

LES GANGLIOSIDES

par F. MIRANDA (*) et H. ROCHAT

INTRODUCTION

*L'étude des gangliosides a connu un essor considérable depuis quelques années, la recherche dans ce domaine ayant été stimulée incontestablement par la découverte de maladies du système nerveux où l'on observe une accumulation de ces substances. Depuis cinq ans environ, des dizaines de publications ont paru chaque année sur ce sujet et un petit nombre de revues générales ont tenté de faire le point sur tout ou partie de ce vaste problème (1 à 5)**. Pour rester dans les limites convenant à un tel exposé, nous nous sommes placés strictement sur un plan chimique et biochimique en mettant particulièrement l'accent sur les aspects pouvant présenter quelques rapports avec le champ de nos recherches personnelles (biochimie des neurotoxines animales).*

* Professeur-missionnaire à l'Ecole Nationale de Médecine, Tananarive.

** La bibliographie ayant servi à la rédaction de ce mémoire recouvre les articles parus jusqu'en mars 1964.

HISTORIQUE

En 1927, WALZ (6) isola du cerveau et de la rate de bœuf un composé rappelant les cérébrosides (sphingolipides constitués par une molécule de sphingosine, une molécule d'acide gras et une molécule d'ose, généralement de galactose), mais se distinguant des substances déjà connues de ce groupe par différents caractères : il possédait une haute sensibilité vis-à-vis de l'hydrolyse acide et donnait une coloration pourpre avec le réactif de BIAL (orcinol chlorhydrique + perchlorure de fer)^{***} ; par chauffage avec l'acide sulfurique à 16 %, un précipité noir d'humine se forme.

La même année, LEVENE et LANDSTEINER (8) signalèrent, de leur côté, la présence d'un composé de ce type dans le cerveau humain. Puisque ces composés contiennent un sucre mais pas de phosphate, il est évident qu'ils sont beaucoup plus proches des cérébrosides que d'autres lipides conjugués plus ou moins solubles dans l'eau tels que les phosphatides.

Une dizaine d'années plus tard, BLIX (9) confirma ces observations en identifiant une substance de cette nature dans le cerveau humain normal. Le constituant glucidique fut assimilé à une hexosamine, car il donnait une réaction positive avec le réactif d'Ehrlich au paradiméthylaminobenzaldéhyde.

Dans une série de travaux, KLENK (10 à 13) isola un lipide qu'il appela « substance X » à partir des tissus d'individus présentant certaines maladies du système nerveux, en particulier, la maladie de TAY-SACHS (idiotie infantile amaurotique) où il remplace totalement les cérébrosides normaux, ce qui confirmait la parenté de constitution du composé inconnu avec ce groupe de lipides. Comme il l'avait rencontrée, de façon prédominante, dans les cellules ganglionnaires du système nerveux et comme il prévoyait pour elle une structure glucosidique, KLENK appela cette substance ganglioside (14). En fait, il conviendrait mieux de parler « des gangliosides » puisque, comme il apparaîtra par la suite, il s'agit d'une famille de composés. Dans les conditions normales, la plus forte concentration se trouve dans le cortex cérébral, tandis que la matière blanche n'en contient que des quantités négligeables (15). Dans la maladie de TAY-SACHS, les gangliosides sont présents, dans le cortex, à une concentration dix fois supérieure à la normale.

Malgré leur nom, les gangliosides se rencontrent en dehors du tissu nerveux : c'est ainsi que KLENK et RENNKAMP (16), confirmant les premiers travaux de WALZ, les isolèrent de la rate de bœuf normale. Plus récemment, différents auteurs (17 à 19) en ont obtenu à partir des érythrocytes de cheval.

Cependant, leur source principale reste la matière grise et c'est leur rôle dans le fonctionnement du système nerveux qui a suscité le plus grand nombre de recherches.

^{***} On a su plus tard (KLENK — 1941 — (7) —) que cette réaction révélait la présence de l'acide neuraminique, composé provenant de l'aldolisation d'une hexosamine avec l'acide pyruvique.

PRÉPARATION

Nous prendrons comme exemple l'extraction des gangliosides du cerveau. Les gangliosides constituent une fraction peu importante des lipides du cerveau (moins de 3 % — Cf. Tableau I — (5) —).

COMPOSITION OF WHOLE BEEF BRAIN LIPID*
(according to Rouser)

Constituent	Quantity
	<i>g/100 g total solid</i>
Cholesterol+	20.3
Cerebroside	16.7
Phosphotidyl ethanolamine	16.5
Lecithin	11.0
Sphingomyelin	7.9
Phosphatidyl serine	7.2
Sulfatide (probably entirely cerebroside sulfate)	3.5
Gangliosides	2.8
Polyglycerophosphatides (incompletely charaterized)	2.4
Phosphatidyl inositol	1.1
Phosphatidic acid	0.6
Ceramide	0.4
Triphosphoinositide	0.3
Chloroform-methanol soluble nonlipid (water soluble substances)	9.0
TOTAL	99.7

* Obtained by exhaustive extraction with chloroform-methanol (2:1) as described(17).

+ No cholesterol esters were found.

Tableau I

La préparation s'opère en deux stades :

- 1) Isolement en bloc des gangliosides ;
- 2) Fractionnement des différentes espèces de gangliosides.

1. — ISOLEMENT DES GANGLIOSIDES TOTAUX :

Le schéma général du fractionnement des lipides du cerveau est indiqué sur la figure 1 (2).

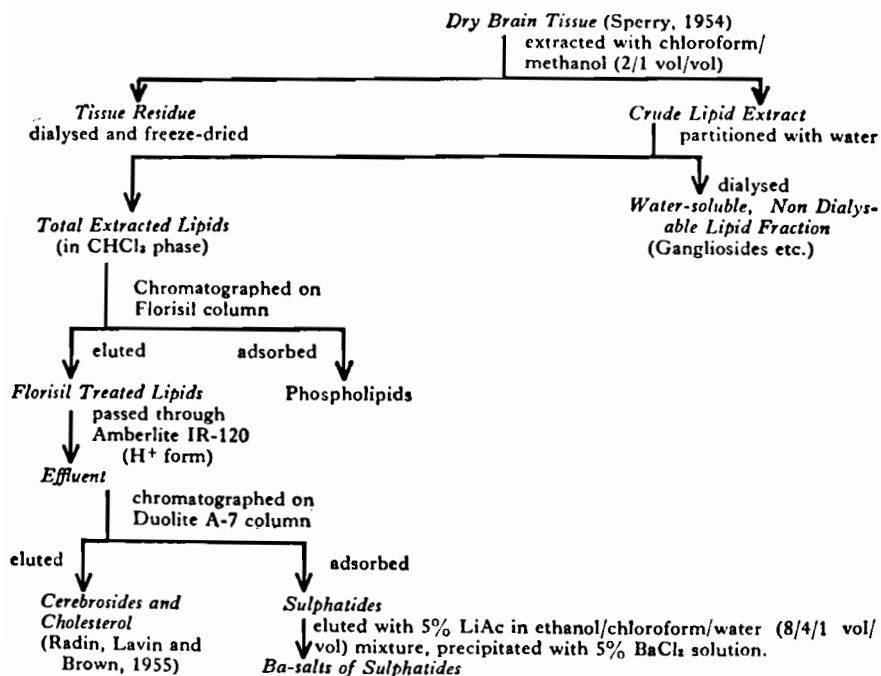


Fig. 1

Le principe de la préparation des gangliosides repose sur le passage de ces composés dans la phase aqueuse au cours d'une opération de partage eau/extrait chloroforme-méthanol de cerveau. La fraction gangliosidique brute ainsi obtenue peut être souillée par des aminoglycolipides et des diphosphoïnositides.

Une purification plus poussée peut être obtenue par le procédé de GAMMACK (20) qui s'inspire des méthodes de FOLCH et coll. (21), LONG et coll. (22) et BOOTH (23).

Le premier stade de l'opération est un épuisement du tissu cérébral par l'acétone qui a pour but d'éliminer le matériel protidique insoluble (24). La matière grise du cerveau de bœuf est d'abord broyée et agitée pendant deux minutes avec de l'acétone à raison de 3 ml de solvant par gramme de tissu frais. L'opération est recommencée avec 1 ml de solvant par gramme de tissu. La suspension est filtrée à travers un bûchner garni de papier Whatman n° 43. On presse le résidu pour éliminer le plus possible l'acétone, on le fait sécher pendant une nuit dans un

courant d'air et on le broie finement au mortier. Le rendement en poudre acétonique pour une préparation type est de 173 g/kg de matière grise fraîche.

Un poids de poudre acétonique équivalant à 500 g de tissu frais est agité au « mixer » pendant 60 minutes avec 10 litres d'un mélange chloroforme-méthanol (1 : 1, v/v). L'extrait est filtré à travers un filtre piissé en papier Whatman n° 1. Le filtrat est additionné de 5 litres de chloroforme et de 3 litres de solution de KCl 0,1M. Le mélange est agité pendant une heure, l'émulsion persistant pendant tout ce temps. Après un repos de quelques heures, la phase claire surnageante est retirée par siphonage et dialysée pendant 2 jours contre de l'eau courante maintenue à la température de 10°.

Durant la dialyse, le contenu du sac se sépare en une solution limpide surmontant une émulsion chloroformique opaque. A la fin de l'opération, la solution limpide est séparée et l'émulsion chloroformique traitée indépendamment. Le volume de la phase aqueuse est réduit à 1 litre dans un évaporateur rotatif à une température de 50-60°. La solution concentrée est amenée à pH 2,6 avec HCl, puis soumise à une dialyse exhaustive et enfin lyophilisée. A partir de 500 grammes de matière grise, on obtient une poudre blanche floconneuse dont le poids varie entre 600 et 750 mg.

L'émulsion chloroformique, traitée de la même façon (sans ajustement du pH), fournit une fraction gangliosidique représentant 20 % en poids de la précédente.

La dernière étape de la purification consiste à éliminer les ions de petite taille par passage sur un lit mélangé (Amberlite MB-3). On lyophilise la solution de gangliosides désionisée. La préparation obtenue contient moins de 0,1 % en poids de phosphore.

II. — FRACTIONNEMENT DES DIFFERENTES ESPECES DE GANGLIOSIDES

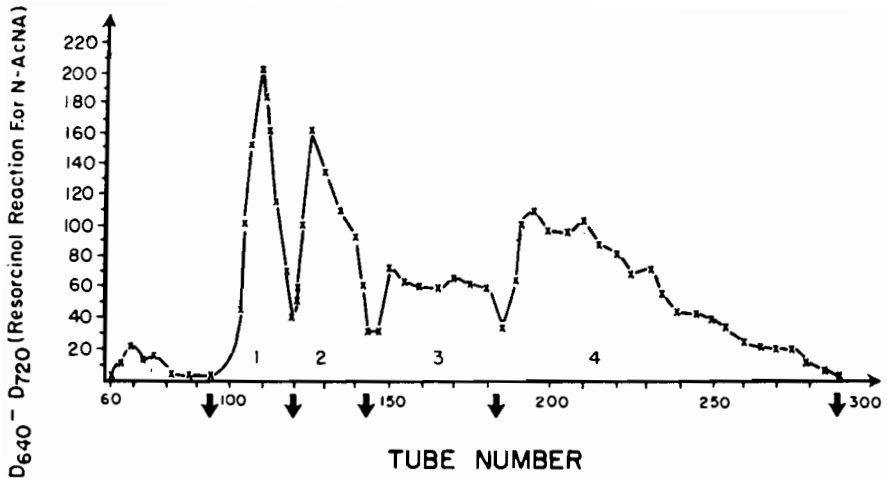
Il peut être envisagé sous deux aspects :

- préparatif
- analytique.

A) Méthodes préparatives :

Elles utilisent généralement des colonnes de gel de silice mais les conditions opératoires varient avec les auteurs :

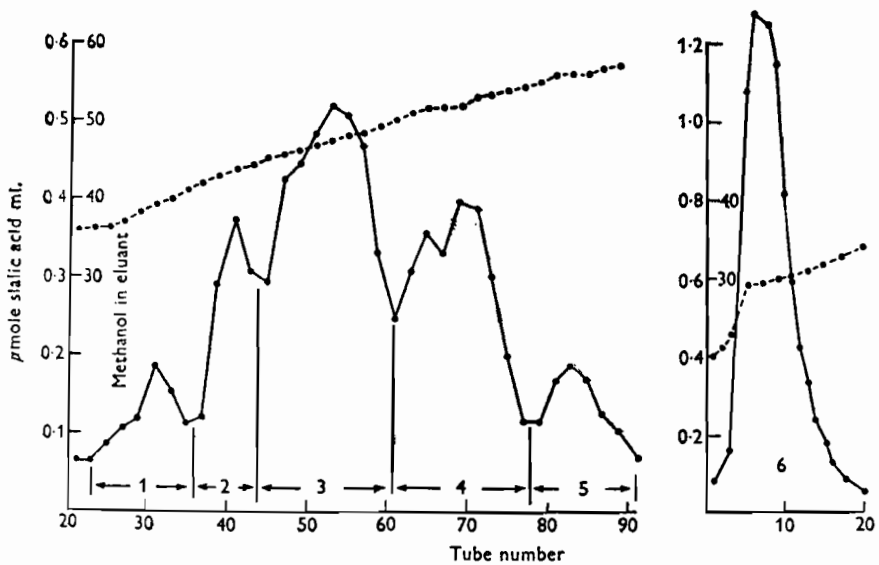
— Utilisation d'un solvant : propanol-ammoniaque-eau (6 : 2 : 1, Figure 2 (25)).



Silica gel column fractionation of beef brain ganglioside.

Fig. 2

— Colonne équilibrée dans le chloroforme, puis lavée par un mélange chloroforme-méthanol à 20 % de méthanol et éluée par un mélange chloroforme-méthanol de concentration croissante en méthanol (de 30 à 60 %) — Figure 3 (26).



Peaks 1-5, ganglioside fractions separated from chloroform + methanol extract of brain on silicic acid column. Peak 6, extract partitioned with water and material in water phase chromatographed.

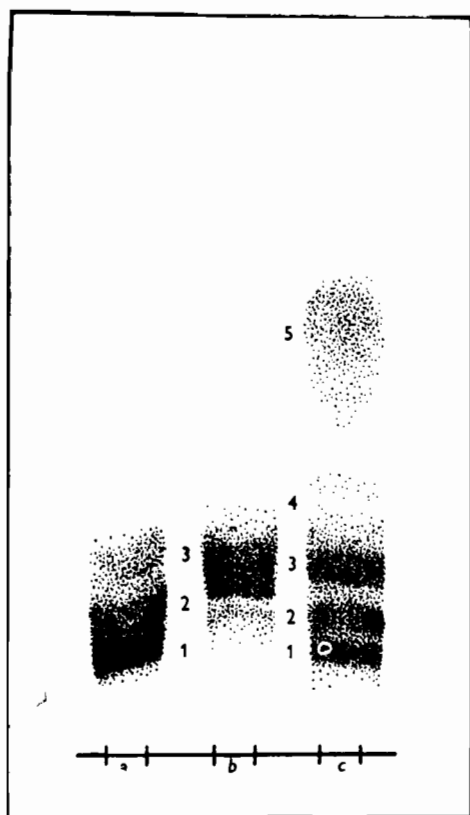
Fig. 3

Les fractions obtenues par chromatographie sur colonne se montrent, en général, hétérogènes lorsqu'on les soumet aux méthodes de fractionnement de type analytique.

B. — Méthodes analytiques.

a) *Chromatographie sur papier :*

Van HEYNINGEN et MILLER (27) ont décrit une technique de chromatographie ascendante sur papier utilisant comme solvant un mélange di-isobutylcétone, acide acétique, eau (40 : 30 : 7) et comme colorant le crésyl violet. On obtient au maximum 3 constituants à partir de diverses fractions purifiées de gangliosides (Figure 4 — (27) —).



Paper chromatograms of « slow » (a), « fast » (b), and partially purified (c), preparations of ganglioside. Developed by ascending technique in di-isobutyl ketone, acetic acid, water and stained with cresyl violet. Spots 1 and 2 metachromatic (pink-mauve) 3, 4 and 5 non-metachromatic (blue-mauve).

Fig. 4

b) *Chromatographie en couche mince :*

La chromatographie en couche mince sur gel de silice convient parfaitement à la séparation des lipides conjugués.

Le solvant utilisé a toujours la même composition qualitative (chloroforme-méthanol-ammoniac-eau), mais, en changeant les proportions de ses constituants, on peut réaliser différents types de séparations.

C'est ainsi que, dans certaines conditions, on peut fractionner l'ensemble des lipides du cerveau, les gangliosides qui représentent les molécules les plus hydrophiles restant fixés au départ (Figure 5 — (28) —).

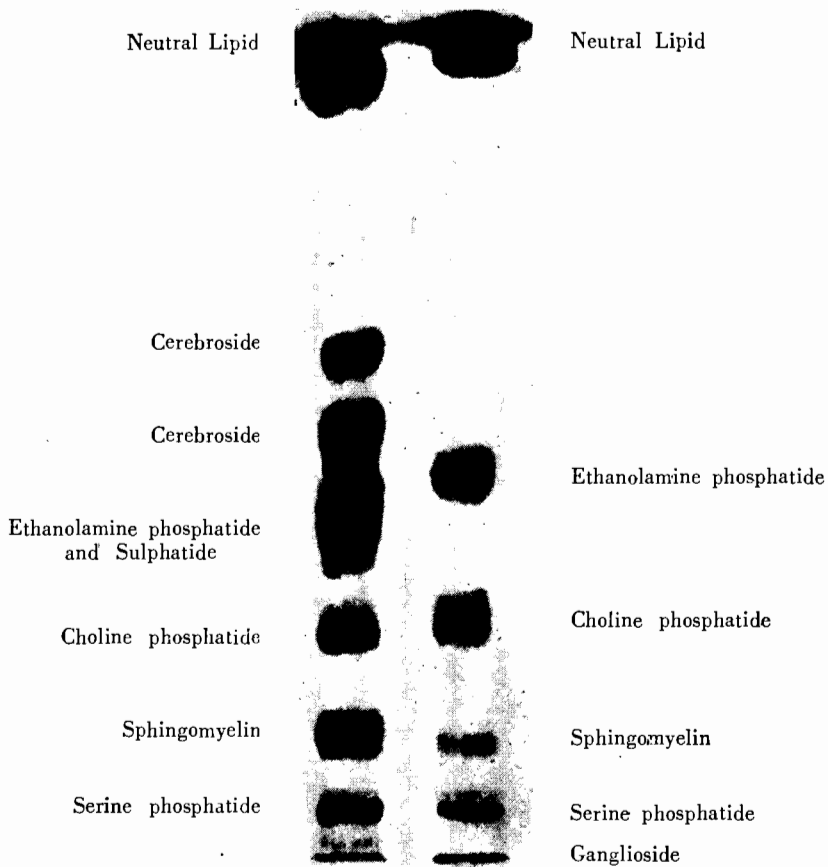
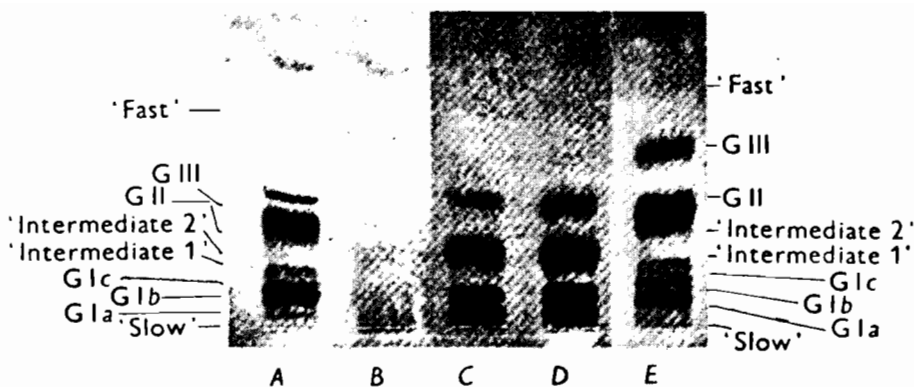


Fig. 5

Thin-layer chromatography of lipid extract of grey and white matter in a basic solvent system. Solvent : chloroform-methanol-35 % aqueous ammonia (14 : 6 : 1, by vol.) Detection : Molybdate-perchloric acid. Samples : The lipids corresponding to 6 mg of fresh beef tissue : white matter on the left, grey matter on the right.

La fraction gangliosidique elle-même peut être résolue en de nombreux constituants après modification de la composition quantitative du solvant (Figure 6 — (29) —).



Resorcinol-reacting components of ox grey matter compared with those of purified ganglioside : *A*, of the total crude lipid extract ; *B*, of the « lower phase » (Folch *et al.* 1957) ; *C*, of the dialysed « upper phase » ; *D*, 100 μ g. of a purified preparation of ganglioside containing 0.1 % of P and 28.2 % of *N*-acetylneuraminic acid ; *E*, 100 μ g. of a purified preparation of ganglioside containing 0.1 % of P and 28.2 % of *N*-acetylneuraminic acid. Both ganglioside preparations were ninhydrin-negative. Components of the patterns are indicated but in *C*, *D* and *E* the « slow » band is missing, as is indicated in the text.

Fig. 6

STRUCTURES

I. — EXEMPLES DE STRUCTURES

Nous nous en tiendrons à trois exemples empruntés aux travaux de KLENK et coll. déjà cités.

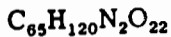
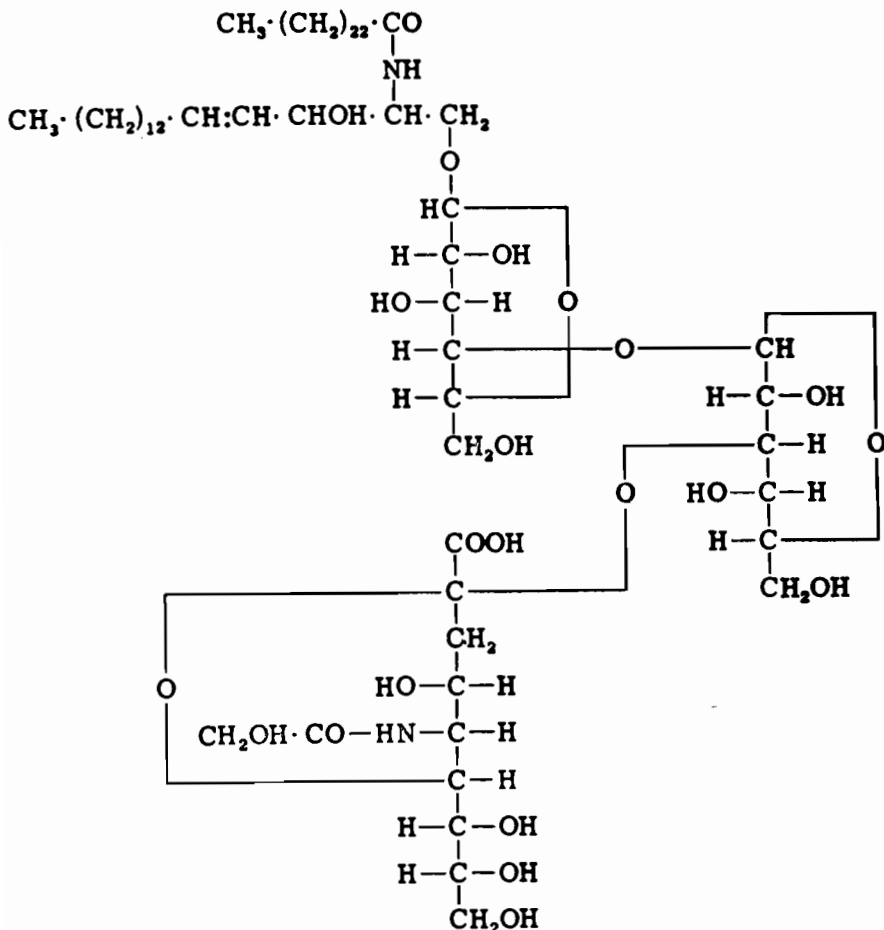
1) Ganglioside d'érythrocytes de cheval :
Il comporte la séquence :

— acide lignocérique-sphingosine-glucose-galactose-acide-N-glycoylneuraminique (Figure 7 — (30) —).

2) Gangliosides du cerveau humain :

Le premier ganglioside du cerveau humain dont la structure a été connue possède la séquence :

— acide stéarique-sphingosine-glucose-galactose-N-acétyl-galactosamine- α . N-acétylneuraminique. C'est le ganglioside I de KLENK représenté au tableau.



Ganglioside from horse erythrocytes.

Fig. 7

Le ganglioside II (Figure 8 — (2) —) se distingue du précédent par le fait que l'ose aminé de la copule glucidique est remplacé par l'ose simple correspondant et que la chaîne glucidique est branchée.

Ainsi, les différences de comportement vis-à-vis des méthodes de fractionnement (chromatographie en couche mince) pourraient s'expliquer par des différences de constitution des gangliosides aussi bien quantitatives (nombre de restes d'hexoses, d'hexosamines ou d'a. sialique présents dans la molécule) que qualitatives (nature de l'acide gras estérifiant la sphingosine et du substituant de la fonction amine de l'a. neuraminique).

préalablement à tout fractionnement car ils possèdent des réactions spécifiques :

— Réaction de Bial à l'orcinoï chlorhydrique telle qu'elle a été utilisée par BALAKRISHNAN et Mc ILWAIN (32) ;

— Réaction de Svennerholm au résorcinoï (33).

Les oses simples et aminés, libérés par une hydrolyse de 2 heures dans l'HCl 2N, sont dosés par révélation, au moyen de diverses réactions colorées, des chromatogrammes sur papier (solvant de chromatographie : pyridine-acétate d'éthyle-eau (12 : 5 : 4) —) (25).

b) Analyse de la copule hydrophobe.

Les constituants de la copule lipidique sont analysés après hydrolyse à reflux pendant 6 heures dans le méthanol chlorhydrique à 10 % (34).

Les esters méthyliques d'acides gras ainsi obtenus sont extraits par l'éther de pétrole et séparés par chromatographie en phase gazeuse.

Quant à la sphingosine et ses dérivés, ils sont extraits des hydrolysats par l'éther éthylique, puis débarrassés des esters méthyliques d'a. gras qui pourraient les contaminer par passage sur une colonne d'acide silicique (35) avant d'être soumis eux-mêmes à la chromatographie en phase gazeuse ou à la chromatographie en couche mince (36). Des données complémentaires sur la nature des dérivés de la sphingosine susceptibles de se trouver dans les gangliosides sont fournies par deux méthodes (37) :

1) Oxydation périodique :

Il y a scission des molécules au niveau de la fonction alcool secondaire et formation d'aldéhydes que l'on sépare par chromatographie en phase gazeuse.

2) Oxydation permanganique :

Elle permet la localisation de la double liaison : par rupture de celle-ci, il y a formation d'acides gras dont les esters méthyliques sont soumis à la chromatographie en phase gazeuse.

2^e temps : DETERMINATION DE L'ORDRE D'ENCHAINEMENT DES CONSTITUANTS :

a) méthodes chimiques.

1. — Hydrolyses partielles :

BOGOCH (38) a mis au point une technique d'hydrolyse par étapes permettant de suivre la libération progressive des différents constituants des gangliosides. On réalise successivement, sur une solution aqueuse de gangliosides, les conditions de plus en plus drastiques suivantes :

— Autohydrolyse (en l'absence d'acide) à 100° pendant 18 minutes suivie d'une dialyse ;

— Hydrolyse du résidu non dialysable par HCl 0,09N à 100° pendant 50 minutes ;

— Hydrolyse du second résidu de dialyse par HCl 6N à 100° pendant 5 minutes.

2. — *Perméthylation* :

KLENK et GIELEN (39) ont décrit une technique de méthylation des gangliosides par l'iodure de méthyle et l'oxyde d'argent dans la diméthylformamide. On identifie les sucres méthylés après hydrolyse.

3. — *Oxydation périodique* :

Cette réaction classique des α -glycols a été également utilisée par les auteurs précédents (30).

4. — *Réduction par le borohydrure* :

KANFER et BRADY (40) ont utilisé le borohydrure de sodium dans le tétrahydrofurane pour savoir si l'acide sialique était lié au reste de la molécule par son groupement semi-acétalique : en effet, dans ce cas, l'acide sialique est protégé de l'action réductrice du borohydrure par l'existence d'une liaison osidique avec le reste de la molécule de ganglioside.

b) **méthodes enzymatiques.**

Les gangliosides contenant plus d'un reste d'acide sialique par molécule perdent ces restes supplémentaires sous l'action d'un enzyme d'hydrolyse fourni par la bactérie *Vibrio cholerae* : la neuraminidase ou sialidase (41).

c) **méthodes immunochimiques.**

Grâce à la fabrication d'anticorps spécifiques des gangliosides et des asialogangliosides (c'est-à-dire des gangliosides privés de l'acide sialique par une hydrolyse douce (42) (43) —) et en utilisant une technique d'inhibition de la formation du complexe antigène-anticorps par les constituants des gangliosides fonctionnant comme haptènes, on a pu obtenir une première série de résultats très prometteurs sur l'enchaînement des restes d'oses dans la copule glucidique (44).

III. — **RESULTATS ACTUELS DES DETERMINATIONS DE STRUCTURE**

A. — *COMPOSITION GLOBALE DES GANGLIOSIDES* :

a) **Copule lipidique** (37).

-- *sphingosine et dérivés* :

Dans les gangliosides du cerveau humain la sphingosine (en C18) et son homologue supérieur : la C₂₀-sphingosine existent approximativement dans les mêmes proportions.

A côté, on trouve un peu de dihydrosphingosine et de C₂₀-dihydrosphingosine (Tableau II — (37) —).

TABLE 2 GLC ANALYSIS OF THE SPHINGOSINE BASES OF
GANGLIOSIDES AS ALDEHYDES*

Ganglioside Source	Unidenti- fied †	Sphingo- sine ‡	Dihydro- sphingosine	C ₂₀ - Sphingosine
Human brain (mostly grey matter)	13	41	3	43
Calf brain	15	48	3	34

* Expressed as percentage of total aldehydes.

† This includes "dehydrosphingosine" and the other unidentified peak.

‡ Figures represent the sum of sphingosine and 3-O-methylsphingosine peaks.

Tableau II

Les bases en C₂₀ n'ont jamais été rencontrées en dehors des gangliosides (Tableau III — (37) —).

TABLE 3 DISTRIBUTION OF C₂₀-SPHINGOSINE IN VARIOUS LIPIDS

Lipid Fraction	Tissue	Species	C ₂₀ -Sphingosine	Reference
1. Gangliosides	Brain	Human*	Present	This work
»	»	Human (Tay-Sachs)	»	» »
»	»	Calf	»	» »
»	»	Rabbit	»	» »
»	»	Dog	»	» »
»	»	Rat	»	» »
« Mucolipid »	Brain	Ox	Present	(9)
2. Sphingolipids (non-ganglioside)	Brain	Human*		This work
»	»	Human (Tay-Sachs)	»	» »
»	»	Calf	»	» »
»	»	Rabbit	»	» »
»	»	Dog	»	» »
»	»	Rat	»	» »
»	Lung	Bovine	Absent	(31)
«Sphingolipid »	Brain	Human	Absent	(29)
3. Cerebrosides	Spinal cord	Bovine	»	(21)
»	Epidermoid carcinoma	Human	Absent	(30)
4. Cytolipin H	Plasma	Human**	Absent	(21)
5. Phosphatides	»	Intestinal musoca	Bovine	» »
»	»	Brain	Bovine	» »
»	»	Soy bean	Soy bean	» »
6. Sphingomyelin	Plasma	Human***	Absent	(21)
7. Cerebrin	Yeast	<i>Torulopsis utilis</i>	Absent	(32)

* Normal.

** Four normals.

*** Normal, atherosclerotic, and Niemann-Pick disease, all female.

Tableau III

C'est pourquoi, on a proposé pour les bases en C₂₀ les noms de ganglios_sphingosine et de dihydrogangliosphingosine.

— *acides gras* :

Les gangliosides ne contiennent que des acides gras à chaîne saturée : pour les gangliosides du cerveau, surtout a. stéarique et un peu d'a. arachidique (Tableau IV — (37) —) ; pour les gangliosides d'érythrocytes, a. lignocérique (Figure 7 — (30) —).

FATTY ACID COMPOSITION OF GANGLIOSIDES					
Ganglioside Source	NANA	P	Ganglioside Fatty Acids		
			Palmitic	Stearic	Arachidic
	%	%	%	%	%
Human brain (mostly grey matter)					
I	30.9	0.13	1.0	89.2	9.8
Ia*	26.6†	0.05	0.9	88.8	10.3
Ib†	21.0‡	0.03	1.9	85.9	12.2
II	30.0	0.12	1.4	88.1	10.5
Human brain (Tay-Sachs)	19.6	0.38	1.7	93.1	5.2
Calf brain	29.2	0.08	2.5	95.2	2.3
Rabbit brain	33.1	0.08	1.3	92.0	6.7
Dog brain	31.3	0.14	1.6	91.7	6.7
Rat brain	29.6	0.20	2.0	88.8	9.2

* Pyridine eluate from alumina column.
† Some NANA is cleaved from the ganglioside by the alumina column.
‡ Methanol eluate from alumina column.

Tableau IV

CARBOHYDRATE COMPOSITION OF FOUR HUMAN BRAIN GANGLIOSIDES								
	Gangliosides							
	FM		1-G		3-G		4-G	
	Theor.	Detd.	Theor.	Detd.	Theor.	Detd.	Theor.	Detd.
<i>Composition* (%)</i>								
N-Acetylneuraminic acid	22.3	22.2	20.0	19.9	33.7	28.8	43.5	42.6
Hexosamine	12.9	10.9	11.6	12.0	9.7	9.9	8.4	7.9
Hexose	26.0	25.0	35.0	34.4	29.4	23.8	25.4	24.5
<i>Molar ratios**</i>								
N-Acetylneuraminic acid	1	1.0	1	1.0	2	2.0	3	3.0
Hexosamine	2	0.85	1	1.1	1	1.2	1	0.96
Hexose	1	1.9	3	3.1	3	2.8	3	3.0
Galactose/glucose ratio	1	1.1	2	1.9	2	1.9	2	1.7

* The theoretical per cent composition was calculated on molecules containing a C18 sphingosine, stearic acid and the number of carbohydrate residues indicated in the theoretical molar ratios.
** The theoretical ratios are the lowest whole integers indicated from the per cent composition. The determined ratios were calculated relative to the moles of N-acetylneuraminic acid.

Tableau V

b) Copule glucidique.

Les variations de composition en constituants glucidiques sont très importantes d'un ganglioside à l'autre comme le montre le tableau V (45).

Le nombre de restes d'acide sialique présents dans la molécule de ganglioside est une caractéristique très importante de ces composés et sert de base à leur classification en mono-, di- et tri-sialogangliosides qui possèdent des propriétés différentes, tant sur le plan physico-chimique que sur le plan physio-pathologique, comme nous le verrons ultérieurement. Par ailleurs, selon KOENIG (46), la constitution des gangliosides peut varier avec la nature de l'organe où ils sont présents : c'est ainsi que les gangliosides de la rate, du foie et du rein contien-

Thin-layer chromatography of the ganglioside preparation in the solvent system: chloroform-methanol-water-aq. ammonia (sp.gr. 0.88) (70 : 30 : 4 : 1, by vol.). (a) Untreated and (b) after hydrolysis with 0.05N-HCl at 80° for 30 min. Gangliosides were detected with Bial's orcinol reagent. Details are given in the text. The fraction numbers apply to ganglioside fractions eluted from chromatograms of the untreated material (see Table 2).

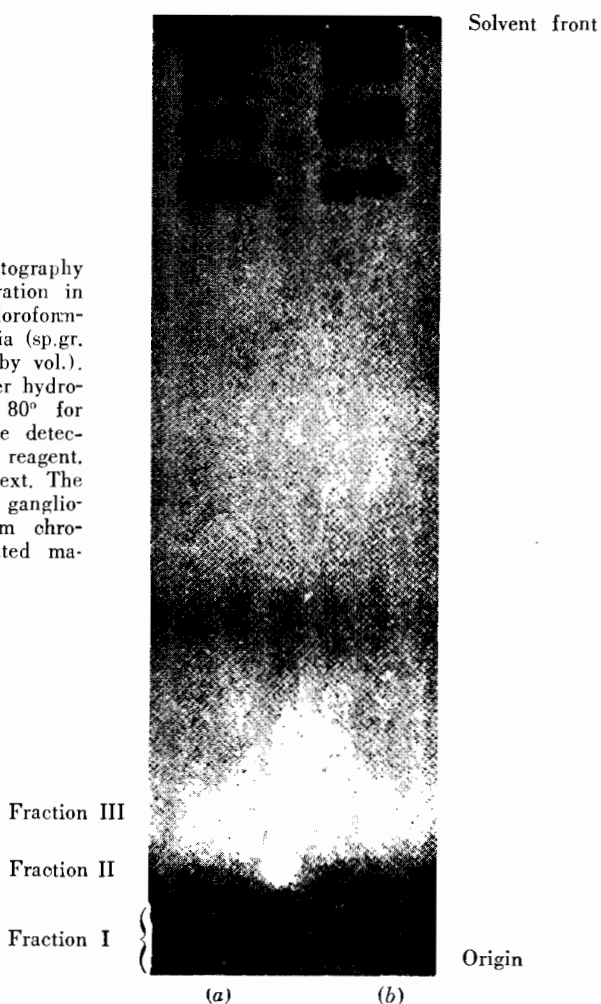


Fig. 9

draient beaucoup moins d'acide sialique que les gangliosides du cerveau. Nous avons, d'autre part, donné précédemment la structure du ganglioside d'érythrocytes de cheval (Cf. Figure 7) qui contient un ose de moins que les gangliosides de cerveau. Les di- et tri-sialogangliosides peuvent être transformés en mono-sialogangliosides par hydrolyse acide douce (HCl 0,05N à 80° pendant 30 minutes) — Cf. Figure 9 (20) — ou action de la neuraminidase de *Vibrio cholerae* — Cf. Figure 10 (27).



Fig. 10

Paper chromatogram of « slow » ganglioside after treatment with neuraminidase (a) compared with partially purified ganglioside (b). Components 1 and 2 metachromatic, 3 non-metachromatic.

B. — ORDRE D'ENCHAINEMENT DES CONSTITUANTS DE LA MOLECULE DE GANGLIOSIDE :

En dehors des schémas proposés par KLENK (Cf. Figures 7 et 8), très peu de données sur la structure complète des gangliosides sont actuellement disponibles.

Parmi les méthodes les plus récemment mises en œuvre pouvant apporter des lumières sur ce problème se trouvent la méthode immuno-chimique qui permettra, par exemple, de faire un choix entre les deux schémas de la Figure 11 (44) suivant le résultat des expériences d'inhibition de la formation des complexes antigène-anticorps par les haptènes appropriés, ou les recherches sur les mécanismes de la biosynthèse des gangliosides qui commencent à se développer (voir plus loin).

sphingosine - glucose - galactose - galactose - *N* - acetylgalactosamine
fatty acid

Scheme I.

sphingosine - glucose - galactose - *N* - acetylgalactosamine - galactose
fatty acid

Scheme II.

Fig. 11

C. -- COMPARAISON GANGLIOSIDES-CEREBROSIDES :

On retrouve dans la structure des gangliosides le motif structural des cérébrosides (a. gras-sphingosine-ose) avec toutefois de légères différences qualitatives : l'a. gras des cérébrosides est généralement en C24 (a. lignocérique et dérivés), alors que, chez les gangliosides, l'a. gras majoritaire est en C18 (a. stéarique) ; l'ose lié à la sphingosine est généralement le galactose chez les cérébrosides et le glucose chez les gangliosides.

Entre les cérébrosides et les gangliosides qui sont des cérébropolyosides à a. sialique, on trouve tous les intermédiaires possibles.

Ainsi KLENK et RENNKAMP (16) ont isolé de la rate un cérébrosidose constitué d'acide lignocérique, de sphingosine et de deux oses (galactose et glucose). Par ailleurs, on a trouvé, dans les lipides des stromas des globules rouges, des cérébrosides à plusieurs oses qui ont été appelés globosides (17, 18).

Plus récemment, on a isolé du cerveau d'un sujet mort de la maladie de TAY-SACHS, un glycolipide ne contenant pas d'acide sialique et dont la composition figure sur le Tableau VI (47).

**Relative Molar Composition of Glycolipid Isolated
from Tay-Sachs Brain**

Component	Moles
Sphingosine	1.0
Fatty acid	1.0
Hexose [†]	3.0
Hexosamine	0.95
Sialic acid	0
Phosphate	0
Total N	2.15

[†] Calculated as galactose.

Tableau VI

Ce glycolipide est vraisemblablement lié métaboliquement aux gangliosides normaux.

PROPRIÉTÉS DES GANGLIOSIDES

I. — PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

A) SOLUBILITE :

La structure des gangliosides est caractérisée par la coexistence dans la même molécule de deux éléments d'affinité opposée vis-à-vis des solvants : la copule lipidique et la copule glucidique.

Les gangliosides ne sont pas directement extractibles de leur milieu naturel (cerveau) par les solvants aqueux (à une exception près dont il sera fait état plus loin). Il est vraisemblable de penser qu'ils forment *in situ* des associations avec d'autres lipides grâce à leur pôle hydrophobe. Par contre, après extraction par le mélange chloroforme-méthanol qui doit rompre les liaisons hydrophobes, les gangliosides sont solubles dans l'eau.

Les poids moléculaires dans l'eau s'échelonnent entre 250.000 et 450.000, la taille des micelles dépendant en partie de la constitution chimique du ganglioside. Les valeurs de $S_{20,w}$ correspondantes sont supérieures à 10 (Figure 13 — (20) —).

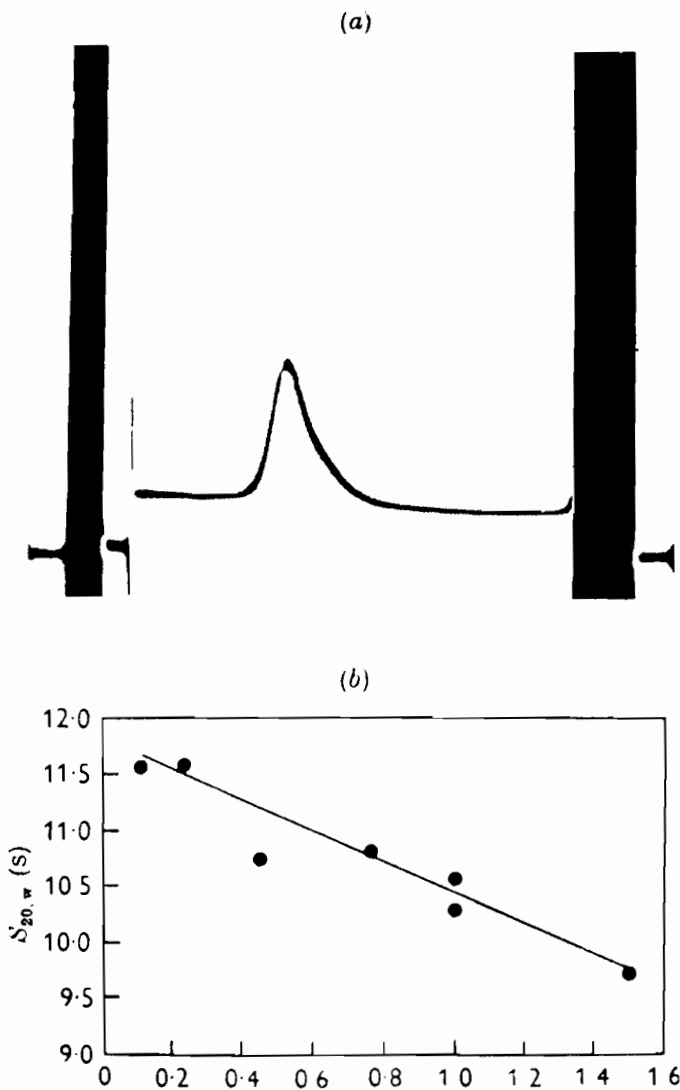


Fig. 13

(a) Sedimentation pattern for 1% (w/v) solution of the ganglioside preparation in water. The rotational speed was 42040 rev./min. The temperature was $21.5 \pm 0.1^\circ$.
 (b) Values of $S_{20,w}$ for the ganglioside preparation plotted against concentration. Details are given in the text.

C) FIXATION DE SUBSTANCES BASIQUES DIVERSES :

Les gangliosides peuvent fixer des composés basiques de PM très différents grâce au carboxyle libre du reste d'acide sialique.

a) **Fixation de petites molécules :**

Les gangliosides fixent différents colorants basiques : bleu de toluidine (48), crésyl violet (27) en présentant le phénomène de métachromasie, c'est-à-dire en modifiant la teinte du colorant. Van HEYNINGEN et MILLER (27) ont montré que seules les fractions lentes en chromatographie sur papier était douée de métachromasie. Ces fractions correspondent vraisemblablement aux di- et tri-sialogangliosides. La fraction rapide, par contre, constituée par les mono-sialogangliosides, fixe le colorant sans changer sa couleur (Cf. Figure 4).

b) **Fixation de macromolécules :**

Les protéines basiques (histones, protamines) sont également fixées par les gangliosides et cette propriété a été utilisée par Mc ILWAIN et coll. pour tenter d'élucider le rôle biologique des gangliosides (voir plus loin).

Enfin, les gangliosides sont capables de fixer différentes substances neurotoxiques de PM très variés (toxine tétanique, strychnine). Ces recherches dues à Van HEYNINGEN et coll. seront également exposées dans le paragraphe consacré au rôle physiologique des gangliosides.

II. — PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

La taille importante des micelles formées par les gangliosides en milieu aqueux favorise sans doute grandement leur aptitude à fonctionner comme antigènes lorsqu'ils sont introduits dans un organisme étranger. Cette propriété semble d'ailleurs se manifester avec les sphingolipides en général qui ont tous une structure amphipathique (49).

C'est à BOGOCH (50) que l'on doit la mise en évidence du phénomène en ce qui concerne les gangliosides : par injections intraveineuses répétées de gangliosides de cerveau de bœuf à des lapins, il a obtenu, en effet, la formation d'anticorps spécifiques.

DEFINITION

A ce point de notre exposé, nous sommes en mesure de donner une définition précise des gangliosides qui s'apparentent aux cérébrosides, glycolipides de la famille des sphingolipides.

Les gangliosides sont des glycolipides solubles dans l'eau après extraction des tissus par des solvants organiques (mélange chloroforme-méthanol) ; ils possèdent une structure de cérébropolyosides contenant au moins un reste d'acide sialique dans leur molécule.

Pour simplifier notre exposé, nous avons volontairement omis d'employer le terme synonyme de strandine (de l'anglais « strand » = brin d'une corde, allusion à l'allure du résidu d'extraction des gangliosides isolés par FOLCH et coll. — (51 —) qui est concurremment utilisé dans la littérature.

MÉTABOLISME

I. — BIOSYNTHESE

Avant d'envisager la biosynthèse complète des gangliosides, rappelons brièvement quelques aspects de la biosynthèse des différents constituants de ces molécules complexes (3).

A. — BIOSYNTHESE DES CONSTITUANTS :

a) Sucres aminés.

L'amination des sucres s'opère vraisemblablement par transamination entre la glutamine et un hexose phosphate.

Ex. : fructose-6-phosphate + glutamine \rightarrow glucosamine-6-phosphate + acide glutamique.

L'acylation de la fonction amine peut ensuite être réalisée par intervention de l'acétyl coenzyme A :

glucosamine-6-phosphate + acétyl-CoA \rightarrow N-acétylglucosamine-6-phosphate + CoA.

b) Acide sialique.

L'acide N-acétylneuraminique prendrait naissance dans la réaction d'aldolisation :

N-acétylmannosamine + pyruvate \rightarrow acide N-acétylneuraminique

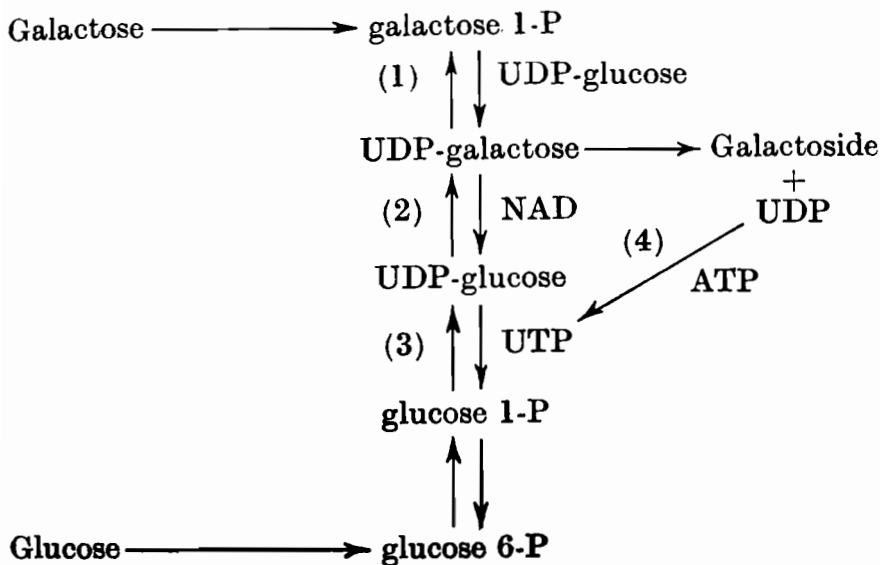
L'enzyme responsable (a. N-acétylneuraminique aldolase) a été purifiée à partir de *Clostridium perfringens* et d'*Escherichia coli*.

c) Interconversions glucose-galactose.

Le cerveau étant riche en galactolipides (gangliosides, cérébrosides, sulfatides), on s'est demandé s'il existait une corrélation entre la synthèse des galactolipides et l'apport exogène de galactose, en particulier pendant la période de développement du cerveau.

ZIEGLER (52) a attiré l'attention sur le parallélisme se manifestant entre le contenu de lactose du lait et le degré de développement du cerveau chez différentes espèces.

Les interconversions glucose-galactose ont été représentées sur la Figure 14 (53).



Pathways for synthesis of galactolipid.

Fig. 14

On constate que, si le donneur effectif de galactose est l'UDP-galactose, les deux voies qui précèdent la formation de ce composé nécessitent la présence d'UDP-glucose qui apparaît donc comme seul élément théoriquement indispensable. Il restait à s'assurer que, sur le plan quantitatif, l'apport de galactose n'était pas obligatoire, même pendant la période critique du développement du cerveau chez l'animal très jeune. C'est ce que VARMA et coll. (53) ont pu montrer récemment, d'une part, en travaillant sur des chatons nouveaux-nés soumis à un régime privé de galactose, d'autre part, en analysant les galactolipides du cerveau de sujets humains atteints de galactosémie héréditaire (maladie se traduisant par l'incapacité absolue de métaboliser le galactose).

d) Sphingosine.

La biosynthèse de la sphingosine s'opère schématiquement selon les 3 étapes suivantes :

- 1) palmitylCoA + TPNH + H⁺ \longrightarrow aldéhyde palmitique + CoA + TPN⁺
- 2) aldéhyde palmitique + sérine \longrightarrow dihydrosphingosine + CO²
- 3) dihydrosphingosine + flavine \longrightarrow sphingosine + flavine (2H).

B. — BIOSYNTHESE DES GANGLIOSIDES :

L'une des premières étapes de la biosynthèse des gangliosides est probablement la formation d'un glucocérebroside. On peut penser que ce dernier prend naissance par les mêmes voies que les galactocérebrosides

pour lesquels l'acylation directe de la sphingosine selon : sphingosine + acylCoA \rightarrow céramide + CoA — semble moins sûre que l'acylation indirecte de l'oside résultant de la condensation de la sphingosine avec le galactose (psychosine) :

- 1) sphingosine + UDP-galactose \rightarrow psychosine + UDP
- 2) psychosine + acylCoA \rightarrow cérébroside + CoA.

Le problème le plus délicat est ensuite de savoir si les oses s'accrochent les uns après les autres sur la molécule de gulcocérébroside ou bien s'il se forme un oligosaccharide qui s'unirait tel quel au glucocérébroside. Selon certains auteurs (54, 55), l'apparition d'une sorte de trisaccharide : a. N-acétylneuraminique-héxosamine-hexose précéderait la synthèse du ganglioside. Pour développer ce type de recherches, la méthode de choix est l'étude de l'incorporation de sucres marqués : des expériences ont été faites in vivo (56, 57) et in vitro (58). Un travail très récent concernant l'incorporation d'acide N-acétylneuraminique (NANA) marqué, apporte quelques lumières sur les étapes terminales de la biosynthèse des monosialogangliosides (59).

L'agent actif de l'incorporation semble être le CMP-NANA et le schéma le plus plausible des dernières étapes de la biosynthèse d'un monosialoganglioside est représenté sur la Figure 15 (59).

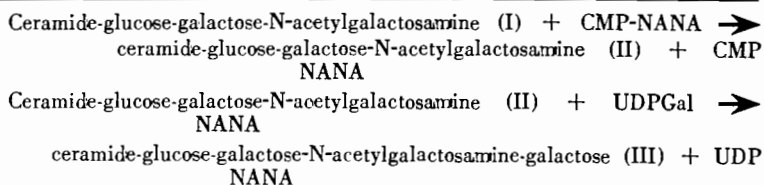


Fig. 15

L'aminoglycolipide (I) stimule plus efficacement l'incorporation du NANA que l'asialoganglioside correspondant à (III) moins NANA. On est donc amené à penser que le produit de la réaction de transfert du NANA est le composé (II), ganglioside incomplet rencontré dans la maladie de TAY-SACHS et rappelant le ganglioside d'érythrocyte de cheval (Cf. Figure 7). Dans le cerveau normal, ce composé servirait de substrat à un autre enzyme qui serait chargé d'y fixer, en position terminale de la chaîne glucidique, un reste de galactose (activé sous forme d'UDP-galactose) pour former le monosialoganglioside (III).

II. — DEGRADATION

KOREY et STEIN (60), expérimentant sur le cerveau de rat, ont décrit un système enzymatique qui est capable de dégrader les gangliosides en leurs constituants et qu'ils ont dénommé de ce fait gangliosidase.

Ce système n'atteint son activité optimum qu'après une préincubation de l'homogénat de cerveau en atmosphère d'azote, ce qui laisse supposer qu'à l'origine, les enzymes qui le constituent sont très fortement liés à des structures cellulaires.

Dans les préparations témoins, ne renfermant aucune surcharge en gangliosides, on n'observe aucune diminution de la quantité de gangliosides du tissu nerveux, bien qu'un renouvellement des constituants de ces molécules se manifeste. Dans les conditions normales, le système gangliosidasiq ue a peut-être pour seul rôle de permettre ce renouvellement.

Par contre, lorsqu'on supplémente les homogénats de cerveau de rat avec des gangliosides divers (de cerveau de bœuf, de cerveau humain normal ou provenant de sujets ayant succombé à la maladie de TAY-SACHS), on constate la libération dans le milieu des divers constituants de ces substances. Bien plus, on observe, dans ce cas, une dégradation massive des gangliosides du cerveau de rat. Tout se passe comme si les gangliosides ajoutés ou l'un des produits de leur décomposition agissaient sur les structures cellulaires qui renferment les gangliosides en rendant ces derniers plus accessibles à l'action des enzymes.

Parmi les gangliosides essayés, ceux de type TAY-SACHS sont dégradés beaucoup plus rapidement que les autres, ce qui constitue une réaction analytique intéressante permettant de les reconnaître. On ne sait pas encore si le phénomène est dû à une plus grande affinité pour ces produits des enzymes du cerveau de rat ou bien si leur structure particulière les rend plus fragiles à l'hydrolyse.

Les essais pour isoler quantitativement les produits qui prennent naissance dans l'hydrolyse des gangliosides sont rendus très difficiles à cause de l'existence de nombreuses réactions latérales.

LOCALISATION CELLULAIRE

BOGOCH (50) avait utilisé les propriétés antigéniques des gangliosides pour aborder l'étude de leur localisation : en effet, grâce à l'anti-sérum obtenu à partir des gangliosides et en employant la technique des anticorps fluorescents de COONS et KAPLAN (61), il montra que les gangliosides du cerveau de bœuf étaient localisés au niveau des corps cellulaires des neurones, c'est-à-dire de la substance grise.

On a poussé plus loin les recherches sur la localisation des gangliosides en cherchant à connaître les structures cellulaires qui les contenaient spécifiquement. Deux méthodes ont été utilisées dans ce but :

I. — CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

Cette méthode a été réalisée selon deux variantes : centrifugation différentielle proprement dite ou centrifugation différentielle envisagée comme premier stade de l'opération et suivie d'un sous-fractionnement des précipités obtenus dans un gradient de densité de saccharose (62).

Le Tableau VII (62) donne la répartition des gangliosides (exprimés en acide N-acétylneuraminique) dans les différentes fractions fournies par une technique de centrifugation différentielle simple et par la méthode à deux stades de centrifugation.

Distribution of gangliosides in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex

Fractions were prepared by Method 1 as outlined in the Methods section. The ganglioside contents are expressed as $\mu\text{g.}$ of *N*-acetylneuraminic acid in the dialysed, aqueous-partitioned CHCl_3 -methanol extracts of the fractions.

Fraction	Centrifugal force		<i>N</i> -Acetylneuraminic acid	
	g	min.	($\mu\text{g.}/\text{g.}$ fresh wt. of tissue)	% of total
R1	800	10	52	11.4
R2	5,000	10	16	3.5
R3	20,000	10	82	17.8
R4	105,400	95	309	67.3
S1	—	—	0	0
			Total	459 (1.48 μmoles)

Distribution of gangliosides in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex

The primary fractions were prepared by Method 2 as outlined in the Methods section. Other details were as described in Fig. 3.

Fraction	Centrifugal force		<i>N</i> -Acetylneuraminic acid	
	g	min.	($\mu\text{g.}/\text{g.}$ fresh wt. of tissue)	% of total
P1	800	10	40	9.0
P2	22,500	20	268	60.9
P3	105,400	95	139	31.1
S2	—	—	0	0
			Total	447 (1.45 μmoles)

Tableau VII

Les gangliosides se retrouvent ainsi dans les fractions microsomales et post-microsomales. Au microscope électronique, ces fractions se montrent très riches en fragments de membranes cellulaires, particulièrement de dendrites (63).

Au cours de cette étude, WOLFE a déterminé l'influence de différents agents sur la distribution des gangliosides dans les divers résidus de centrifugation : il a ainsi constaté que l'addition au milieu de protéines basiques (protamines, histones) empêchait totalement l'extraction des gangliosides par le mélange chloroforme-méthanol. Par ailleurs, on observe que ce sont les fractions sub-cellulaires les plus riches en gangliosides qui fixent la plus grande quantité de protéines basiques.

WHERRETT et Mc ILWAIN (64) ont complété le travail précédent en montrant que les divers constituants chimiques de la fraction microsomale : acides ribonucléiques, protéines, phospholipides, gangliosides, n'étaient pas également répartis dans les différents éléments de cette fraction hétérogène, constituée comme l'ont montré HANZON et TOSCHI (65, 66), dans le cas de la cellule nerveuse, par des granules d'acide ribonucléique (ribosomes) et des fragments de membranes.

Au cours des dix traitements différents essayés, on a pu dissocier chaque fois le comportement de ces quatre types de constituants chimiques :

En centrifugation différentielle pure, les gangliosides ont besoin d'une force centrifuge moins élevée que l'acide ribonucléique pour laisser déposer une quantité donnée de matériel ; les protéines et les phospholipides ont un comportement intermédiaire.

Par centrifugation dans un gradient de saccharose, les granules d'acide ribonucléique se rassemblent principalement au-dessous de la concentration 1,2M, tandis que les structures provenant des membranes se distribuent d'une façon continue entre les concentrations 0,9M et 1,5M (cette répartition très lâche s'explique par le fait que ces débris qui proviennent soit de la membrane cellulaire, soit du réticulum endoplasmique, peuvent avoir toutes les tailles possibles, alors que les granules d'acide ribonucléique sont des organites bien définis).

Les agents tensioactifs tels que le désoxycholate de sodium et le lubrol (produit de condensation de l'alcool cétylique et de polyoxyéthylène), qui ont la propriété de dissocier les structures constitutives de la membrane (65), permettent la solubilisation d'une grande partie des gangliosides et des phospholipides. Par contre, l'EDTA, qui laisse les membranes pratiquement intactes, mais disperse les granules, libère beaucoup moins de gangliosides que d'acide ribonucléique.

Après action des ultra-sons, les gangliosides sédimentent beaucoup plus difficilement, alors qu'on observe peu de changements pour l'acide ribonucléique : ceci se conçoit aisément si l'on considère que les granules sont beaucoup moins fragiles que les fragments de membrane.

Ainsi, les gangliosides pourraient être utilisés comme des marqueurs chimiques pour les membranes, tout comme l'acide ribonucléique l'est pour les ribosomes. L'acétylcholinestérase avait déjà été proposé (65) comme marqueur de nature enzymatique. Un autre constituant important des membranes semble être l'adénosinetriphosphatase (67).

II. — UTILISATION DES COLORANTS HISTOLOGIQUES

KOENIG (46), par une technique totalement différente, a pu mettre en évidence un autre type de localisation des gangliosides. Utilisant la méthode de l'acide periodique-Schiff sur des cellules fixées au formol, il a vu apparaître de fins granules fortement colorés dans le cytoplasme des cellules nerveuses de différentes espèces (homme, singe, chien, chat, rat) : Figure 16 (46).

Par ailleurs, ces granules fixent les colorants basiques en donnant le phénomène de métachromasie. Enfin, ils sont détruits par une brève immersion du tissu frais dans le mélange chloroforme-méthanol, solvant de choix des gangliosides. Par contre, dans les tissus fixés, ils résistent à l'action des solvants organiques, ce qui suggère une liaison gangliosides-protéines au sein de ces granules. Ces caractères tinctoriaux et de solubilité ont pu être retrouvés sur une préparation purifiée de gangliosides traitée par une solution aqueuse de protamine et étendue en film sur des lames de verre. Enfin, KOENIG a identifié des granules présentant les mêmes propriétés dans le foie, la rate, le rein et l'intestin.



Motoneurone of cat spinal cord stained by the periodic acid-Schiff method.
Frozen section, calcium-formalin fixation, $\times 1,150$.

Fig. 16



Motoneurone of cat spinal cord stained for acid phosphatase by Gomori's method.
Frozen section, calcium-formalin fixation, $\times 1,150$.

Fig. 17

Quelques années auparavant, DE DUVE et coll. (68, 69) avaient décrit, sous le nom de lysosomes, de petits organites cytoplasmiques qui contenaient une phosphatase acide, une désoxyribonucléase et d'autres enzymes hydrolytiques. Or, si l'on traite des neurones par la méthode de Gomori, spécifique de la phosphatase acide, on voit apparaître dans le cytoplasme des granulations colorées ressemblant de façon frappante à celles obtenues précédemment avec les colorants des gangliosides : Figure 17.

On a, par ailleurs, montré par centrifugation que la phosphatase acide et l'acide N-acétylneuraminique constitutif des gangliosides se concentraient dans la même fraction.

Enfin, KOENIG a pu, par une technique de photomicrographie, en opérant sur des neurones fixés au formol, réaliser successivement les colorations de Gomori et de l'acide periodique-Schiff et constater que c'était bien les mêmes organites cellulaires qui se coloraient dans les deux cas.

ROLE PHYSIOLOGIQUE

On a découvert jusqu'ici deux grandes fonctions possibles aux gangliosides. Elles correspondent aux deux types de localisations décrites précédemment :

- 1) localisation au niveau de la membrane cellulaire ;
- 2) localisation dans les lysosomes.

I. — ROLE DES GANGLIOSIDES DES PAROIS CELLULAIRES

A) *ROLE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX :*

Nous exposerons deux types de recherches mettant en évidence l'importance du rôle des gangliosides dans le fonctionnement du système nerveux.

a) **Théorie de Mc ILWAIN sur le rôle des gangliosides dans la restauration de l'état ionique des cellules nerveuses après l'excitation (31, 32 et 70 à 82) :**

1) *Rappel de physiologie nerveuse.*

Quand du tissu cérébral de mammifère est incubé en présence d'oxygène, dans un milieu équilibré en sels et contenant du glucose, on observe une différence constante de concentration des ions Na^+ et K^+ entre l'intérieur de la cellule et le milieu extérieur, comme cela se passe *in vivo* : il y a toujours, dans la cellule au repos, un excès de potassium par rapport au sodium. Le tissu isolé peut être excité électriquement (72, 73) et l'on observe alors une perte de potassium d'environ $0,7 \text{ m}\mu \text{ Eq}$ par gramme de tissu et par stimulus et un gain concomitant de sodium (70). On note, par ailleurs, une diminution de la phosphocréatine, une augmentation de la respiration et de la glycolyse. Lors de l'excitation, il se produit un brusque échange d'ions avec le

milieu extérieur, ce phénomène étant lié à une dépolarisation de la membrane où interviennent l'acétylcholine et différentes protéines actives (la protéine de réserve, la protéine réceptrice et l'enzyme acétylcholinestérase — Cf. théorie de NACHMANHSON dont on trouvera un résumé par ailleurs*

Dès que la stimulation cesse, le sodium est excrété par un mécanisme actif faisant intervenir des liaisons phosphates riches en énergie, tandis que, par compensation, le potassium vient le remplacer à l'intérieur de la cellule ; la phosphocréatine est resynthétisée ; progressivement, la respiration et la glycolyse retrouvent leurs valeurs normales.

En l'absence de glucose, la stimulation produit toujours une perte de potassium mais la réassimilation de ce dernier par la cellule nerveuse ne se fait pas (79).

Ainsi, l'énergie fournie par la glycolyse et emmagasinée sous forme de liaisons phosphates riches en énergie permet d'accomplir un travail osmotique consistant dans l'extrusion active de sodium. Le mécanisme intime du phénomène était resté toutefois jusqu'ici fort obscur.

2) *Arguments expérimentaux de Mc ILWAIN.*

Le point de départ de la théorie a été l'observation que le tissu cérébral devient très peu excitable après avoir été conservé pendant quelques heures en milieu liquide à une température voisine de 0° (80). La raison en est la migration des histones du noyau vers la membrane. Le phénomène a pu être reproduit en ajoutant des histones ou d'autres protéines basiques au tissu normal (74). Les protéines basiques n'empêchent pas la perte de potassium des tissus lors de l'application d'un stimulus, mais elles interdisent sa réassimilation (79).

La deuxième étape consistait à trouver les constituants cellulaires auxquels devaient se combiner les protéines basiques pour empêcher la réabsorption du potassium. De tels récepteurs ont été recherchés à la fois dans des extraits tissulaires et dans les humeurs (75, 76). Le plasma sanguin, qui se comportait comme un antagoniste efficace de l'action des protéines basiques, fut fractionné et l'on constata que l'activité des fractions évoluait de pair avec leur teneur en acide N-acétylneuraminique. D'autres composés contenant de l'acide N-acétylneuraminique ont été systématiquement essayés : parmi eux, les gangliosides s'avèrent être, de loin, les antagonistes les plus puissants (75, 77). Les protéines basiques et les gangliosides ajoutés restent attachés au tissu.

Les gangliosides qui, habituellement, sont facilement extraits par le mélange chloroforme-méthanol, sont rendus inextractibles par la présence de protamines dans le milieu.

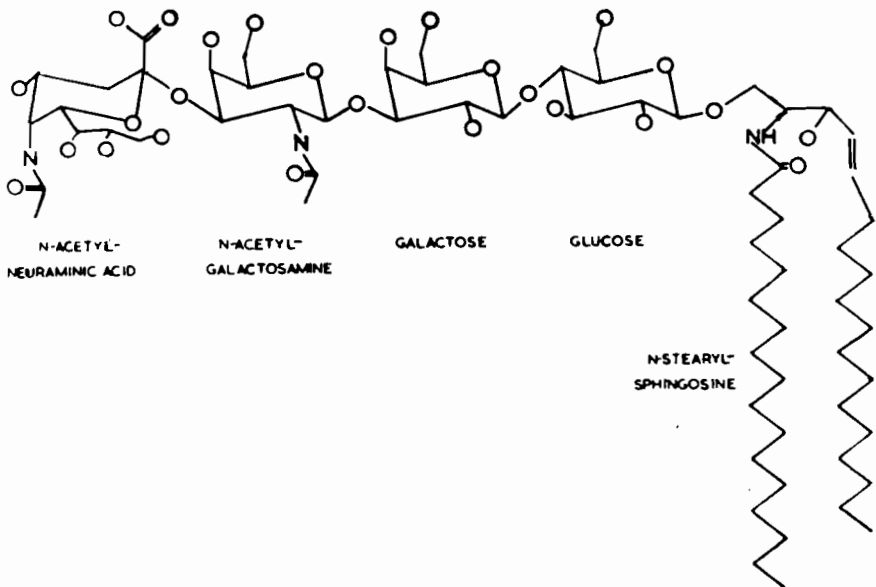
3) *Essais d'interprétation des données expérimentales.*

Il y a peu de temps encore, l'hypothèse la plus communément admise pour le passage des ions à travers les membranes dont on connaissait la nature lipidique consistait à imaginer que les ions se com-

(*) F. MIRANDA et H. ROCHAT, Bull. Soc. Pharm. Marseille 1964, 13,95.

binaient à des substances liposolubles pour donner des formes de transport.

Dans cette perspective, il était difficile de concevoir le rôle des gangliosides. En effet, lorsqu'on considère leur structure développée — Figure 18 (31) — on constate que la copule lipidique n'est pas acide. Par contre, la partie acide de la molécule est très encombrée de groupements hydrophiles, de sorte qu'elle ne pourrait pénétrer dans la phase lipidique de la membrane qu'avec encore plus de difficultés que le cation lui-même. La copule glucidique renferme toutefois deux groupements lipophiles représentés par les radicaux acétamides, mais ils sont disposés de telle façon que lorsqu'ils sont associés à une surface lipidique, ils poussent le carboxyle à se projeter hors de cette surface bien plus qu'à y entrer.



Probable structure of a major ganglioside component (23, 34, 44). N-acetylneuraminic acid yielded, 22 per cent ; components with a 30 per cent content of the acid have been described. Structure is drawn in one of the many possible forms, with lipophilic groups downward.

Fig. 18

L'hypothèse de rechange que l'on a ensuite échafaudée est celle des pores de la membrane qui seraient tapissés de matériel hydrophile permettant aux cations hydratés de s'y frayer un chemin (83, 84). Dans cette hypothèse, les gangliosides se disposeraient sur les parois des pores avec leur partie céramide engagée dans l'intimité de la membrane lipidique tandis que la partie glucidique, fixée à la membrane par les groupes lipophiles acétamides, formerait le chenal hydrophile permettant la circulation des ions.

Les protéines basiques exerceraient leur inhibition en venant se fixer sur les gangliosides disposés à l'ouverture du pore. Il y aurait interruption de la séquence des sites d'absorption acides permettant le cheminement des cations et même remplacement des sites acides par les sites basiques en excès de la protéine. Les gangliosides surajoutés rétabliraient le mouvement des ions en tapissant de nouveau l'embouchure du pore de sites acides.

A cet aspect purement structural du problème s'associe intimement un aspect énergétique, car l'extrusion active du sodium exige une énergie considérable qui est fournie par l'ATP, celui-ci servant directement au transport du sodium ou du moins donnant naissance à une molécule phosphorylée qui serait le véritable porteur. Quoiqu'il en soit, on observe une relation très étroite entre le sodium transporté et l'ATP consommé corrélativement, le rapport des deux concentrations étant très proche de l'unité (85, 86, 87). Cependant, les substances riches en énergie qui transportent les ions sodium existent uniquement dans le corps cellulaire et le fait d'envisager leur migration vers l'extérieur de la cellule pose à priori un problème encore plus complexe que celui qui concernerait les cations eux-mêmes.

On a pu tourner la difficulté en imaginant un système dans lequel l'ester phosphorique de sodium vient déposer le cation à l'extrémité intérieure du pore, l'ion métallique poursuivant alors seul son chemin vers l'extérieur de la cellule.

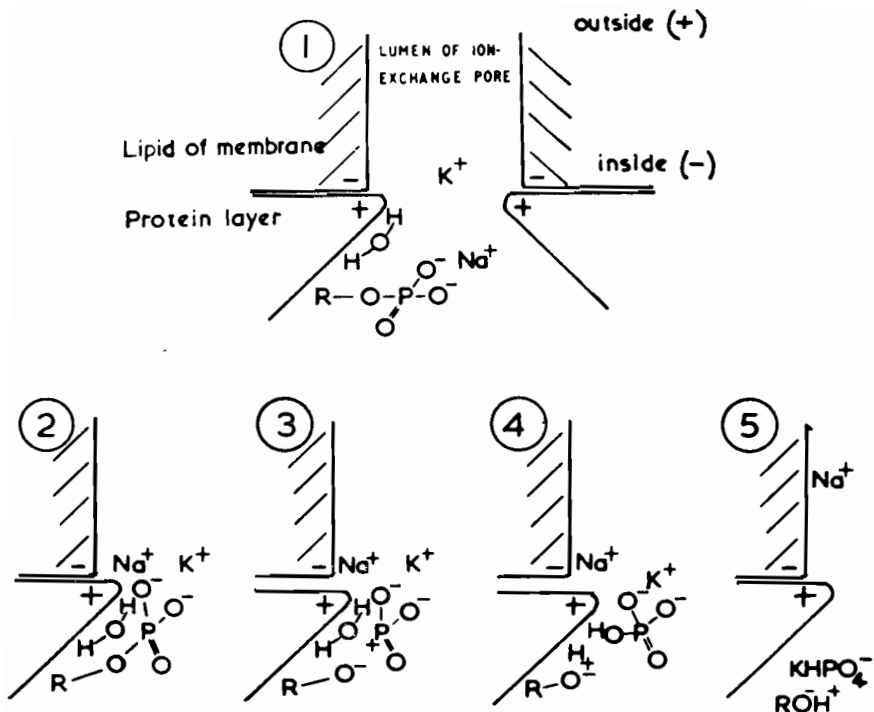
Il faut, enfin, mettre en place un dernier facteur, l'adénosine triphosphatase, qui, en hydrolysant la molécule organique phosphorylée, permet l'extrusion du sodium. On avait remarqué depuis quelque temps déjà que l'enzyme isolé du tissu nerveux n'était actif qu'en présence de sels de sodium (88, 89, 90). Par ailleurs, les expériences de centrifugation différentielle ont montré que l'enzyme se retrouvait dans la même fraction subcellulaire que les gangliosides (91). Dans l'agencement spatial des différents éléments de la « pompe à sodium », l'emplacement le plus adéquat pour l'adénosine triphosphatase se trouverait à la frontière entre la base intérieure du pore et le milieu cellulaire proprement dit, marquant ainsi la limite que ne peuvent franchir les molécules phosphorylées qui transportent le sodium.

À partir de cet ensemble de données, Mc ILWAIN a formulé une hypothèse de travail cohérente qui est représentée sur la figure 19 (31).

Les différents stades de l'opération seraient les suivants :

-- Stade n° 1 :

A la partie inférieure du pore se trouve un groupement acide (appartenant vraisemblablement à une molécule de ganglioside) qui présente une affinité plus grande pour l'ion sodium que pour l'ion potassium mais qui, à l'état de repos, est neutralisé par un groupement basique de la couche protéique sous-jacente (appartenant vraisemblablement à une molécule d'ATPase). La molécule d'ester phosphorique est fixée sur l'enzyme par le radical-R tandis que l'extrémité phosphorique liée au sodium est animée d'un mouvement brownien.



Membrane-sited adenosine triphosphatase : an interpretation in sodium transport (32, 32a, 34).

Fig. 19

— Stade n° 2 :

Sous l'effet de l'agitation moléculaire, il arrive un moment où le sodium vient heurter la base du pore, ce qui amène le déclenchement du mécanisme d'extrusion par fixation du cation sur le site acide de la partie inférieure du pore. Corrélativement, l'une des valences de l'anion phosphate vient saturer la charge positive de l'enzyme (le rôle des molécules d'eau à tous ces stades est vraisemblablement très important).

— Stade n° 3 :

Le substrat solidement fixé à l'enzyme est hydrolysé avec rupture de la liaison P-O.

— Stade n° 4 :

Il y a apparition d'un ion négatif R-O⁻ qui repousse l'anion phosphate.

— Stade n° 5 :

Celui-ci abandonne le pôle basique de l'enzyme qui se recombine au groupe acide de la partie inférieure du pore en déplaçant le sodium vers l'extérieur.

Le potassium, repoussé dans la lumière du pore par le sodium qui a une plus grande affinité que lui pour les sites acides des parois, est pris en charge par l'anion phosphate, libéré par l'hydrolyse enzyma-

tique, qui ne peut franchir la base du pore et entraîne le potassium vers l'intérieur de la cellule.

Une nouvelle molécule de substrat phosphaté s'adsorbe sur l'enzyme. Mais, tant que l'ion sodium ne rencontre pas le site acide de la base du pore, le système reste dans l'état de repos (Stade n° 1).

4) *Relations structure-activité chez les substances capables de restaurer l'excitabilité.*

Très récemment, Mc ILWAIN (92) a publié des données complémentaires sur les caractères généraux que devaient présenter les substances susceptibles de rétablir les mouvements ioniques à travers la membrane des cellules nerveuses inhibées par un séjour à basse température (lequel provoque, nous l'avons vu, la migration des histones du noyau vers la périphérie) ou par addition directe de protéines basiques : naturelles (histones, protamines) ou artificielles (polylysine).

Deux conditions sont indispensables :

— présence de fonctions acides ;

— caractère de polyacide, que ce caractère s'inscrive dans la structure même de la molécule ou qu'il soit obtenu par l'agrégation des molécules.

Signalons tout d'abord que, parmi les diverses substances essayées qui comportent des molécules simples (a. stéarique, a. glutamique,

Quantities of acidic substances restoring excitability to protamine-treated tissues

The concentrations restoring activity are approximate only; they are derived from Fig. 1 and Table 2, and are the concentrations needed to raise respiratory response to 50 % or, in the few instances when this is not reached, to the greatest extent observed. The values of the third column are derived from those of the second column, from the knowledge that, during the experiments quoted, tissues of mean fresh wt. 60 mg. were suspended in 3.5 ml. of fluid. The equivalent weights of the substances concerned are derived as described in the Experimental section.

Preparation	Concentration restoring excitability (mg./ml.)	Amount restoring activity (μ equiv./g. Of fresh tissue)
Ganglioside	0.2	8
Sulphatide	1	60
Phosphatidylserine	0.5	37
Chondroitin sulphate	1	87
Poly-D-glutamic acid	2.5	1000
Poly-L-glutamic acid	1.0	450
Suramin	0.5	122

Tableau VIII

a. N-acétylneuraminique) ou complexes (lipidiques : lécithines, phosphatidyléthanolamines, phosphatidylsérines ; glucidiques : a. chondroïtine-sulfurique ; protidiques : a. polyglutamique ; aromatiques : suramine-a. hexasulfonique polycyclique ; glycolipidiques : gangliosides), ce sont les composés supposés être le support naturel de l'activité, c'est-à-dire les gangliosides qui possèdent le plus grand pouvoir de restauration : Tableau VIII (92).

Ceci est vraisemblablement dû à une adaptation particulière de leur molécule amphipathique à la structure intime de la membrane.

Les substances douées d'activité possèdent les deux caractères indispensables signalés précédemment :

1) *Présence de fonctions acides :*

Nous avons vu, à propos de l'étude de la structure de ces composés que les molécules de gangliosides pouvaient contenir jusqu'à trois restes d'acide sialique (trisialogangliosides). L'activité évolue de pair avec la concentration dans la molécule du constituant acide, mais elle croît beaucoup plus vite que cette dernière. Quant aux gangliosides auxquels on a fait perdre l'a. sialique par hydrolyse ménagée, ils sont totalement dénués d'activité. Les groupements acides actifs peuvent être des groupements carboxyliques ou sulfoniques. La troisième acidité de l'acide phosphorique que l'on retrouve dans des phosphodiester (lécithines, phosphatidyléthanolamine) n'est, par contre, pas suffisante pour promouvoir une réactivation importante. Cependant, un phosphodiester comme la phosphatidylsérine qui, grâce à la sérine, possède un carboxyle libre, présente un pouvoir réactivant normal.

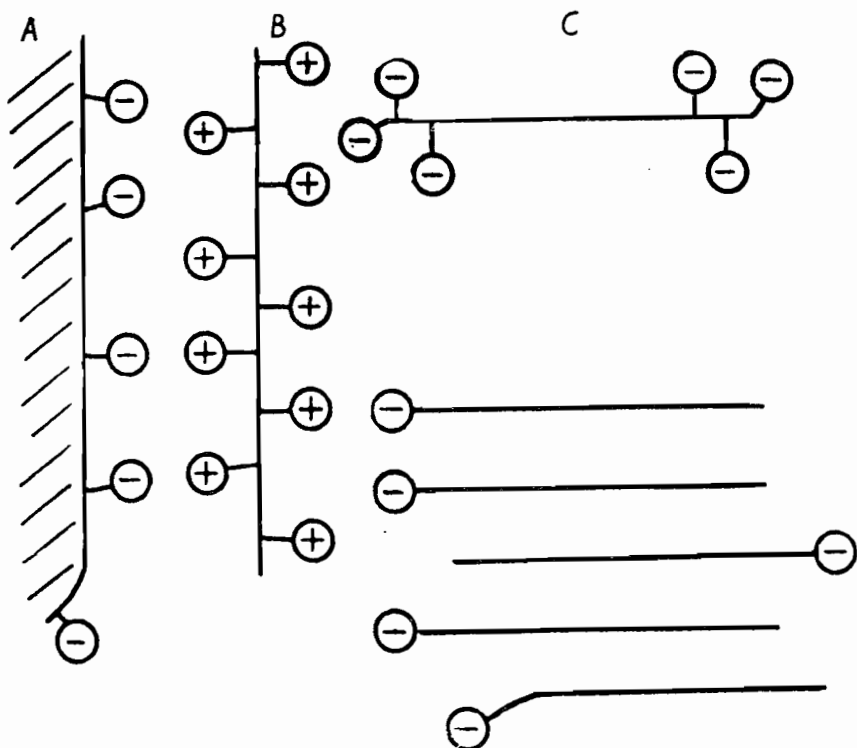
2) *Caractère de polyacide :*

Les molécules de monoacides isolées n'ont aucune action : ainsi l'acide N-acétylneuraminique, seul reste à fonction acide libre des gangliosides et, partant, indispensable à l'activité, est incapable de rétablir l'excitabilité du tissu nerveux lorsqu'il est employé isolément. Il en est de même de l'acide glutamique ou de l'acide stéarique.

Ceci s'explique parfaitement lorsqu'on considère qu'il ne s'agit pas seulement pour les molécules ajoutées de neutraliser les charges positives apportées par les protéines basiques, mais, bien plus, de rétablir, à l'embouchure des pores, l'environnement acide qui existait auparavant. Seuls, les polyacides peuvent réaliser ces conditions (Figure 20 — (92) —).

Le caractère de polyacide peut résulter de la constitution même de la molécule (a. polyglutamiques, a. chondroïtine-sulfuriques, suramine). Il peut être aussi réalisé par agrégation de molécules à une fonction sous forme de micelles, comme c'est le cas des molécules amphipathiques à copule lipidique (phosphatidylsérines, gangliosides) — Cf. Figure 12.

Tous ces mécanismes sont compatibles avec les données histologiques : on sait, en effet, que l'espace compris entre les parois exté-



Hypothetical relationship between acidic groups of tissue components (A), the basic polypeptides (B) which inhibit excitability, and acidic agents (C) which restore excitability. The basic polypeptide is drawn in the fully extended form which it is likely to occupy through mutual repulsion of its basic groups (see Katchalsky, Danon & Nevo, 1959). A polyacidic restoring agent is illustrated above, and an aggregate below.

Fig. 20

rieurs de deux cellules nerveuses adjacentes est de l'ordre de 150-200 A (93, 94) ; or, l'épaisseur des molécules d'inhibiteur et de réactivateur telles qu'elles sont représentées sur la Figure 20 n'excède pas 50-100 A.

b) **Travaux de Van HEYNINGEN sur la fixation par les gangliosides de la toxine tétanique et d'autres substances neurotoxiques** (95 à 97, 27, 41, 26, 98) :

Van HEYNINGEN et ses collaborateurs ont repris l'étude d'un très vieux travail de WASSERMAN et TAKAKI datant de 1898 et qui était pratiquement tombé dans l'oubli (99) : ces auteurs avaient montré que, lorsqu'on mélange une solution contenant quelques doses létales de toxine tétanique à un broyat de cerveau, la toxicité de la solution diminuait, surtout si on prenait la précaution de la filtrer avant de l'injecter aux animaux ; ils avaient aussi remarqué que la moëlle épinière était moins efficace que le cerveau et que la matière grise était plus active que la matière blanche.

Van HEYNINGEN a commencé par reproduire le phénomène sur le cerveau entier de bœuf et sur un extrait brut de cerveau (95), puis il a mis au point un test chimique d'appréciation de la fixation de la toxine (96) qui lui a permis de suivre la purification du « récepteur » et d'aboutir ainsi à l'identification des gangliosides (97).

Van HEYNINGEN et coll. ont ensuite étudié en détail la fixation de la toxine tétanique sur les gangliosides tant sur le plan qualitatif que quantitatif :

Ils ont tout d'abord envisagé deux types d'expériences simples montrant de façon péremptoire l'existence de complexes gangliosides-toxines : il s'agit de l'électrophorèse en veine libre et de l'ultracentrifugation réalisées toutes deux dans des appareils munis du dispositif optique « schlieren » qui fournit directement la courbe représentant la variation de l'indice de réfraction en fonction de l'abscisse (Figure 21 — (27) —).

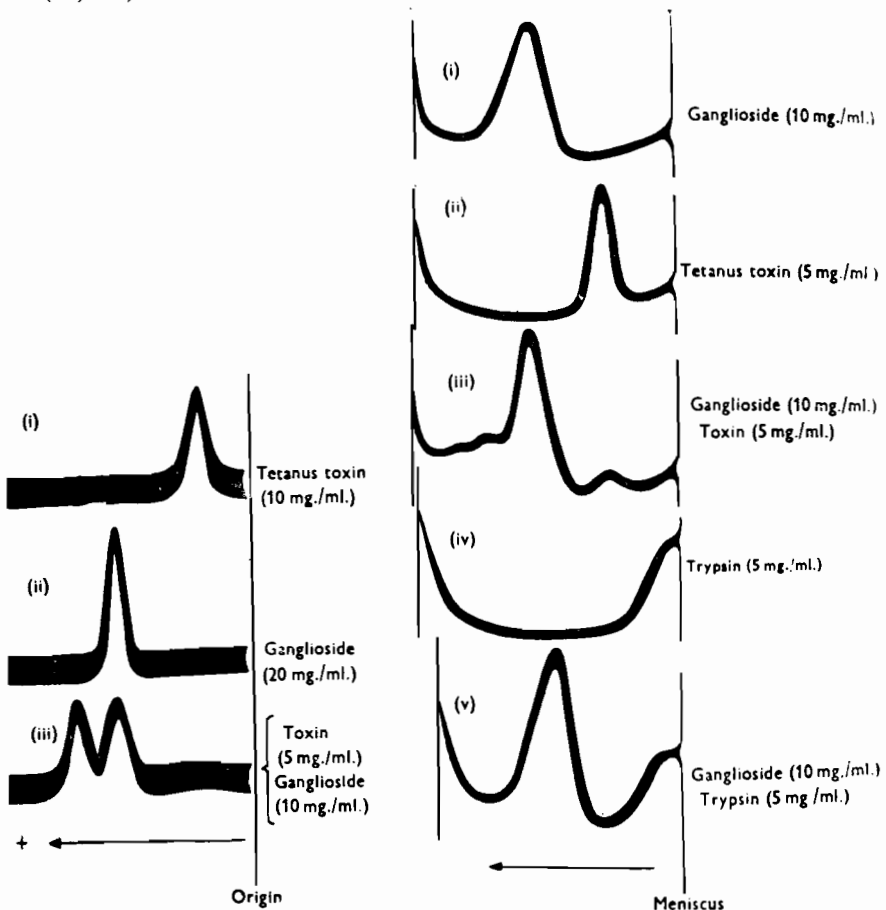


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 1. Fixation of tetanus toxin by ganglioside demonstrated by boundary electrophoresis. — Fig. 2. Fixation of tetanus toxin, and non-fixation of trypsin, demonstrated in the analytical ultracentrifuge.

Fig. 21

Ils ont ensuite montré la haute spécificité de ce complexe, tant du côté toxine que du côté ganglioside.

C'est ainsi que d'autres toxines bactériennes (diphthérique, staphylococcique) ne sont nullement fixées par les gangliosides, contrairement à ce qu'avaient pu penser certains auteurs qui confondaient dénaturation et fixation*. Il en est de même pour d'autres protéines, enzymatiques (pepsine, trypsine, lysozyme) ou banales (albumine) qui sont très peu adsorbées, surtout dans un milieu de force ionique élevée (alors que la fixation de la toxine tétanique est indépendante de la force ionique du milieu). L'anatoxine tétanique, quoique beaucoup moins fixée que la toxine native, l'est encore suffisamment pour pouvoir peut-être expliquer l'action protectrice d'une injection massive d'anatoxine 24 heures avant l'administration d'une dose létale de toxine native (100, 101, 102).

La spécificité est tout aussi stricte du côté du récepteur : c'est ainsi que les gangliosides autres que ceux du cerveau normal ne fixent pas la toxine tétanique, par exemple le ganglioside sans hexosamine des érythrocytes de cheval (Cf. Figure 7). L'incapacité de s'unir à la toxine n'est d'ailleurs peut-être pas due à l'absence d'hexosamine chez ces molécules mais plutôt à la substitution du radical N-glycolyl au radical N-acétyl au niveau du reste d'acide sialique. En effet, des glycolipides de la rate, du rein et du poumon contenant des quantités variables d'hexosamine et d'acide sialique (à substituant N-glycolyl-) étaient également sans action. Fait encore plus curieux, un ganglioside cérébral mais d'origine pathologique (Tay-Sachs), bien que possédant des proportions normales d'acide sialique (à substituant N-acétyl-) et d'hexosamine — il s'agit d'un composé appelé « Gatt 6 » (26) — n'a plus aucun pouvoir d'adsorption. A fortiori, un ganglioside privé d'acide sialique par hydrolyse acide perd totalement son activité ainsi qu'un ganglioside dont les groupements carboxyliques de l'acide sialique ont été méthylés par le diazométhane.

Inversement, la molécule isolée d'acide sialique ne se fixe pas sur la toxine, pas plus que l'acide colomique, haut polymère d'acide N-acétylneuraminique. D'autres composés glucidiques à structure plus voisine de celles des gangliosides tel un mucoïde ovin à acide sialique et des endotoxines de nature liposaccharidique ne possèdent pas non plus le moindre caractère complexant. Enfin, des oligosaccharides du lait dont certains présentent la même structure que la copule glucidique des gangliosides sont totalement inopérants.

Sur le plan quantitatif, Van HEYNINGEN et coll. ont montré que, d'une façon générale, les gangliosides pouvaient fixer des quantités de toxine tétanique qui sont de l'ordre de leur propre poids. En gros, l'importance de la fixation est proportionnelle au nombre de restes d'acide sialique dans la molécule de ganglioside. Mais d'autres facteurs jouent également un rôle : c'est ainsi que deux gangliosides contenant respectivement deux et trois restes d'acide sialique ont été trouvés

* Van HEYNINGEN (97) a, par contre, clairement établi la distinction entre les deux phénomènes en montrant que le complexe toxine tétanique-gangliosides pouvait être actif par injection, probablement grâce à une dissociation partielle.

posséder sensiblement la même capacité énorme de fixation de 20 mg de toxine par mg.

L'association toxine-ganglioside ne rappelle en rien le complexe enzyme-substrat car le ganglioside n'est absolument pas modifié après la fixation de la toxine : la meilleure preuve en est qu'un ganglioside débarrassé de la toxine tétanique par la soude diluée est capable de fixer de nouveau la toxine dans les mêmes conditions qu'un ganglioside « neuf ».

Par ailleurs, des substances présentant une action pharmacodynamique voisine de celle de la toxine tétanique, mais de structure très différente, peuvent se fixer sur les gangliosides, ce qui tendrait à montrer que le phénomène de fixation est en rapport avec le rôle physiologique des gangliosides. Depuis longtemps, on a admis que la strychnine et la toxine tétanique avaient un mode d'action très voisin (103) : toutes deux agiraient en supprimant l'inhibition synaptique. La brucine et la thébaine auraient un comportement analogue. Le Tableau IX (26) montre que les quantités de ces substances fixées par les gangliosides sont relativement importantes lorsqu'on les exprime en molarité.

Fixation of convulsant drugs by ganglioside

	Moles fixed/ mole ganglioside*
Tetanus toxin	0.08
Strychnine	0.28
Brucine	0.24
Thebaine	0.32
Morphine	0.11

* Assuming a molecular weight of 1384 for ganglioside.

Tableau IX

D'autre part, la nature du transmetteur de l'inhibition synaptique, si tant est qu'il existe, est encore inconnue. Parmi les transmetteurs possibles, on a avancé le nom de la sérotonine. Il se trouve effectivement que ce composé et plusieurs de ses analogues sont très nettement fixés par les gangliosides (Tableau X — (26) —).

Fixation of serotonin and related drugs by ganglioside

	Moles fixed/ mole ganglioside*
Serotonin	0.15
Tryptamine	0.18
LSD-25	0.37
Ergometrine	0.21
Reserpine	0
Chlorpromazine	0.76

* Assuming a molecular weight of 1384 for ganglioside.

Tableau X

Enfin, Van HEYNINGEN et WOODMAN (98) ont étudié un phénomène curieux déjà signalé dans la littérature : la non-fixation de la toxine tétanique par le cerveau de grenouille (103). Ils ont montré que ce défaut de fixation n'était pas dû à une absence de gangliosides. Bien mieux, ils ont fait la preuve que les gangliosides isolés ont un pouvoir de fixation du même ordre que celui des gangliosides de mammifères, mais que, contrairement à ces derniers, ils présentent la propriété d'être directement extractibles par les solvants aqueux, ce qui prouve qu'ils existent, dans le tissu nerveux, sous une forme nettement différente de celle des gangliosides de mammifères. Ces considérations amènent les auteurs à se poser le problème de la signification des expériences réalisées sur des gangliosides extraits du cerveau qui peuvent se trouver alors dans un état physico-chimique très différent de celui dans lequel ils exerçaient leur fonction physiologique. Ces travaux sont à rapprocher des expériences de reconstitution *in vitro* des complexes formés *in vivo* par les gangliosides avec des sphingolipides insolubles (26).

D'autres rôles ont été attribués aux gangliosides, mais ils sont beaucoup moins bien connus que les précédents.

B. — *ROLE DANS DES PHENOMENES D'AGGLUTINATION CELLULAIRE* (41) :

C'est vraisemblablement à la présence dans la paroi cellulaire de gangliosides ou de glycolipides apparentés qu'est dû le phénomène d'agglutination *in vitro* des globules rouges par le virus de l'influenza. Ce phénomène est inhibé par l'addition de gangliosides au milieu, mais les relations structure-activité ne sont plus les mêmes que celles rencontrées pour la fixation de la toxine tétanique.

L'acide sialique semble être ici encore un facteur primordial, mais alors que, dans le cas précédent, tous les restes d'acide sialique semblaient jouer en gros le même rôle, on constate que, pour l'hémagglutination, une certaine catégorie de restes est sans action, en général celle qui résiste à l'action de la neuraminidase. Inversement, des molécules à acide sialique autres que les gangliosides et qui ne fixent pas la toxine tétanique sont, par contre, capables d'inhiber l'action du virus de l'influenza.

II. — *ROLE DES GANGLIOSIDES DES LYSOSOMES* (46) :

La présence de gangliosides dans les lysosomes, organites cellulaires riches en enzymes hydrolysants permet d'envisager pour les premiers un type de rôle très différent consistant dans la participation à la régulation des phénomènes d'hydrolyse dans la cellule. Les glycolipides pourraient former des complexes glycolipoprotéiques qui constitueraient avec les hydrolases des formes de stockage inactives : sous des influences diverses, telles celles des facteurs modifiant la structure ou les propriétés physico-chimiques des gangliosides (neuraminidases, protéines basiques), les complexes glycolipoprotéiques pourraient être détruits et les hydrolases libérées.

BIOCHIMIE PATHOLOGIQUE

Certaines maladies nerveuses (leucodystrophies), à évolution presque toujours fatale, se traduisent par des troubles importants du métabolisme, du stockage et de la structure des lipides spécifiques de la substance nerveuse. L'une des mieux connues est la maladie de TAY-SACHS ou idiotie amaurotique qui fut présentée pour la première fois par SACHS en 1896 comme une forme congénitale d'idiotie, généralement mortelle, associée à une cécité précoce. En fait, les aspects ophtalmologiques de la maladie étaient déjà connus, ayant été décrits quinze ans auparavant par TAY. Sur le plan biochimique, la maladie se traduit par l'accumulation des gangliosides dans la substance nerveuse.

Les incidences médicales du problème ont amené un développement considérable des recherches dans ce domaine. A titre d'exemple on peut citer un très remarquable travail d'équipe paru récemment dans une revue de neuropathologie (*Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 1963, 22, fascicule 1) et comportant l'étude coordonnée des aspects cliniques, histologiques (utilisant le microscope électronique) et biochimiques de la maladie.

Sur le plan biochimique, nous avons déjà signalé les anomalies de structure rencontrées chez les gangliosides qui se présentent souvent ici sous une forme incomplète (asialogangliosides, gangliosides comportant un reste d'ose en moins que les gangliosides normaux). Ces phénomènes sont sans doute en relation avec le fait que le système gangliosidase isolé d'un cerveau de sujet atteint de la maladie de TAY-SACHS coupe la chaîne glucidique des gangliosides pathologiques moins vite que celle des gangliosides normaux (104), ce qui représente exactement l'inverse de ce qui se passe pour le cerveau normal (60).

CONCLUSION

Les gangliosides que leur structure amphipathique désignait tout particulièrement comme constituants des membranes cellulaires semblent jouer un rôle éminent dans la physiologie nerveuse au même titre que le système de l'acétylcholine.

Par l'importance fonctionnelle de leur copule glucidique (en particulier du reste d'acide N-acétylneuraminique), ils contribuent à attirer l'attention sur la participation des glucides à la constitution de structures éminemment actives.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 -- M.M. RAPPORT et W.T. NORTON — *Ann. Rev. Biochem.*, 1962, 31, 103.
- 2 -- M. STACEY et S.A. BARKER — *Carbohydrates of living Tissues*, VAN NOSTRAND, Londres, 1962, p. 181.
- 3 -- P. BERNFELD — *Biogenesis of Natural Compounds*, Pergamon Press, Oxford, 1963, 930 pp.
- 4 -- D.J. HANAHAN et G.A. THOMPSON Jr. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1963, 32, 215.
- 5 -- E. ROBERTS et C.F. BAXTER — *Ann. Rev. Biochem.*, 1963, 32, 513.
- 6 -- E. WALZ — *Z. Physiol. Chem.*, 1927, 166, 210.
- 7 -- E. KLENK — *Z. Physiol. Chem.*, 1941, 268, 50.
- 8 -- P.A. LEVENE et K. LANDSTEINER — *J. Biol. Chem.*, 1927, 75, 607.
- 9 -- G. BLIX — *Skand. Arch. Physiol.*, 1938, 80, 46.
- 10 -- E. KLENK — *Z. Physiol. Chem.*, 1935 235, 24.
- 11 -- E. KLENK — *Ber. Ges. Physiol. Exptl. Pharmakol.*, 1937, 96, 659.
- 12 -- E. KLENK — *Z. Physiol. Chem.*, 1939, 262, 128.
- 13 -- E. KLENK — *Z. Physiol. Chem.*, 1940, 267, 128.
- 14 -- E. KLENK et LANGERBEINS — *Z. Physiol. Chem.*, 1941, 270, 185.
- 15 -- E. KLENK — *Z. Physiol. Chem.* 1947, 282, 84.
- 16 -- E. KLENK et F. RENNKAMP — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, 273, 253.
- 17 -- T. YAMAKANA et S. SUZUKI — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1952, 39, 175.
- 18 -- T. YAMAKANA — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1956 43, 867.
- 19 -- E. KLENK — *Amer. J. Dis. Child.*, 1959, 97, 711.
- 20 -- D.B. GAMMACK — *Biochem. J.*, 1963, 88, 373.
- 21 -- J. FOLCH, M. LEES et G.H. SLOANE-STANLEY — *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497.
- 22 -- C. LONG et D.A. STAPLES — *Biochem. J.*, 1959, 73, 385.
- 23 -- D.A. BOOTH — *J. Neurochem*, 1962, 9, 265.
- 24 -- L. SVENNERHOLM — *Acta Chem. Scand.*, 1956, 10, 694.
- 25 -- J.A. DAIN, H. WEICKER, G. SCHMIDT et S.J. THANNHAUSER in S.M. ARONSON et B.W. VOLK : *Cerebral Sphingolipidoses*, Academic Press, New York, 1962, p. 289.
- 26 -- W.E. VAN HEYNINGEN — *J. Gen. Microbiol.*, 1963, 31, 375.
- 27 -- W.E. VAN HEYNINGEN et P.A. MILLER — *J. Gen. Microbiol.*, 1961, 24, 137.
- 28 -- H.G. MULDER, J.R. WHERRETT et J.N. CUMMINGS — *J. Neurochem.*, 1962, 9, 607.
- 29 -- J.R. WHERRETT et J.N. CUMMINGS — *Biochem. J.*, 1963, 86, 378.
- 30 -- E. KLENK, W. GIELEN et G. PADBERG in S.M. ARONSON et M.W. VOLK : *Cerebral Sphingolipidoses*, Academic Press, New York, 1962, p. 301.
- 31 -- H. Mc ILWAIN — *Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis.*, 1962, 40, 43.
- 32 -- S. BALAKRISHNAN et H. ILWAIN — *Biochem. J.*, 1961, 81, 72.
- 33 -- L. SVENNERHOLM — *Biochim. Biophys. Acta.*, 1957, 24, 604.
- 34 -- J.A. DAIN, G. SCHMIDT et S.J. THANNHAUSER, *Fed. Proc.*, 1961, 20, 269 f.
- 35 -- C.C. SWEELEY et E.A. MOSCATELLI — *J. Lipid. Res.*, 1959, 1, 40.
- 36 -- K. SAMBASIVARAO et R.H. Mc CLUER — *J. Lipid. Res.*, 1963, 4, 106.
- 37 -- K. SAMBASIVARAO et R.H. Mc CLUER — *J. Lipid. Res.*, 1964, 5, 102
- 38 -- S. BOGOCH — *Biochem. J.*, 1958, 68, 319.
- 39 -- E. KLENK et W. GIELEN — *Z. Physiol. Chem.*, 1960, 319, 283.

- 40 — J.N. KANFER et R.O. BRADY — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, 11, 267.
- 41 — A.W. BERNHEIMER et W.E. VAN HEYNINGEN — *J. Gen. Microbiol.*, 1961, 24, 121.
- 42 — E.G. TRAMS et C.J. LAUTER — *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 60, 350.
- 43 — M. YOKOYAMA, E.G. TRAMS et R.O. BRADY — *J. Immunol.*, 1963, 90, 372.
- 44 — J.E. SOMERS, J.N. KANFER et R.O. BRADY — *Biochemistry*, 1964, 3, 251
- 45 — G.A. JOHNSON et R.H. Mc CLUER — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 70, 487.
- 46 — H. KOENIG — *Nature*, 1962, 195, 782.
- 47 — S. GATT et E.R. BERMAN — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1961, 4, 9.
- 48 — A.F. HARRIS et A. SAIFER in S.M. ARONSON et B.W. VOLK — *Cerebral Sphingolipidoses*, Academic Press, New York, 1962, p. 271.
- 49 — M.M. RAPPORT in J. FOLCH-PI et H. BAUER — *Brain Lipids and Lipoproteins and the Leucodystrophies*, Elsevier, Amsterdam, 1963, p. 83.
- 50 — S. BOGOCH — *Nature*, 1960, 185, 392.
- 51 — J. FOLCH-PI, S. ARSOVE et J.A. MEATH — *J. Biol. Chem.*, 1951, 191, 819.
- 52 — E. VON ZIEGLER — *Helv. Paediat. Acta*, 1960, 15, 552.
- 53 — S.N. VARMA, V. SCHWARZ et I.M. NAOMI SIMPSON — *Biochem. J.*, 1962, 85, 546.
- 54 — J.N. CUMMINGS, H. GOODWIN et G. CURZON — *J. Neurochem.*, 1959, 4, 234.
- 55 — E.T. PRITCHARD et P.L. CANTIN — *Nature*, 1962, 193, 580.
- 56 — H.M. MOSER et M.L. KARNOVSKY — *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1990.
- 57 — R.M. BURTON, L. GARCIA-BUNUEL, M. GOLDEN et Y. BALFOUR — *Biochemistry*, 1963, 2, 580.
- 58 — S.R. KOREY, J. GONATAS et A. STEIN — *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1963, 22, 56.
- 59 — J.N. KANFER, R.S. BLACKLOW, L. WARREN et R.O. BRADY — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 14, 287.
- 60 — S.R. KOREY et A. STEIN in J. FOLCH-PI et H. BAUER — *Brain Lipids and Lipoproteins, and the Leucodystrophies*, Elsevier, Amsterdam, 1963, p. 71.
- 61 — A.H. COONS et M.H. KAPLAN — *J. Exp. Med.*, 1950, 91, 1.
- 62 — L.S. WOLFE — *Biochem. J.*, 1961, 79, 348.
- 63 — E.G. GRAY — *J. Anct. Lond.*, 1959, 93, 420.
- 64 — J.R. WHERRETT et H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1962, 84, 232.
- 65 — V. HANZON et G. TOSCHI — *Exp. Cell. Res.*, 1959, 16, 256.
- 66 — V. HANZON et G. TOSCHI — *Exp. Cell. Res.*, 1960, 21, 332.
- 67 — D.H. DEUL et H. Mc ILWAIN — *J. Neurochem.*, 1961, 8, 246.
- 68 — C. DE DUVE, B.C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX et F. APPLE-
MENS — *Biochem. J.*, 1955, 60, 604.
- 69 — C. DE DUVE in T. HAYASHI — *Subcellular Particles*, Ronald Press, New York, 1959, p. 128.
- 70 — J.T. CUMMINS et H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1961, 79, 330.
- 71 — H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1951, 49, 382.
- 72 — H. Mc ILWAIN in D. RICHTER — *Metabolism of the Nervous System*, Pergamon Press, New York, 1957, p. 341.
- 73 — H. Mc ILWAIN — *Biochemistry and the Central Nervous System*, J. et A. CHURCHILL, Londres, 1959.
- 74 — H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1959, 73, 514.
- 75 — H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1960, 76, 16P.

- 77 — H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1961, 78, 24.
- 78 — H. Mc ILWAIN — *Ann. Rep. Chem. Soc. London*, 1961, 57, 367.
- 79 — H. Mc ILWAIN, R. WOODMAN et J.T. CUMMINS — *Biochem. J.*, 1961, 81, 79.
- 80 — N. MARKS et H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1959, 73, 401.
- 81 — C.G. THOMSON et H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1961, 79, 342.
- 82 — L.S. WOLFE et H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1961, 78, 24.
- 83 — L.J. MULLINS — *J. Gen. Physiol.*, 1959, 42, 817.
- 84 — L.J. MULLINS — *J. Gen. Physiol.*, 1959, 42, 1013.
- 85 — P.C. CALDWELL, A.L. HODGKIN, R.D. KEYNES et T.I. SHAW — *J. Physiol.*, 1960, 152, 561.
- 86 — R. BROWN et J.F. DANIELLI — *Active Transport and Secretion*, Sympos. Soc. Exper. Biol., 1954, 8.
- 87 — L.E. HOKIN et M.R. HOKIN — *J. Gen. Physiol.*, 1960, 44, 61.
- 88 — H.H. HESS et A. POPE — *Fed. Proc.*, 1957, 16, 196.
- 89 — J.C. SKOU — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 23, 394.
- 90 — J. JARNEFELT — *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 48, 104.
- 91 — L.S. WOLFE — *Biochem. J.*, 1960, 77, 9P.
- 92 — H. Mc ILWAIN — *Biochem. J.*, 1964, 90, 442.
- 93 — E.G. GRAY — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, 6, 121.
- 94 — S.A. LUSE — *Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis.*, 1962, 40, 1.
- 95 — W.E. VAN HEYNINGEN — *J. Gen. Microbiol.*, 1959, 20, 291.
- 96 — W.E. VAN HEYNINGEN — *J. Gen. Microbiol.*, 1959, 20, 301.
- 97 — W.E. VAN HEYNINGEN — *J. Gen. Microbiol.*, 1959, 20, 310.
- 98 — W.E. VAN HEYNINGEN et R.J. WOODMAN — *J. Gen. Microbiol.*, 1963, 31, 389
- 99 — A. WASSERMANN et T. TAKAKI — *Berl. Klin. Wschr.*, 1898, 35, 5.
- 100 — E. LEMETAYER, L. NICOL, D. GIRARD, R. CORVAZIER et M. CHEYROUX — *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, 79, 672.
- 101 — E. LEMETAYER, M. RAYNAUD, L. NICOL et A. TURPIN — *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, 87, 1.
- 102 — M. RAYNAUD, E. LEMETAYER, A. TURPIN, L. NICOL et M. ROUYER — *Compt. Rend.*, 1951, 233, 586.
- 103 — K.E.K. ROWSON — *J. Gen. Microbiol.*, 1961, 25, 315.
- 104 — S.R. KOREY et A. STEIN — *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1963, 22, 67.

SOMMAIRE

	<u>Pages</u>
— INTRODUCTION	35
— HISTORIQUE	36
— PREPARATION	37
I — ISOLEMENT DES GANGLIOSIDES TOTAUX	38
II — FRACTIONNEMENT DES DIFFERENTES ESPECES DE GANGLIOSIDES	39
A — <i>Méthodes préparatives</i>	39
B — <i>Méthodes analytiques</i>	41
a — chromatographie sur papier	41
b — chromatographie en couche mince	41
— STRUCTURES	43
I — EXEMPLES DE STRUCTURES	43
II — METHODES DE DETERMINATION DE LA STRUCTURE	45
1 ^{er} temps : <i>Détermination de la composition globale</i>	45
a — analyse de la copule hydrophile	45
b — analyse de la copule hydrophobe	46
2 ^e temps : <i>Détermination de l'ordre d'enchaînement des constituants</i>	46
a — méthodes chimiques	46
b — méthodes enzymatiques	47
c — méthodes immunochimiques	47
III — RESULTATS ACTUELS DES DETERMINATIONS DE STRUCTURE	47
A — <i>Composition globale des gangliosides</i>	47
a — copule lipidique	47
b — copule glucidique	50
B — <i>Ordre d'enchaînement des constituants de la molécule de ganglioside</i>	52
C — <i>Comparaison gangliosides-cérébrosides</i>	52
— PROPRIETES DES GANGLIOSIDES	53
I — PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	53
A — <i>Solubilité</i>	53
B — <i>Poids moléculaire</i>	54
C — <i>Fixation de substances basiques diverses</i>	55
a — fixation de petites molécules	56
b — fixation de macromolécules	56
II — PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES	56

— DEFINITION	56
— METABOLISME	56
I — BIOSYNTHESE	57
A — <i>Biosynthèse des constituants</i>	57
a — sucres aminés	57
b — acide sialique	57
c — interconversions glucose-galactose	57
d — sphingosine	58
B — <i>Biosynthèse des gangliosides</i>	58
II — DEGRADATION.....	59
— LOCALISATION CELLULAIRE	60
I — CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE	60
II — UTILISATION DES COLORANTS HISTOLOGIQUES	62
— ROLE PHYSIOLOGIQUE	64
I — ROLE DES GANGLIOSIDES DES PAROIS CELLULAIRES	64
A — <i>Rôle dans la physiopathologie du système nerveux</i>	64
a — théorie de Mc ILWAIN sur le rôle des gangliosides dans la restauration de l'état ionique des cellules nerveuses après l'excitation	64
b — travaux de VAN HEYNINGEN sur la fixation par les gangliosides de la toxine tétanique et d'autres substances neurotoxiques	71
B — <i>Rôle dans des phénomènes d'agglutination cellulaire</i>	75
II — ROLE DES GANGLIOSIDES DES LYSOSOMES	75
— BIOCHIMIE PATHOLOGIQUE	76
— CONCLUSION	76
— BIBLIOGRAPHIE	77