FIDs de 16 accumulations chacun (1 K points d'acquisition). Avant transformée de Fourier on multiplie les données par des fonctions gaussiennes dans les deux dimensions et on ajoute des niveaux de zéros pour obtenir une matrice 2048 × 1024. Sur la figure nous avons représenté le spectre proton 1D (A), le spectre carbone 13 (B), et la projection horizontale (carbone 13) des taches de corrélations (C).

de choix pour analyser qualitativement et quantitativement un mélange de phospholipides [2]. Mais il est nécessaire d'ajuster la composition du mélange ternaire chloroforme/méthanol/eau(+K<sub>2</sub>EDTA) afin de séparer toutes les résonances car leur plage de déplacement chimique est très réduite (1,5 ppm). Avec cette méthode Edzes et al. [2] ont attribué les pics phosphore de nombreux phospholipides comme la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidyléthanolamine, la 1-alkyl-2-acyl-phosphatidylcholine, le phosphatidylinositol, le phosphatidylinositol biphosphate, la phosphatidylsérine et la sphingomyéline.

Il est également possible d'utiliser des expériences hétéronucléaires phosphore-proton pour augmenter le pouvoir de résolution. Edzes et al. [9] ont mis en oeuvre une expérience 2D hétéronucléaire phosphore-proton dans laquelle ils ont introduit une séquence de mélange isotropique proton (TOCSY). Cette expérience permet de corréler un phosphore avec les protons des systèmes de spins du glycérol et de la tête polaire.

La Résonance Magnétique Nucléaire apparaît donc comme un outil adapté à l'étude des mélanges lipidiques contenant des triglycérides et des phospholipides. Les techniques proton et carbone 13 permettent d'identifier les résidus glycérol de ces deux types de lipides. Par RMN du phosphore on peut analyser qualitativement et quantitativement un mélange de phospholipides. D'autre part, la RMN du proton et du carbone 13 permet d'analyser la composition des chaînes acyles en fonction de leur taux d'insaturation. L'identification d'un acide spécifique est possible dans certains cas : acide gras de type  $\alpha$ -linoléique ou arachidonique. Les résultats reportés ci-dessus ont été obtenus à partir de produits purs, d'huiles ou d'extraits tissulaires. On peut envisager d'entreprendre des analyses de même type sur le milieu vivant : cellules ou organes *in situ*.

### Étude des lipides dans les milieux vivants

Ces milieux sont très hétérogènes pour la RMN. Il en résulte une augmentation des largeurs de raies, donc une diminution du pouvoir de résolution. De ce fait une étude analogue à celle menée en phosphore sur les extraits de tissus cérébraux n'est pas envisageable. Les études en carbone 13 sont possibles dans les tissus adipeux où la concentration en lipides est importante. Ainsi Moonen et al. ont déterminé les proportions relatives d'acides gras polyinsaturés dans ces tissus chez l'homme [10]. En fait, le seul acide gras polyinsaturé en quantité significative est l'acide linoléique, cette expérience permet donc d'en estimer la proportion dans les adipocytes. *In vivo*, la largeur de raie à mi-hauteur (entre 10 et 14 Hz à 1,9 T) est trop importante pour séparer les pics de résonances des carbones 10 et 12 de l'acide linoléique mais permet de séparer ceux des carbones 9 et 13. Ces derniers sont également confondus avec ceux des carbones oléfiniques des acides gras monoinsaturés (9 et 10 de l'acide oléique ou palmitoléique). Par comparaison des intensités de ces pics (normalisées à l'aide d'une référence interne qui est l'intensité du pic correspondant au carbone du groupe carbonyle) on peut estimer les proportions relatives d'acides mono et polyinsaturés.

L'acide linoléique est un acide gras essentiel. Il n'est pas synthétisé par voie endogène.

Il ne peut être fourni que par l'alimentation et est un précurseur dans la synthèse d'autres acides gras [1]. Seelig et al. ont étudié la corrélation entre la composition en acides gras des tissus adipeux (saturés, mono et polyinsaturés) et celle des graisses alimentaires [11]. Le tissu adipeux se prête bien aux études en carbone 13 en abondance naturelle, mais ce n'est généralement pas le cas dans les autres tissus car la concentration des différents métabolites est trop faible. Toutefois l'analyse peut être réalisée par RMN du proton. Nous avons ainsi pu observer, par RMN 2D COSY du muscle *in situ*, une différence entre les spectres des muscles de souris normales et dystrophiques [12]. Ces spectres sont représentés sur la figure 6. Sur le spectre A (souris normale) on reconnaît les corrélations présentes sur les spectres COSY des acides saturés, mono et di-insaturés (Fig. 2). Sur le spectre B (souris dystrophique) on identifie facilement une corrélation supplémentaire (notée KD) correspondant à la structure (CH<sub>3</sub> - CH<sub>2</sub> - CH =) de la partie terminale de l'acide  $\alpha$ -linoléique. En suivant les animaux en fonction du temps, nous avons montré que cette corrélation était bien visible sur le spectre 2D des animaux âgés de 2 à 4 semaines. Ce signal diminue par la suite et s'efface entre deux et six mois.

Une étude sur cultures de cellules a permis de déterminer la provenance de ce signal supplémentaire. Nous avons comparé les spectres de fibroblastes et de myoblastes.

Plusieurs lots ont été observés et les résultats sont constants [12]. Le spectre 2D des fibroblastes ne présente aucune corrélation lipidique. À l'inverse, celui des myoblastes dépend de leur état : lorsque celles-ci sont en réplique, de très faibles corrélations sont présentes. Elles deviennent intenses lors de la fusion cellulaire. On détecte systématiquement la corrélation (KD) caractéristique des acides gras de type linoléique (Fig. 7). La fusion de myoblastes est un modèle *in vitro* de la régénération musculaire.

Les souris dystrophiques que nous avons étudiées sont des souris mdx, considérées comme un modèle de la

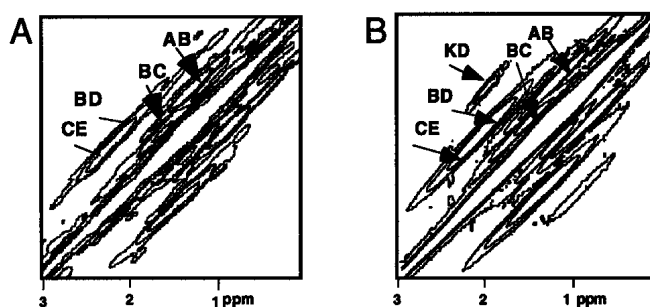


Figure 6. Agrandissement de la zone comprise entre 0 et 3 ppm des spectres COSY de muscles A de souris témoin, B de souris mdx âgées de 4 semaines. Les spectres ont été enregistrés à 400 MHz. La largeur spectrale est de 4000 Hz dans les deux dimensions. Le nombre de points d'acquisition est de 1024. On enregistre 128 « FIDs » de 8 accumulations chacun. Le spectre est calculé « en module ». Avant transformée de Fourier, les données sont multipliées par une fonction sinus dans les deux dimensions.

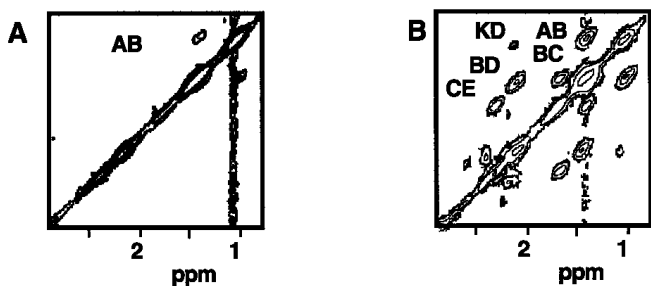


Figure 7. Agrandissement de la zone comprise entre 0 et 3 ppm des spectres COSY de cellules myoblastes A en réplcation, B en fusion. Les spectres ont été enregistrés à 400 MHz. La largeur spectrale est de 4000 Hz dans les deux dimensions. Le nombre de points d'acquisition est de 1024. On enregistre 128 « FIDs » de 8 accumulations chacun. Le spectre est calculé « en module ». Avant Transformée de Fourier, les données sont multipliées par une fonction sinus dans les deux dimensions.

myopathie de Duchenne. Dans les premières semaines de vie de ces animaux on observe des périodes de fortes dégénérescence/régénération musculaires. Il semble donc que la corrélation KD puisse être un marqueur de la néogénèse. L'étude sur un modèle de régénération murin, en cours actuellement, semble confirmer cette hypothèse. Ces signaux fins ne peuvent provenir que de molécules ayant une mobilité suffisante. Les membranes intactes ont une structure proche de celle des cristaux liquides et ne donnent pas de signaux lipidiques en RMN « classique ». Les signaux proviennent donc de structures dans lesquelles les chaînes acyles ont une mobilité plus grande que dans les bi-couches membranaires. L'apparition de signaux lipidiques intenses a également été observée dans d'autres cas [13]. Il en est ainsi pour les cellules cardiaques après un infarctus aigu [14], lors de la stimulation des lymphocytes [15] et dans certains types de cancers [16,17]. Dans le cas des cellules cardiaques, les signaux lipidiques proviennent de gouttelettes lipidiques situées dans le cytosol et constituées de NEFA (acides gras non estérifiés) qui peuvent provenir de l'hydrolyse des lipides endogènes (triacylglycérols ou phospholipides) [18]. Dans le cas des cellules cancéreuses et des lymphocytes stimulés, deux hypothèses ont été émises : ces signaux proviendraient soit de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques soit de structures comportant des lipides neutres et localisées dans la membrane cytoplasmique [19]. Le spectre *in vivo* du muscle contenait des corrélations d'acides gras qui peuvent provenir de gouttelettes lipidiques visibles par microscopie électronique sur des cellules musculaires humaines [20]. A l'heure actuelle nous ne pouvons pas conclure quant à la provenance des signaux lipidiques observés lors de la fusion des myoblastes et lors de la régénération musculaire. Nous poursuivons nos travaux sur des extraits lipidiques en mettant en oeuvre les techniques homo et hétéronucléaires décrites ici.

La Résonance Magnétique Nucléaire permet d'accéder *in vitro* à l'analyse qualitative et quantitative de mélanges de

lipides. Du fait de son caractère atraumatique et non-invasif, elle autorise des études sur des cultures cellulaires, sur des animaux et sur l'homme. Le choix des moyens mis en oeuvre doit se faire en tenant compte de la concentration des métabolites et du temps total d'expérience qui doit être minimisé pour être compatible avec des études sur des sujets vivants. Le noyau de prédilection est dans ce cas le proton. Une fois réglé le problème de la suppression du signal de l'eau (qui peut être jusqu'à 10<sup>5</sup> fois supérieur à ceux des métabolites), les techniques 1D et 2D permettent d'observer des variations dans la « visibilité RMN » des signaux lipidiques lors de différents processus biologiques : stress, stimulation, fusion... et d'identifier les différents types de chaînes acyles présentes.

### Références

1. Stryer, L. *La Biochimie* Flammarion, Paris, 1992.
2. Edzes, H. T.; Teerlink, T.; van der Knapp, M. S.; Valk, J. *Magn. Res. Med.* **1992**, *26*, 46-59.
3. Gillet, B.; Doan, B. T. *J. Magn. Res.* **1995**, Series B108, 44-49.
4. Doan, B. T.; Gillet, B.; Blondel, B.; Beloeil, J. C. *Fuel* **1995**, *74*, 1806-1811.
5. Gunstone, F. D. In: *New Trends in Lipid and Lipoprotein Analyses*, Sebedio, J. L.; Perkins, E. G. Eds.; AOCs Press, Champaign, Illinois, 1995; pp 250-264.
6. Bax, A.; Griffey, R. H.; Hawkins, B. L. *J. Magn. Res.* **1983**, *55*, 301-315.
7. Bodenhausen, G.; Ruben, D. J. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185-188.
8. Williams, P. G.; Helmer, M. A.; Wright, L. C.; Dyne, M.; Fox, R. M.; Holmes, K. T.; May, G. L.; Mountford CE. *FEBS Lett.* **1985**, *192*, 159-164.
9. Edzes, H. T.; Teerlink, T.; Valk, J. *J. Magn. Res.* **1991**, *95*, 387-395.
10. Moonen, C. T.; Dimand, R. J.; Cox, K. L. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1989**, *53*, 71-103.
11. Beckmann, N.; Brocard, J. J.; Keller, U.; Seelig, J. *Magn. Res. Med.* **1992**, *27*, 97-106.
12. Gillet, B.; Doan, B. T.; Verré-Sébrié, C.; Barrère, B.; Peres, M.; Berenger, G.; Morin, S.; Koenig, J.; Beloeil, J. C. *Neuromusc. Disord.* **1993**, 433-438.
13. Bléneau, S.; Gillet, B.; Verré-Sébrié, C.; Beloeil, J. C. *Cell. Mol. Biol.* **1997**, *43*, 711-719.
14. Evanochko, W. T.; Reeves, R. C.; Sakai, T. T.; Comby, R. C.; Pohost, G. M. *Magn. Res. Med.* **1987**, *5*, 23-31.
15. Holmes, K. T.; Lean, C. L.; Hunt, N. H.; King, J. C. *Magn. Res. Med.* **1990**, *16*, 1-8.
16. Kotiskche, K.; Jung, H.; Nekolla, S.; Haase, A.; Bauer, A.; Bodgan, U. *NMR Biomed.* **1994**, *7*, 111-120.
17. Kuesel, A. C.; Donnelly, S. M.; Halliday, W.; Sutherland, G. R.; Smith, I. C. P. *NMR Biomed.* **1994**, *7*, 172-180.
18. Stewart, L. C.; Saundres, J. K.; Deslauriers, R.; Bourgeois, D.; Nédélec, J. F. *Magn. Res. Med.* **1993**, *30*, 655-660.
19. Callies, R.; Sri-Pathmanathan, R. M.; Ferguson, D. Y. P.; Brindle, K. M. *Magn. Res. Med.* **1993**, *29*, 546-550.
20. Boesch, C.; Slotboom, J.; Hoppeler, H.; Kreis, R. *Magn. Res. Med.* **1997**, *37*, 484-493.