

Dynamique des lipides cellulaires

par Nicole Baumann, Benoît Colsch, Mireille Lefèvre, Jacques Portoukalian*

Laboratoire de neurochimie INSERM U 495, Hôpital de la Salpêtrière, 75651 Paris cedex 13;

* Département de dermatologie, INSERM U 346, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon cedex 03

E mail : baumann@ccr.jussieu.fr

Reçu le 15 janvier 2003

RÉSUMÉ

Durant ces dernières années, la notion de microdomaines à la surface des membranes cellulaires a vu le jour. Il s'agit de « lipid rafts » qui impliquent des sphingoglycolipides (SGL) spécifiques et du cholestérol, auxquels sont associées des protéines particulières qui comportent, soit un ancrage lipidique, soit des propriétés qui en font des constituants transmembranaires. Ces complexes ciblent ces protéines à la surface des membranes cellulaires, et les composés lipidiques leur restent en général associés. Ces « rafts » sont également impliqués dans la constitution de récepteurs de surface et dans les phénomènes d'endocytose qui suivent l'action de leurs ligands. Ces « rafts » constituent des structures très compactes, insolubles dans les détergents non ionisés à basse température, ce qui permet leur isolement en tant que complexes. De nombreux « rafts » différents peuvent être isolés en fonction des détergents utilisés; leur

multiplicité peut être liée à l'hétérogénéité des SGL qui pourrait être nécessaire pour le ciblage de protéines spécifiques. Les SGL ont une grande complexité et diversité selon les organes, les tissus, les types cellulaires. Ils sont impliqués dans les phénomènes de polarisation cellulaire. Ils sont modifiés au cours de la différenciation cellulaire, du cancer. Ils peuvent être l'objet d'anticorps dans les neuropathies dysimmunitaires, et impliqués dans des maladies dégénératives du système nerveux, d'origine génétique (neurolipidoses). Les altérations du cholestérol telles qu'on les observe dans la maladie de Niemann Pick de type C et dans la maladie d'Alzheimer ont aussi un retentissement sur le fonctionnement du système nerveux. Ainsi ces microdomaines spécialisés sont impliqués dans la dynamique cellulaire normale et pathologique.

SUMMARY Cellular lipid dynamics

During the past years, the notion of microdomains at the surface of cellular membranes has been developed. These are constituted by lipid rafts which involve sphingoglycolipids and cholesterol. To these rafts are associated proteins which have a lipid anchor or are transmembrane proteins. These lipid rafts target specific proteins at the plasma membrane surface and can remain associated with them. They are present in surface receptors and endocytosis occurs upon binding of the specific ligands. Thus these rafts participate to major aspects of cellular dynamics. These rafts are complex structures, insoluble in non-ionic detergents. According to the detergent used, many types of rafts can be isolated. Any alteration of cholesterol, sphingoglycolipids, or abnormalities of the proteins themselves, can lead to abnormal targeting at the membrane surface. It is possible that specific sphingoglycolipids are necessary

to target specific proteins at the membrane surface. This may explain the complexity of the sphingoglycolipid molecules, both in relation to their oligosaccharide and to their ceramide structures. There is both a cellular and a tissue specificity of these constituents. Complex sphingoglycolipids are involved in cellular differentiation, cellular polarization, and modified in relation to cancer. Virus and bacteria can be linked to the sphingoglycolipids of these microdomains and alter cellular signaling and function. Sphingoglycolipids are involved in autoimmune diseases as antibody targets and in neurolipidoses which are genetic diseases involving their catabolism. The dynamics of the lipid rafts, in relation to cholesterol, can be altered in Niemann-Pick's disease type C and in Alzheimer's disease. Thus these microdomains are involved in many aspects related to normal and pathological cellular dynamics.

INTRODUCTION : LA NOTION DE « LIPID RAFTS »

Pendant longtemps, les membranes cellulaires ont été considérées comme une mosaïque fluide dans laquelle les lipides, phospholipides, cholestérol, sphingoglycolipides (SGL), se mobilisaient librement et au hasard par diffusion latérale (Singer et Nicholson 1972). Durant ces dernières années, la notion de microdomaines à la surface des membranes cellulaires a vu le jour. Il s'agit de « lipid rafts » qui impliquent des SGL spécifiques et du cholestérol (Simons et Ikonen 1997; Alonso et Millàn 2001) auxquels sont associées des protéines particulières qui comportent soit un ancrage lipidique par une fonction GPI (glycosylphosphatidylinositol), soit une acylation, soit des propriétés qui en font des constituants transmembranaires (Fig. 1). Ces complexes ciblent ces protéines à la surface des membranes cellulaires, et leurs composés lipidiques restent en général associés sous forme de microdomaines membranaires spécialisés. Ces « rafts » sont également impliqués dans la constitution de récepteurs de surface et dans les phénomènes d'endocytose qui suivent l'action de leurs ligands (Simons et Ikonen, 1997). Ainsi ces « rafts », s'ils sont abondants à la surface de la membrane plasmique, sont aussi trouvés à l'intérieur de la cellule car ils participent à tous les aspects de la dynamique cellulaire (Fig. 2). Leur étude est l'objet de cette réunion.

Ces « rafts » constituent des structures très compactes, insolubles dans les détergents non ionisés à basse température, ce qui permet leur isolement en tant que com-

plexes. De nombreux « rafts » peuvent être isolés en fonction des détergents utilisés; leur multiplicité peut être liée à l'hétérogénéité des SGL (Alonso et Millàn 2001).

Cependant chaque constituant a une grande importance et est nécessaire pour le ciblage de protéines de surface associées aux « rafts ». Toute anomalie de ces complexes, qu'il s'agisse des lipides ou des protéines qui leur sont associées, peut entraîner un mauvais ciblage. Il existe une véritable interaction entre lipides et protéines à l'intérieur du « raft » (Sprong *et al.*, 2001a). Ainsi, le cholestérol est nécessaire à la localisation en « cluster » de la sous-unité $\alpha 7$ du récepteur muscarinique à la surface de neurones cholinergiques (Brusès *et al.*, 2001). Ces agrégats lipidiques sont nécessaires à l'organisation moléculaire de la synapse. Comme le présentera Marie Vanier dans son exposé sur la maladie de Niemann-Pick C, les anomalies de la dynamique du cholestérol qui sont observées dans cette affection ont un retentissement sur le trafic et la concentration cellulaire des SGL. A titre d'exemple, l'absence de SGL, telle qu'on l'observe dans la lignée de mélanome de souris GM95, peut entraîner un mauvais ciblage de la tyrosinase, protéine nécessaire à la synthèse de la mélanine. Celle-ci restant dans le Golgi, au lieu d'être localisée dans le mélanosome, demeure inactive et bloque la synthèse de ce pigment (Sprong *et al.*, 2001b). Des anomalies de protéines auxquels les complexes lipidiques sont associés peuvent également entraîner des perturbations de leur expression à la surface membranaire. Ainsi un excès de synthèse du protéolipide de la myéline PLP donne lieu à

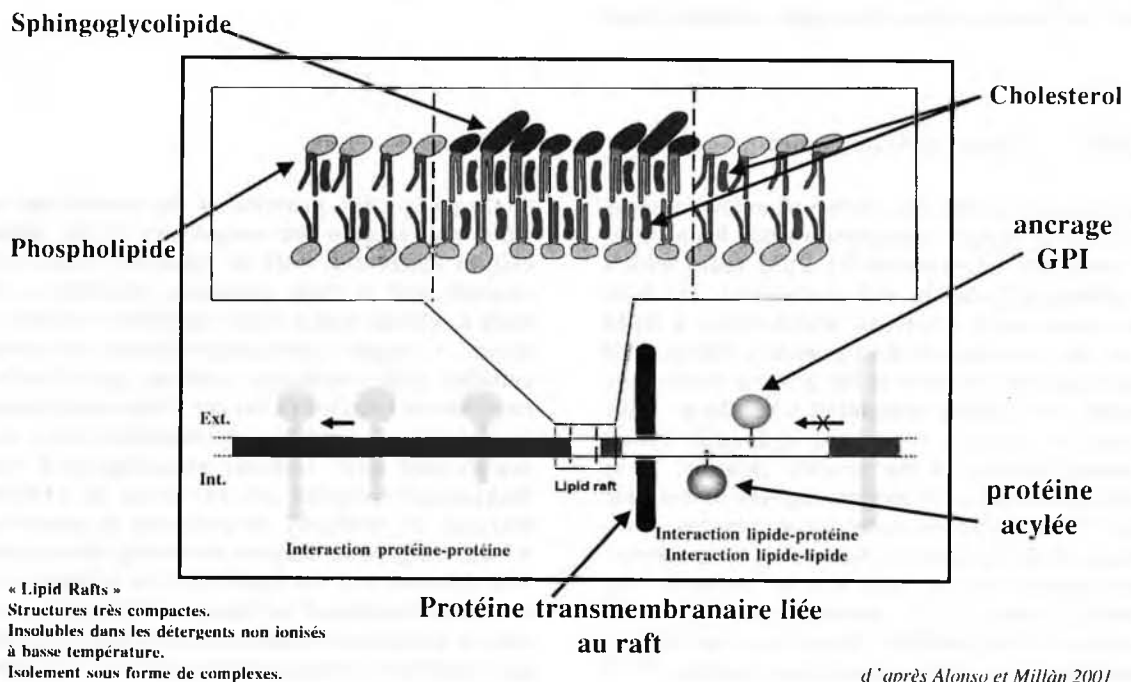


FIG. 1 – Structure d'un « Lipid Raft ».

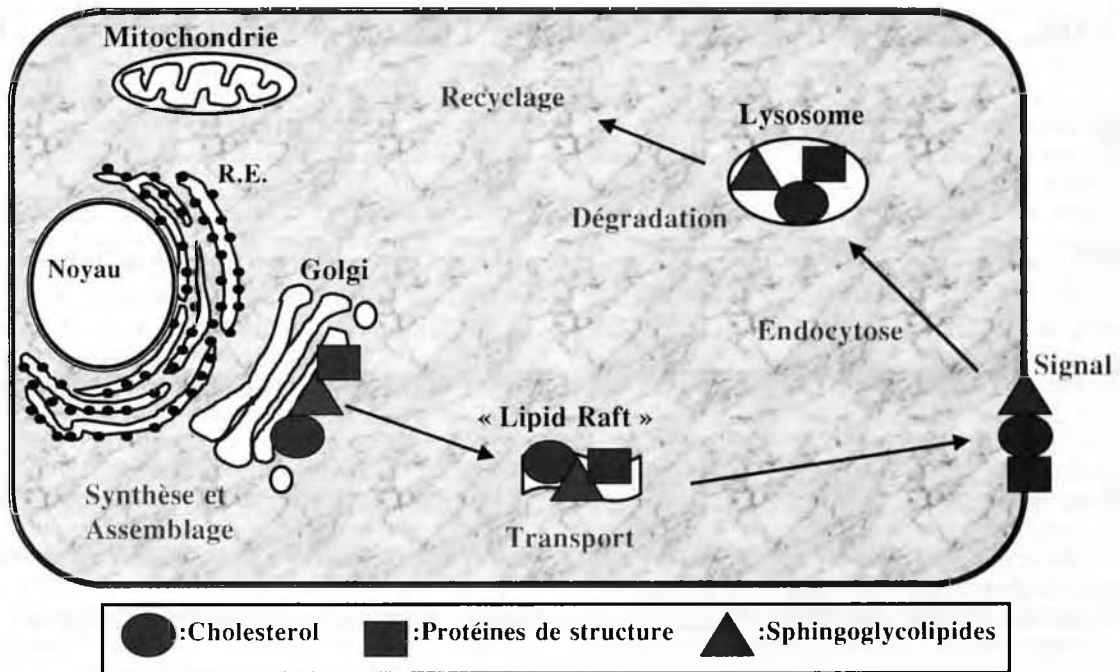


FIG. 2 – Dynamique des « Lipid Rafts ».

une accumulation de cette protéine, associée au cholestérol, dans le lysosome (Simons *et al.*, 2002) et perturbe le processus de myélinisation et la structure de cette membrane plurilamellaire périaxonale qu'est la myéline. Le « lipid raft » nécessaire au transport de la protéine PLP est constitué de deux types de SGL, les galactocérébrosides (galactosylcéramides) et les sulfatides (sulfo-galactosylcéramides) (Simons *et al.*, 2000). La diversité de la structure des SGL semble avoir une grande importance dans la nature des protéines associées. Ceci peut expliquer pourquoi les SGL ont une telle complexité et diversité selon les organes, les tissus, les types cellulaires (Hakomori 2000) et leurs modifications, au cours des étapes de différenciation, même si les conséquences physiologiques restent pour la plupart encore ignorées.

STRUCTURE DES SPHINGOLIPIDES

L'extrême diversité de la constitution des SGL leur confère un potentiel de reconnaissance stéréospécifique considérable. Les principales séries de SGL figurent sur la figure 3. En dehors de la série gala, ils dérivent tous du glucosylcéramide. Ces SGL peuvent comporter des chaînes oligosaccharidiques de longueur variable, être sialylés (mono, di, tri, tetra ou penta sialylés sur le galactose interne ou terminal, donc de type GM, GD, GT, GQ, GP), fucosylés, sulfatés. Cette grande variabilité est particulièrement importante dans le système nerveux

central et périphérique (Baumann et Aubry, 2003) où leur concentration est plus importante que dans les autres tissus.

La diversité de la structure des SGL n'est pas seulement liée à leurs séquences oligosaccharidiques, mais également au squelette céramide constitué de bases sphingoides de nature diverse et d'acides gras de longueur de chaîne variable. Ainsi, les sulfo-galactosylcéramides de cerveau de souris ont au moins 4 variétés de céramides en fonction de la nature de la chaîne d'acide gras. Dans la myéline, il s'agit tout particulièrement de sulfatides contenant des acides gras à très longues chaînes (24 atomes de carbone). La structure du céramide influence peut-être la nature (Hakomori 2000) et l'orientation, donc la présentation de la chaîne oligosaccharidique à la surface de la membrane plasmique (Hakomori 2000b), ainsi que celle des protéines qui leur sont associées et donc les fonctions de signalisation liées à ce microdomaine cellulaire. Tagawa *et al.* (2002) ont montré que la présence d'acides gras à très longues chaînes dans des gangliosides modifie leurs propriétés antigéniques vis-à-vis d'anticorps monoclonaux. Il est intéressant de noter, qu'en dehors des « rafts », les céramides jouent un rôle structural important au niveau de la peau, où des ω -hydroxycéramides, sont attachés par un groupement hydroxyle terminal ou par l'un des groupements hydroxylés de la sphingosine à un glutamate de l'enveloppe cornée de la peau et jouent probablement un rôle dans les propriétés d'imperméabilité de l'épiderme (Ponec *et al.*, 2000).

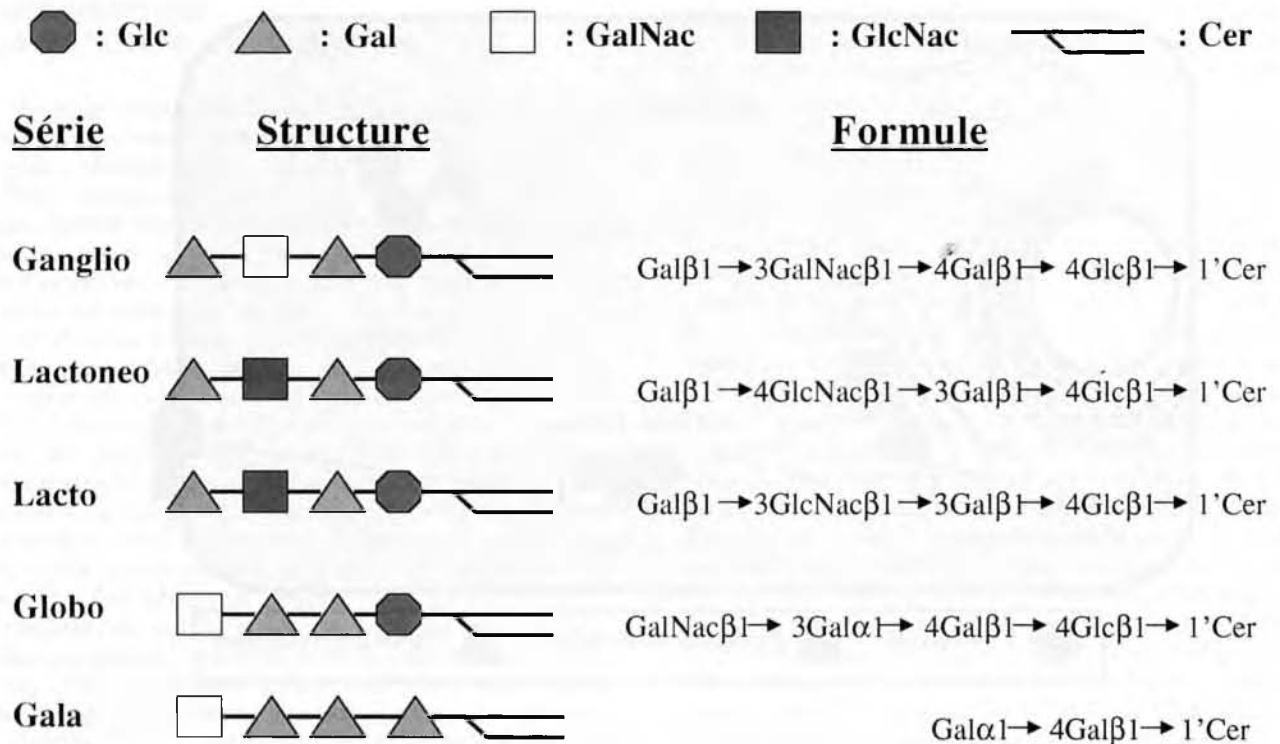


Fig. 3 – Structure de base des oligosaccharides des sphingoglycolipides.

SPÉCIFICITÉ TISSULAIRE ET CELLULAIRE DES SGL. IMPLICATION DANS LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

Dans le système nerveux central, les principaux SGL sont de la série ganglio dans les neurones, de la série gala pour la myéline et, pour le système nerveux périphérique, de la série lactoneo dont le sulfoglucuronylparagloboside qui est la cible d'anticorps dans des neuropathies dysimmunitaires. Dans les globules rouges, il s'agit essentiellement de SGL de la série globo.

Les SGL varient aussi au cours de la différenciation (Hakomori 2000a). Ainsi, à un stade précoce de l'embryogenèse, il y a un changement des structures des SGL, avec passage de la série globo, à la série lacto et enfin à la série ganglio. Lors du développement du lignage oligodendrocytaire dans le cerveau, la nature des SGL varie à la surface des cellules, avec tout d'abord la présence de glycolipides complexes encore mal identifiés, reconnus par l'anticorps A2B5, puis, au stade de l'oligodendrocyte mature, la disparition de ces composés à la surface membranaire et l'apparition de galactosyl-céramide (Lubetzki *et al.*, 1997). Les SGL à l'intérieur des « rafts » jouent également un rôle dans le ciblage apical de certaines protéines des cellules épithéliales, comme le décrira Tounsia Ait Slimane (Ait Slimane et Hoekstra 2002).

SGL ET CANCER

Il est intéressant de noter que les SGL sont des antigènes qui sont modifiés dans les processus tumoraux et de manière spécifique, qu'il s'agisse par exemple de certains gliomes (Fredman *et al.*, 1988), de cancers ORL (Bolot *et al.*, 1999) ou de cancers du sein (Steelant *et al.*, 2002). Les premières constatations sont déjà anciennes (Hakomori et Kannagi, 1983). Les anticorps monoclonaux ont beaucoup contribué à leur caractérisation. On ne connaît pas encore l'importance des conséquences de ces modifications dans la dynamique cellulaire pathologique.

SPHINGOLIPIDES, SIGNALISATION ET RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES

Nous avons vu que les « rafts » sont nécessaires à la localisation et au fonctionnement de récepteurs muscariniques (Brusès *et al.*, 2001). La rapsine qui est une protéine myristoylée, cotransportée avec le récepteur muscarinique de la jonction neuro-musculaire, emprunte également la voie d'un « raft » pour atteindre son site synaptique (Marchand *et al.*, 2002). Il en est de même du récepteur GABA B dans le cervelet du rat (Becher *et al.*, 2001). Les SGL ont également une influence sur un

transporteur neuronal de la dopamine, et leur concentration a une influence directe sur son activité (Barrier *et al.*, 2003). Ainsi ces microdomaines jouent un rôle important dans la transduction du signal et la transmission synaptique (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002). Sans qu'on sache exactement s'il s'agit toujours de microdomaines de type « rafts », les SGL sont nécessaires au fonctionnement optimal de certaines enzymes, telle l'ATPase sodium-potassium dépendante, où la concentration en sulfatides est directement liée à l'activité de l'enzyme (Karlsson *et al.*, 1971). Il est possible que les sulfatides soient également impliqués dans le fonctionnement de certains récepteurs des opiacés (Craves *et al.*, 1980).

Le métabolisme des sphingolipides est également impliqué dans les mécanismes de signalisation par l'intermédiaire de molécules provenant du catabolisme des sphingolipides, sphingomyéline et SGL, et qui apparaissent du fait du « turnover » de ces lipides complexes : céramide, sphingosine, sphingosine-1-phosphate lors des mécanismes de signalisation : ils sont impliqués dans de nombreux phénomènes normaux et pathologiques (apoptose) au niveau du muscle cardiaque (Levade *et al.*, 2001) et d'autres tissus. Ces aspects seront développés par Thierry Levade et Olivier Cuvillier.

Des agents pathogènes, microbes, virus ou toxines, peuvent également se lier aux SGL de ces microdomaines de type « rafts » et perturber les mécanismes de signalisation et donc les fonctions cellulaires, telles qu'on peut les observer dans les phénomènes d'absorption et de sécrétion des cellules épithéliales de l'intestin, donc dans les fonctions intestinales (Fantini *et al.*, 2000)

NEUROLIPIDOSES ET PATHOLOGIE AUTO-IMMUNE

Les neuropilidoses sont des maladies qui touchent le catabolisme ou le transport des sphingoglycolipides et du cholestérol, constituants très importants du système nerveux.

Si on ignore de manière précise le rôle fonctionnel de chacun de ceux-ci, les gangliosides sont principalement des constituants neuronaux et les cérébrosides et sulfatides des constituants de la myéline. Ainsi les gangliosidoses sont des affections neuronales et l'atteinte du catabolisme des cérébrosides et des sulfatides provoque des leucodystrophies.

La plupart des neuropilidoses touchent le lysosome, impliqué dans la dynamique cellulaire puisqu'il contient des enzymes qui interviennent dans la dégradation des constituants membranaires et dans leur recyclage. Certains constituants de ces sphingolipides, tels les acides gras à très longue chaîne présents dans les sphingoglycolipides de la myéline, sont partiellement dégradés dans les peroxysomes.

Depuis peu, l'attention a été attirée par la révélation tardive, chez l'adolescent ou l'adulte, de sphingolipidoses qui peuvent alors se présenter comme des maladies dégénératives du système nerveux, mais le tableau cli-

nique diffère selon l'enzyme déficiente et la nature du SGL en cause. Elles occasionnent des surcharges cellulaires en lipides non dégradés qui altèrent le fonctionnement du système nerveux. Chez l'adulte, ce type d'affection est lentement évolutif, et la présentation clinique correspond, selon la maladie, à un syndrome particulier très systématisé : ainsi on observe une atteinte des neurones pyramidaux ou extra-pyramidaux dans les gangliosidoses, avec ataxie spino-cérébelleuse, dystonie, amyotrophie spinale (Baumann *et al.*, 2002). Dans la maladie de Niemann-Pick de type C, l'altération du métabolisme du cholestérol retentit sur les SGL et provoque de graves altérations fonctionnelles du système nerveux, comme l'expliquera Marie Vanier dans son exposé sur la maladie de Niemann-Pick de type C.

La spécificité des lipides en relation avec le fonctionnement cellulaire est également clairement mise en évidence dans la pathologie auto-immune qui touche le nerf périphérique : neuropathies dysimmunitaires, syndrome de Guillain-Barré. Les anticorps anti-GM1 se voient essentiellement dans les neuropathies motrices, les anticorps de la série lactonéo et particulièrement du sulfoglucuronylparagloboside, dans les neuropathies démyélinisantes avec IgM monoclonales, et les anticorps antiGQ1b dans le syndrome de Miller-Fisher, une variété de syndrome de Guillain-Barré (Baumann, 2000).

Des dégénérescences neurofibrillaires ont été observées, associées à des anomalies de la dynamique du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer comme l'évoquera Charles Duyckaerts dans son exposé.

Ainsi, la complexité des SGL, que rien n'expliquait sur le plan physiologique pendant de nombreuses années, commence à être envisagée en relation avec l'ensemble des phénomènes qui régissent le développement et le fonctionnement normal et pathologique de la cellule.

BIBLIOGRAPHIE

- Ait Slimane T, Hoekstra D., Sphingolipid trafficking and protein sorting in epithelial cells. *FEBS Lett.*, 2002, 529, 54-59.
- Alonso M. A., Millán J., The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J. Cell Sci.*, 2001, 114, 3957-3965.
- Barrier L., Page G., Barc S., Piriou A., Portoukalian J., Sulfatide and GM1 ganglioside modulate the high-affinity dopamine uptake in rat striatal synaptosomes : evidence for the involvement of their ionic charges. *Neurochem. Int.*, 2003, 42, 305-313.
- Baumann N., Specificity of antiglycolipid antibodies. *Clin. Rev. Allergy and Immunol.*, 2000, 19, 31-40.
- Baumann N., Gelot A., Turpin J.-C., Manifestations nerveuses des neuropilidoses. *Encycl. Méd. Chir. Elsevier Paris. Neurologie*, 2002, 17-162-D-10, 37 p.
- Baumann N., Aubry J., Lipides du système nerveux périphérique. Encyclopédie médico-chirurgicale. Elsevier 2003, sous presse.
- Becher N. A., White J. H., McIlhinney R. A., The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J. Neurochem.*, 2001, 79, 787-795.

- Bolot G., David M.J., Kasama T., Taki T., Handa S., Richard M., Pignat J. C., Thomas L., Portoukalian J., Occurrence of monosialosyl penta-hexaosylceramide GalNAc-GM1 as a specific tumor-associated ganglioside of human head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.*, 1999, *135*, 159-164.
- Brusès J. L., Chauvet N., Rutishauser U., Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J. Neurosci.*, 2001, *21*, 504-512.
- Craves F. B., Zalc B., Leybin L., Baumann N., Loh H. H. Antibodies to cerebroside sulfate inhibit the effects of morphine and β -endorphin. *Science*, 1980, *207*, 75-76.
- Fantini J., Maresca M., Hammache D., Yahi N., Delézy O., Glycosphingolipid (GSL) microdomains as attachment platforms for host pathogens and their toxins on intestinal epithelial cells : activation of signal transduction pathways and perturbations of intestinal absorption and secretion. *Glycoconj. J.*, 2000, *17*, 173-179.
- Fredman P., von Holst H., Collins P., Granholm L., Svennerholm L., Sialyllactotetraosylceramide, a ganglioside marker for human malignant gliomas. *J. Neurochem.*, 1988, *50*, 912-919.
- Hakomori S., Kannagi R., Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J. Natl. Cancer Institute*, 1983, *71*, 231-251.
- Hakomori S., Traveling for the glycosphingolipid path. *Glycoconj. J.*, 2000a, *17*, 627-647.
- Hakomori S., Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconj. J.*, 2000b, *17*, 143-151.
- Karlsson KA, Samuelsson BE, Steen G. O., Lipid pattern and Na⁺-K⁺ dependent adenosine triphosphatase activity in the salt gland of duck before and after adaptation to hypertonic saline. *J. Membr. Biol.*, 1971, *5*, 169-184.
- Levade T., Auge N., Veldman R. J, Cuvillier O., Negre-Salvayre A., Salvayre R., Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ. Res.*, 2001, *89*, 957-968.
- Lubetzki C., Demerens C., Zalc B., Signaux axonaux et myélinogénèse dans le système nerveux central. *Médecine/Sciences*, 1997, *13*, 1097-1105.
- Marchand S., Devillers-Thierry A., Pons S., Changeux J. P., Car-taud J., Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J. Neurosci.*, 2002, *22*, 8891-8901.
- Ponec M., Boelsma E., Weerheim A., Covalently bound lipids in reconstructed human epithelia. *Acta Derm. Venereol.*, 2000, *80*, 89-93.
- Simons K., Ikonen E., Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, *387*, 569-572.
- Simons M., Kramer E. R., Thiele C., Stoffel W., Trotter J., Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol and galactosylceramide-rich membrane domains. *J. Cell Biol.*, 2000, *151*, 143-153
- Simons M., Kramer E. M., Macchi P., Rathke Hartlieb S., Trotter J., Nave K. A., Schulz J. B., Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J. Cell Biol.*, 2002, *157*, 327-336.
- Singer S. I., Nicolson G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science*, 1972, *175*, 720-731.
- Sprong H., Degroote S., Claessens T., van Drunen J., Oorschot V., Westerink B. H., Hirabayashi Y., Klumperman J., van der Sluijs P., Van Meer G., Glycophingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J. Cell Biol.*, 2001a, *155*, 369-380.
- Sprong H., van der Sluijs P., van Meer G., How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001b, *2*, 698.
- Steelant W. F., Kawakami Y., Ito A., Handa K., Bruyneel E. A., Marcel M., Hakomori S., Monosialyl-Gb5 organized with cSrc and FAK in GEM of human breast carcinoma MCF-7 cells defines their invasive properties. *FEBS Lett.*, 2002, *531*, 93-98.
- Tagawa Y., Laroy W., Nimrichter L., Fromholt S. E., Moser A. B., Moser H. W., Schnaar R. L., Anti-ganglioside antibodies bind with enhanced affinity to gangliosides containing very long chain fatty acids. *Neurochem. Res.*, 2002, *27*, 847-855.
- Tsui-Pierchala B. A., Encinas M., Milbrandt J., Johnson E. M., Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.*, 2002, *25*, 412-417.