

Les lipides : des agents de plus en plus actifs de la vie cellulaire

A. Trémolières

Institut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris Sud, Bâtiment 630, 91405 Orsay, France

Lipids, in living systems, do not only simply constitute an hydrophobic matrix allowing the separation of the different aqueous compartments. Researchs in the field, for the last twenty years, have first demonstrated that some lipids are playing an highly dynamic role in cellular signalling processes. It is, for example, the case of the phosphorylated derivatives of phosphatidylinositol but also of number of other lipids as phosphatidic acid, diacylglycerol or ceramides... These lipids are now considered as true "second messengers". On the other hand, it was demonstrated that fixation of some fatty acids or some lipids to proteins through covalent bonds, play a major role in regulating the interactions of these proteins with membranes. Finally, application of methods as circular dichroism, magnetic nuclear resonance or X-ray diffraction for analysis of crystallized biological structures, have lead to the demonstration of highly specific interactions between lipids and proteins inside the membranes themselves. All these aspects of lipid functions are analyzed in this paper.

Dans l'explosion qu'ont connues ces cinquante dernières années la biologie cellulaire et la génétique moléculaire, les lipides faisaient un peu figure de parents pauvres, à côté des protéines et des acides nucléiques qui étaient les vedettes incontestées de cette histoire. Après la grande époque qui a vu l'émergence des techniques modernes d'analyse des lipides (et particulièrement la GLC et l'HPLC) et celle où les biologistes et les biophysiciens cherchaient à produire des « modèles » capables de rendre compte de la structure de toutes les membranes biologiques – du double feuillet de Danielli et Dawson [1], jusqu'au modèle de Singer et Nicholson [2] – les lipides ont été considérés par la majorité des biologistes comme, d'une part des substances de réserve, et d'autre part de simples constituants hydrophobes permettant l'insertion des protéines dans les membranes, mais jouant un rôle relativement passif et un peu secondaire dans les processus cellulaires.

J'essaierai de montrer dans cet article que les lipides redeviennent une préoccupation majeure sur le plan fondamental et dans plusieurs secteurs clefs de la biologie cellulaire. Ceci est bien sûr à mettre en relation, entre autres facteurs, avec l'apparition ou le développement de techniques biophysiques permettant d'appréhender, avec une finesse inégalée jusqu'ici, les interactions entre les lipides et les autres constituants de la cellule à une échelle moléculaire, voire atomique.

J'ai choisi d'illustrer mon propos par quelques exemples dans trois domaines de la biologie :

- L'implication d'un certain nombre de lipides comme messagers secondaires jouant des rôles majeurs dans la circulation de l'information à travers les membranes et la cellule.
- Les modifications post-traductionnelles des protéines de nature lipidique. Il s'agit en fait de la mise en évidence de liaisons covalentes entre des lipides et un certain nombre de protéines, ce qui a des implications fonctionnelles extrêmement importantes.
- L'étude fine de quelques interactions entre lipides et protéines au sein des membranes cellulaires, démontrant que les lipides, loin de constituer simplement une « matrice hydrophobe » inerte, jouent des rôles majeurs dans la stabilisation des protéines dans leur configuration tridimensionnelle définitive au sein des membranes et dans les processus de transport.

Implication des lipides dans la signalisation cellulaire

C'est une histoire particulièrement originale et édifiante que celle de la découverte du rôle des lipides dans la

Abréviations

| | |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| CD | Dichroïsme circulaire. |
| CoA | Coenzyme A. |
| DAG | Diacylglycérol. |
| GLC | Chromatographie gaz-liquide. |
| HPLC | Chromatographie liquide à haute performance. |
| Ins(1,4,5)P ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphate. |
| LHC II | Light-Harvesting chlorophyll a/b protein complex lié au photosystème II. |
| Lyso-PA | Acide lyso-phosphatidique. |
| PA | Acide phosphatidique. |
| PLC | Phospholipase C. |
| G-Protéines | Protéines liant les nucléotides guanidiques. |
| GDP | Guanidine-diphosphate. |
| GTP | Guanidine-triphosphate. |
| PI-PLC | Polyphosphoinositide spécifique, phospholipase C. |
| PtdIns-4-P | Phosphatidylinositol-4-monophosphate. |
| PtdIns(4,5)P ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate. |
| PtdIns(3,4,5)P ₃ | Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire. |
| HPTLC | Chromatographie couche mince à haute performance |

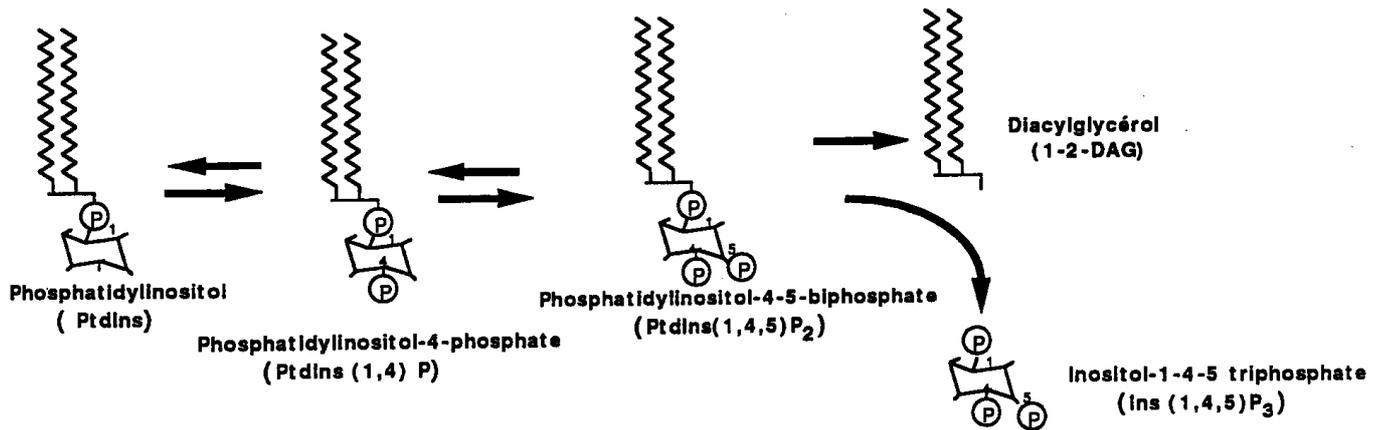


Figure 1. Formation et action des messagers secondaires dans le cycle des polyphosphoinositides : le phosphatidylinositol de la membrane cytoplasmique est phosphorylé séquentiellement en 4, puis en 5, par des PtdIns-kinases. L'activation d'un récepteur par un agoniste, stimule une PI-PLC qui hydrolyse spécifiquement le phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate, produisant ainsi de l'inositol-1-4-5-triphosphate et du 1-2-diacylglycérol qui jouent tous les deux des rôles de messagers secondaires.

signalisation cellulaire et tout particulièrement des phosphoinositides. Comme l'écrivait Bob Michell, un des pionniers du domaine, dans *Trends in Biological Science*, en 1995 [3] :

« Il y a quelques vingt ans, peu de scientifiques auraient misé sur le phosphatidylinositol comme candidat à un rôle tout à fait privilégié dans l'extraordinaire cascade de signaux induite par l'activation d'un récepteur membranaire. Rassembler, dans les années 1970, plus d'une douzaine de personnes sur ce thème dans un colloque était un véritable exploit ».

C'est dans les années 1960 qu'il a été d'abord montré que, à coté du mono-phosphate-inositide ou phosphatidylinositol (PtdIns) qui se trouvait en quantité appréciable dans toutes les membranes des organismes eucaryotes (car ce lipide n'est pas trouvé chez les procaryotes), on trouvait, en quantité beaucoup plus faible et spécifiquement dans la membrane plasmique, des dérivés di- et tri- phosphorylés respectivement appelés : phosphatidylinositol-4-phosphate (PtdIns-4P) et phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PtdIns(4,5)P₂). Des phosphatidylinositol-kinases, catalysant les phosphorylations successives en 4 puis en 5 de l'inositol, ont été caractérisées sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Mais ce qui a donné le point de départ à une série extraordinairement intensive de recherches sur les polyphosphoinositides, ce fut la découverte que l'excitation de nombreux récepteurs de surface (comme ceux activés par l'acétylcholine, la (nor)adrénaline, l'histamine...) provoquait, en quelques secondes, l'activation d'une phospholipase C (PI-PLC) hydrolysant spécifiquement le PtdIns(4,5)P₂ pour donner, d'une part l'inositol-tri-phosphate (Ins(1,4,5)P₃) et d'autre part un diacylglycérol (1-2 DAG). Or chacune de ces molécules joue un rôle de messager secondaire. L'Ins(1,4,5)P₃ active des canaux situés sur le réticulum endoplasmique induisant la libération du calcium contenu dans le réticulum. Cette augmentation de la concentration du Ca⁺⁺ cytosolique active toute une batterie de protéine-kinases Ca⁺⁺ ou Ca⁺⁺/Calmodulin dépendantes. Le DAG, lui, active un autre type de kinase : des protéines-kinases C (PKC), catalysant la phosphorylation de toute une

série de protéines. Cette dernière activation est particulièrement intéressante, car elle se produit à proximité immédiate de la face cytosolique de la membrane plasmique et fait intervenir un autre phospholipide qui est la phosphatidylsérine [4] (Fig. 1).

Depuis ces premières découvertes, ce schéma s'est prodigieusement compliqué. On a, par exemple, montré que ce cycle des polyphosphoinositides était non seulement présent et opérationnel au niveau de la membrane plasmique mais aussi du noyau cellulaire [5]. D'autre part, à côté de la voie des inositol-4-phosphates que nous avons décrite et qui est à l'origine de la production, par activation de la PI-PLC, de l'Ins(3,4,5)P₃, messager secondaire majeur, on a découvert d'autres PI-kinases permettant la synthèse de nouveaux dérivés poly-phosphoinositidiques qui sont les Ptd Ins-3P, PtdIns (3,4)P₂, PtdIns (3,4,5)P₃ [6]. Aux dernières nouvelles, ces dérivés polyphosphoinositides ne sont pas, eux, substrats de PLC, mais dans beaucoup de voies de signalisation on observe une activation de la PtdIns-3-kinase et il apparaît que ces dérivés polyphosphorylés du PtdIns joueraient directement un rôle messager dans un certain nombre de processus cellulaires importants. D'autre part, revenant à la voie des 4-PtdIns, on a montré que ce ne sont pas seulement les produits de l'hydrolyse du PtdIns (4,5)P₂, c'est-à-dire l'Ins(1,4,5)P₃ et le DAG qui jouent un rôle de messagers secondaires, mais que le PtdIns (4,5)P₂ lui-même est engagé dans la régulation de différents processus cellulaires et, notamment, interagit avec le cytosquelette, jouant ainsi un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire [7].

Pour compliquer encore le paysage, on a découvert que d'autres lipides que le phosphatidylinositol et d'autres lipases que les PtdIns-PLC étaient impliqués dans la signalisation cellulaire. Par exemple, l'hydrolyse de la phosphatidylcholine [8] peut produire l'acide phosphatidique (PA) soit par action directe d'une phospholipase D (PLD), soit par l'action d'une phospholipase C produisant un DAG qui sera ensuite phosphorylé par une DAG-kinase. Or la production de PA est induite dans de nombreux processus de signalisation et ce lipide joue, lui aussi, un rôle de messager. Enfin, les phospholipases A₂ (PLA₂) sont aussi activées dans un

Analyse des corps gras

certain nombre de situations conduisant à la production d'acide lyso-phosphatidique (lyso-PA), un lipide qui est, par exemple, directement impliqué dans l'agrégation plaquettaire [10,11]. Un nouveau lipide et une nouvelle kinase ont été aussi découverts : une PA-kinase permettant de produire un diacylglycérol-pyrophosphate. Cette kinase interviendrait dans la régulation du niveau de PA dans la cellule [12].

Un des développements le plus inattendu et le plus passionnant qui a émergé ces dernières années dans le champ de la signalisation lipidique implique les sphingolipides : la coupure de la sphingomyéline par une sphingomyélinase (SMase), catalysant une réaction analogue à celle catalysée par les phospholipases C sur les phospholipides, produit des molécules qui jouent un rôle capital dans la programmation de la mort cellulaire [13].

Il émerge donc, dans les cellules eucaryotes, une image d'une extrême complexité [14-16] qui est résumée sur la figure 2.

Enfin, et pour être complet, il faut signaler la découverte d'une voie de signalisation spécifiquement végétale mettant en jeu l'oxydation des acides gras poly-insaturés (acide linoléique mais surtout acide α -linoléique) qui débute par l'action de la lipoxigénase et aboutit à la formation de composés volatils dont le plus étudié est l'acide jasmonique, qui agissent pour mobiliser les systèmes de défense des plantes dans nombre de situations de stress ou d'attaque par des pathogènes [17,18].

Ce qui est commun à tous ces systèmes de signalisation et qui distingue fondamentalement les lipides engagés dans ces processus des lipides de structure ou de réserve, c'est la vitesse des réactions mises en jeu : la vitesse de renouvellement des lipides de structure est toujours de l'ordre de plusieurs heures, voire de plusieurs jours. Au contraire, l'activation des voies métaboliques impliquées dans la signalisation se produit en quelques minutes, voire quelques secondes. On commence à peine à découvrir un domaine étonnant où chacun des multiples messagers mis en jeu dans chaque processus de signalisation a une durée de vie qui lui est propre : de quelques secondes à quelques heures selon la molécule considérée. Il en résulte que, à chaque fois qu'une cellule reçoit un signal extérieur, des vagues d'information d'amplitude croissante se développent, aboutissant à une réponse biologique extrêmement complexe dans laquelle les phénomènes d'atténuation de la réponse pour un retour à la normale après réception du stimulus commencent à peine à être compris.

Si les méthodologies utilisées pour l'étude des lipides dans ces voies de signalisation ne sont pas fondamentalement différentes des techniques classiques, la taille réduite des « pools » étudiés et leur vitesse de renouvellement extrêmement élevée a exigé l'évolution vers des méthodes très spécifiquement biologiques. Les méthodes « immunologiques » directes sont peu utilisées, très peu d'anticorps anti-lipides ayant été produit à ce jour (alors que les méthodes de production de tels anticorps sont tout à fait accessibles aujourd'hui). Par contre, des méthodes enzymatiques couplées à des reconnaissances de type immunologique sont couramment employées : par exemple pour doser l'PtdIns(4,5)P₂ dans des préparations membranaires, on hydrolyse le lipide par l'action d'une PtdIns(4,5)P₂-kinase parfaitement spécifique, puis l'Ins(1,4,5)P₃ libéré est mesuré de la façon suivante : une protéine animale particulière qui

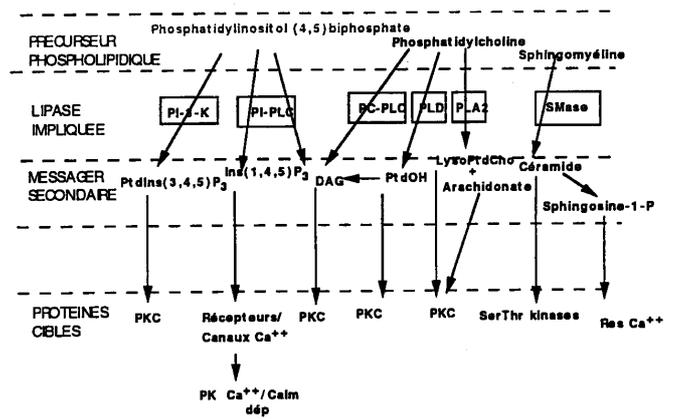


Figure 2. Implication des lipides dans différentes voies de signalisation dans les cellules animales.

à la propriété de fixer l'Ins(1,4,5)P₃ avec une extrême spécificité et sur laquelle a été préalablement fixé de l'Ins(1,4,5)P₃ tritié, est ajoutée au mélange et le déplacement de l'Ins(1,4,5)P₃ tritié par l'Ins(1,4,5)P₃ froid résultant de l'hydrolyse du PtdIns (4,5)P₂ permet de doser des quantités de lipides de l'ordre de la pico-mole.

Modifications post-traductionnelles des protéines de nature lipidique

Là aussi un champ nouveau s'est ouvert à la lipidologie cellulaire ces dix dernières années. On savait que les protéines pouvaient être glycosylées ou phosphorylées. On sait maintenant qu'elles peuvent aussi lier de façon covalente différentes molécules lipidiques et que ces modifications post-traductionnelles jouent des rôles extrêmement importants dans la régulation de nombre de processus cellulaires [19].

Quatre grand types de modifications post-traductionnelles des protéines de nature lipidique ont, jusqu'à présent, été mises en évidence :

Tout d'abord, l'acylation, c'est-à-dire la fixation directe d'une chaîne grasse par une liaison covalente (liaison ester ou thioester) sur un acide aminé constitutif de la protéine. Le premier type d'acylation est la myristoylation N-terminale d'une protéine. C'est une modification originale utilisant un acide gras trouvé, d'une façon générale, en très petites quantités dans les lipides cellulaires : l'acide myristique. C'est toujours une glycine terminale qui est myristoylée. La myristoylation se produit immédiatement après excision de la méthionine d'initiation et il s'agit donc d'un processus pratiquement co-traductionnel et irréversible [20].

Un second type d'acylation est la palmitoylation qui, à la différence de la myristoylation, concerne un acide aminé interne à la protéine. La palmitoylation est, le plus généralement, la formation d'une liaison thioester avec une cystéine. À la différence de la myristoylation, c'est une réaction largement post-traductionnelle et réversible, la protéine pouvant passer d'une forme palmitoylée à une forme non palmitoylée et inversement [21].

Une autre modification post-traductionnelle très fréquemment rencontrée est l'isoprénylation C-terminale [19,22].

Une séquence consensus C-terminale est reconnue par l'enzyme qui fixe un farnésylpyrophosphate sur une cystéine. L'isoprénnylation active une carboxypeptidase qui excise alanine, isoleucine et valine puis la cystéine subit une carboxyméthylation (Fig. 3).

Plus récemment, un nouveau type d'isoprénnylation, plus général sans doute que la farnésylation, a été mis en évidence : la fixation d'un groupement *géranyl-géranyl*. Cette isoprénnylation se fait aussi sur une cystéine du côté C-terminal du polypeptide, mais les séquences consensus sont différentes de celles reconnues pour la farnésylation et moins bien connues.

Ces trois types d'acylations permettent donc d'introduire un groupement hydrophobe soit à l'extrémité N-terminale (c'est la myristoylation), soit à l'extrémité C-terminale (c'est l'isoprénnylation) soit à l'intérieur de la chaîne polypeptidique (c'est la palmitoylation). Il faut noter cependant que, dans beaucoup de cas, la palmitoylation dépend d'une isoprénnylation préalable et se produit sur une cystéine proche de la séquence d'isoprénnylation.

La signification fonctionnelle de ces modifications post-traductionnelles des protéines par des groupements hydrophobes commence à être bien comprise : il s'agit, d'une façon générale, de réguler les interactions entre protéines à proximité des membranes cellulaires. C'est une régulation dynamique qui permet de contrôler les associations transitoires de protéines entre elles, ou des protéines avec les membranes [23-25].

Nous n'en donnerons qu'un exemple illustrant bien le rôle dynamique de la palmitoylation en synergie avec les deux autres types de modifications myristoylation et isoprénnylation). Il s'agit de l'interaction d'une famille de protéines jouant un rôle clef dans la signalisation cellulaire : les protéines G. Ces complexes protéiques sont impliqués dans la transmission du signal déclenché par l'activation de nombreux récepteurs transmembranaires.

Dans l'état de « non activation », c'est-à-dire lorsque le récepteur n'est pas activé par un effecteur, les trois sous-unités de la protéine G s'assemblent pour former un hétérotrimère constitué des sous-unités α -GDP, β et γ . La liaison de l'hétéro-trimère à la membrane résulte de l'action synergique de trois modifications de nature lipidique : d'une part la sous-unité γ a est constitutivement isoprénnylée à l'extrémité C-terminale, d'autre part, la sous-unité α -GDP est à la fois myristoylée sur une glycine N-terminale et palmitoylée sur une cystéine en position 3. L'activation du récepteur par un agoniste du type épinéphrine ou acétylcholine, induit la liaison entre le récepteur et l'hétérotrimère α -GDP $\beta\gamma$ et le relargage du GDP fixé sur la sous-unité α , permettant à celle-ci de lier le nucléotide guanidique le plus abondant dans la cellule : le GTP. Cette fixation provoque la dissociation entre les sous-unités α et $\beta\gamma$, mais la sous-unité α , du fait qu'elle est à la fois myristoylée et palmitoylée, reste liée à la membrane et fixée sur le récepteur. C'est la dépalmitoylation, catalysée par une thioestérase qui induira la libération de la sous-unité α dans le cytosol où une GTPase hydrolysera le GTP. Enfin, la re-palmitoylation de la sous-unité α -GDP catalysée par une palmitoylCoA transférase permettra la reconstitution de l'hétérotrimère α -GDP $\beta\gamma$ et sa liaison avec la membrane, revenant ainsi à l'état de repos initial dans lequel le système est prêt à subir un nouveau cycle d'activation-désactivation (Fig. 4).

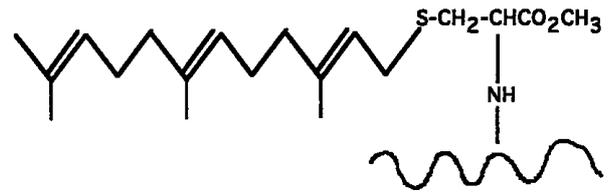


Figure 3. Structure de la farnésyl-carboxyméthyl-cystéine engagée dans une liaison peptidique.

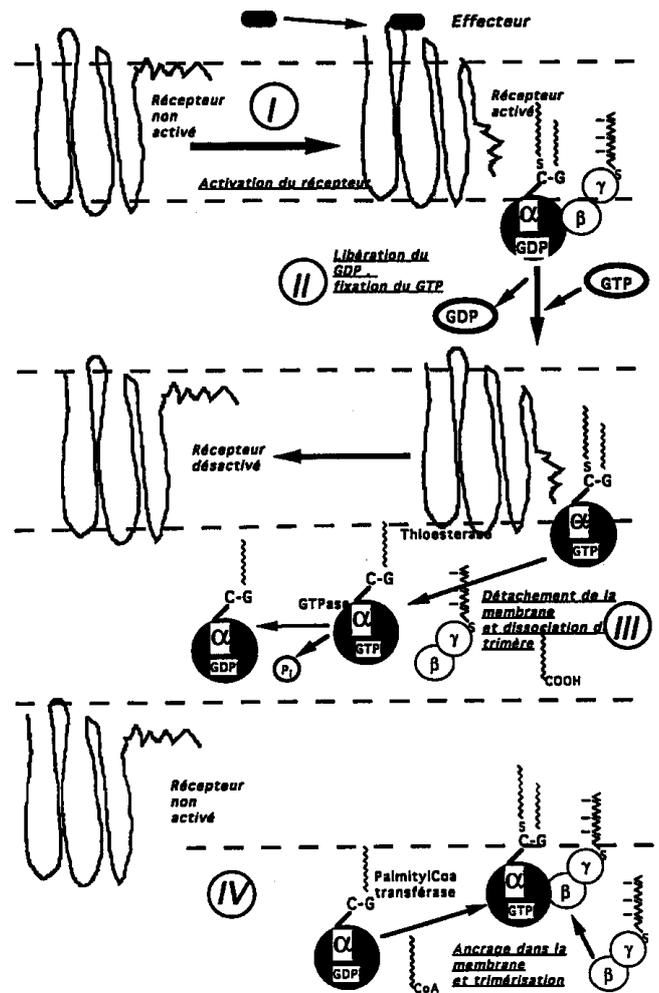


Figure 4. Rôle dynamique de la palmytoylation dans la transmission d'un signal. L'activation du récepteur membranaire entraîne un changement conformationnel qui induit sa liaison avec le complexe trimérique $G_{\alpha} GDP$ (à la fois myristoylée et palmitoylée), G_{β} , G_{γ} (isoprénnylée) (Étape I). Puis, le GDP est échangé contre le GTP, ce qui provoque la dissociation des trois sous-unités, G_{β} et G_{γ} se détachant de la membrane alors que G_{α} du fait de la double acylation terminale, reste lié à cette membrane (Étape II). La dépalmytoylation de G_{α} entraîne sa libération dans le cytosol et permet la désactivation du récepteur (Étape III). C'est la repalmytoylation de G_{α} qui permettra et la trimérisation du complexe, et son attachement à la membrane, rendant le système apte à un nouveau cycle de signalisation.

Le rôle extrêmement subtil joué par la myristoylation N-terminale a été analysé en détail dans un certain nombre de cas. On a ainsi montré que dans de nombreux facteurs

Analyse des corps gras

protéiques de régulation interagissant avec des membranes, on trouvait à proximité du site terminal myristoylé un certain nombre d'acides aminés basiques. C'est la myristoylation qui permet à cette zone basique d'interagir avec les groupements polaires acides portés par des lipides comme la phosphatidylsérine. Mais le facteur régulateur peut se détacher de la membrane si ces groupements basiques subissent une phosphorylation. Ainsi la phosphorylation réversible permet grâce à l'action synergique de la myristoylation d'attacher ou de détacher le facteur de régulation de sa membrane cible (Fig. 5).

- Un dernier type de modification d'une protéine par liaison covalente avec un lipide est « l'ancre glycosyl-phosphatidylinositol ». Il s'agit de l'attachement, à l'extrémité C-terminale de la protéine, d'une structure glyco-lipidique complexe constituée d'une phosphoéthanolamine qui contracte d'une part une liaison peptidique avec une asparagine, et d'autre part se lie par le groupement phosphate à un glycane, lui-même lié finalement, le plus généralement, à un phosphatidylinositol (mais, dans un certain nombre de cas, le diacylglycérol terminal est remplacé par une céramide (Fig. 6).

Le rôle de cette ancre lipidique est très différent de celui joué par les autres modifications lipidiques (acylations ou isoprénylation) : il s'agit d'attacher des protéines très extrinsèques sur la face externe de la membrane cellulaire. C'est, par exemple, le cas des antigènes de surface qui recouvrent la surface externe de nombre de protozoaires. La façon dont se constitue ce complexe est maintenant très clairement établie : la protéine qui devra être ancrée dans la membrane (coté externe) est synthétisée sous forme d'un précurseur caractérisé par une extension C-terminale de 10 à 35 acides aminés à caractère très hydrophobe. Cette extrémité permet le ciblage de la protéine et son attachement à la membrane cytoplasmique.

Puis, une activité transaminase catalyse l'échange entre cette extension C-terminale et le groupement éthanolamine-glycane-phosphatidylinositol [27-29].

L'étude de ces modifications post-traductionnelles des protéines, de nature lipidique, a exigé le développement de techniques conjoignant des méthodes d'analyse chimique extrêmement fines avec des approches biologiques et génétiques sophistiquées ; en effet, un des problèmes majeurs rencontré, particulièrement en ce qui concerne la caractérisation des acylations par les acides myristique ou palmitique, est celui d'éliminer toute éventualité de contamination de la protéine par des lipides liés de façon non covalente. Le protocole de mise en évidence de ces acylations par l'acide myristique est, en général, le suivant : on commence par incorporer *in vivo* ou *in vitro* un acide myristique marqué dans sa protéine cible putative. Puis cette protéine est isolée, purifiée, lavée plusieurs fois avec des mélanges de solvants organiques divers. On procède ensuite à une hydrolyse séquentielle. Une première hydrolyse basique faible permet de détacher les acides gras constitutifs de glycérolipides qui pourraient rester fixés sur la protéine, puis une hydrolyse acide forte permet de rompre la liaison ester-amide. En ce qui concerne la mise en évidence de la palmitoylation, le problème est plus complexe car il est souvent engagé dans une liaison thioester avec une cystéine. Ce type de liaison est, en principe, préférentiellement hydrolysée par l'hydroxylamine. Si l'identification subséquente de l'acide gras engagé dans une

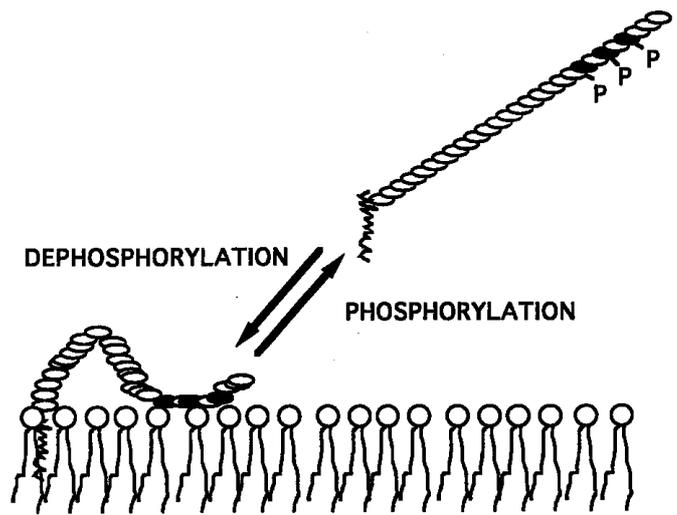


Figure 5. Rôles de la myristoylation et de la phosphorylation dans l'interaction d'un facteur de régulation avec sa membrane cible. Le facteur de régulation, sous sa forme non phosphorylée, interagit avec la membrane d'une part par insertion du myristate N-terminal dans la bicouche lipidique, d'autre part par interaction entre les groupements basiques portés par les acides aminés proches de l'extrémité terminale de la protéine et les têtes polaires des lipides acides de la membrane. La phosphorylation des résidus sérines, diminuant l'interaction électrostatique, provoque le détachement entre la protéine et la membrane.

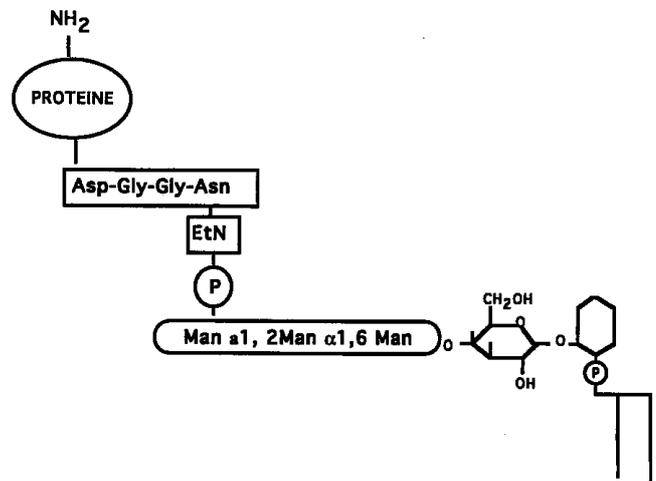


Figure 6. Structure de l'ancre glycosyl-phosphatidylinositol.

acylation ne pose pas de problèmes particuliers et utilise les méthodes classiques de GLC et d'HPLC ou d'HPTLC, il n'en va pas de même pour la caractérisation de l'ancre glycosyl-phosphatidylinositol (ancre GPI) qui requiert impérativement la spectroscopie de masse. La première indication qu'une protéine contient une ancre GPI provient de la mise en évidence de la libération d'un phosphatidylinositol après un traitement par la PI-PLC. Il faut conjointement démontrer la présence de l'éthanolamine par incorporation d'une éthanolamine marquée dans la protéine. Mais la détermination complète de la structure d'une ancre GPI implique la

résolution de ses différents constituants par toute une batterie de techniques chimiques et enzymatiques puis leur identification par GC-MS.

Interactions lipide-protéine au sein des membranes biologiques

Les interactions entre lipides et protéines au sein des membranes biologiques, dans des membranes artificielles ou dans des complexes lipo-protéiques, peuvent maintenant être étudiées en utilisant des techniques biophysiques extrêmement performantes. Deux d'entre elles donnent accès à la caractérisation de ces interactions à l'échelle atomique : c'est, tout d'abord, la diffraction des rayons X dont la limitation principale est qu'elle exige la cristallisation préalable du complexe à étudier. C'est, ensuite, la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui, par contre, n'est applicable actuellement qu'à de petits polypeptides inclus dans des micelles lipidiques. Des techniques comme la spectroscopie infrarouge (IR) ou le dichroïsme circulaire (CD), si elles ne permettent pas d'atteindre l'échelle moléculaire, donnent cependant des informations extrêmement précieuses sur l'orientation de petites molécules (lipidiques ou pigmentaires) dans des complexes protéiques ou même des membranes biologiques [30].

Il a quelque trente ans déjà, le groupe de Vittorio Luzzati, à Gif-sur-Yvette [31] produisait les premières images de diffraction aux rayons X de dispersions de lipides dans l'eau. Il montrait ainsi que les lipides (et particulièrement les phospholipides membranaires) en phase aqueuse, peuvent s'auto-assembler en différentes structures de phases, suivant les conditions de concentration et de température qui se divisent en fait en deux groupes principaux qui sont d'une part, les structures en bi-couche, d'autre part les structures de type hexagonal. Pendant de longues années, les biologistes estimaient que la structure en bicouche représentait la structure de base rencontrée dans les membranes biologiques, et que l'un des problèmes fondamentaux était la détermination des températures de transition auxquelles les lipides passaient d'une structure en bicouche à l'état de gel liquide, à une structure figée incompatible avec l'activité biologique des cellules. Mais on a montré que l'on trouvait toujours dans les membranes une certaine quantité de lipides qui avaient la propriété, aux températures physiologiques, de s'organiser en structure de type hexagonal. Ce qui est étrange, c'est que la présence de telles structures a un effet désorganisateur de la bi-couche. Ces lipides sont considérés comme déstabilisateurs de la structure en bi-couche, c'est-à-dire qu'ils perturbent l'organisation membranaire elle-même. Or, ce qui est apparu, ces dernières années, c'est que cet effet perturbateur, loin de constituer un handicap au déroulement normal des processus cellulaires, est tout à fait indispensable et joue un rôle majeur, particulièrement en ce qui concerne le transport des molécules à travers les membranes [32]. Une très élégante démonstration en a été apportée par le groupe de Dowhan [33] qui, par voie génétique, a produit des mutants d'*E. coli* incapables de synthétiser la phosphatidyléthanolamine qui est typiquement « un lipide ne formant pas de bi-couche ». Or, dans de telles bactéries transformées, un certain nombre de systèmes transporteurs fondamentaux sont profondément altérés [34]. La réintroduction de la phos-

phatidyléthanolamine dans la bactérie restaure un fonctionnement normal de ces systèmes de transport.

Un autre bel exemple de l'importance de ce type de « lipides formant des structures hexagonales » fut apporté par le groupe de De Kruijff [3] qui étudie un système végétal : celui de la pénétration d'une protéine synthétisée dans le cytoplasme dans son organe récepteur, le chloroplaste. Il s'agit de la ferredoxine. En effet, une grande partie des protéines chloroplastiques sont, dans les cellules végétales eucaryotes, codées par le noyau cellulaire, synthétisées sur les ribosomes cytoplasmiques, puis ciblées vers le chloroplaste. Dans le cas de la ferredoxine, ce compartiment cible est la phase soluble du chloroplaste appelée « stroma ». Il faut donc d'abord que ce type de protéines franchissent l'enveloppe du chloroplaste (constituée par deux membranes). Ce ciblage est effectué grâce à un peptide dit de « transit », c'est-à-dire par une extension de l'extrémité N-terminale de la protéine, extension qui sera clivée par une protéase chloroplastique après que la protéine a franchi l'enveloppe chloroplastique. Le groupe de De Kruijff a développé une très élégante technique consistant à étaler, en une mono-couche parfaite, une préparation lipidique sur une surface aqueuse. L'introduction de différents polypeptides dans une telle mono-couche permet de mesurer (*via* la mesure de la pression exercée par la mono-couche sur les parois de l'appareil), l'affinité d'une protéine donnée pour un lipide donné. En manipulant génétiquement la séquence du peptide de transit de la ferredoxine, il a été montré que parmi les éléments de reconnaissance entre le peptide transit et sa membrane cible, une zone du polypeptide située non loin de l'extrémité N-terminale montrait une exceptionnelle affinité pour un galactolipide de la membrane chloroplastique : le « monogalactosyldiacylglycérol ». Or ce lipide est tout d'abord spécifiquement trouvé dans les membranes chloroplastiques et absent des membranes mitochondriales. Sa reconnaissance par le peptide de transit permet donc d'adresser spécifiquement la protéine vers le chloroplaste et non pas vers la mitochondrie. Autre fait important, ce monogalactosyldiacylglycérol est typiquement un « lipide ne formant pas de bi-couche » donc un lipide déstabilisateur de la structure membranaire. L'idée du groupe hollandais est que non seulement l'interaction entre le peptide de transit et le lipide permet l'adressage spécifique de la protéine vers le chloroplaste, mais en outre, permet à celle-ci d'amorcer sa pénétration de la membrane grâce à sa liaison avec un lipide déstabilisant. Ce ne sont là, bien sûr, que des aspects partiels du processus complexe qui permettra non seulement au peptide de franchir les deux enveloppes, mais ensuite de recouvrer sa forme tridimensionnelle définitive (après excision du peptide de transit) grâce à l'intervention d'une protéine du type chaperone.

Un autre exemple montrant la spécificité des interactions qui s'établissent entre lipides et protéines, mais cette fois au sein même de la membrane, concerne une autre famille de protéines chloroplastiques, codées et synthétisées à l'extérieur du chloroplaste, mais cette fois-ci ciblées non pas vers la phase soluble du chloroplaste, le « stroma », mais vers la membrane photosynthétique elle-même encore appelée « thylakoïde » siège de toutes les réactions claires de la photosynthèse. Cette famille de protéines appelées LHC II va constituer, en association avec les chlorophylles et les caroténoïdes, l'antenne principale de collecte de l'énergie lumineuse qui déversera le plus gros de l'énergie qu'elle capture

sur le photosystème II. Ce système antennaire est si important qu'il représente près de la moitié des protéines et des pigments de la membrane photosynthétique. De ce fait, le LHC II est la protéine membranaire la plus abondante dans le monde vivant [36]. Pour franchir l'enveloppe du chloroplaste, un système de ciblage analogue à celui décrit précédemment pour la ferredoxine est mis en place, impliquant un peptide de transit qui sera excisé après franchissement de la membrane par le polypeptide. On sait peu de choses sur la façon dont la protéine est ensuite dirigée jusqu'à la membrane photosynthétique ; par contre, on sait que sa stabilisation définitive, dans la membrane elle-même, dépend d'une interaction hautement spécifique avec une molécule lipidique : le phosphatidylglycérol (Fig. 7) [37-39].

L'interaction spécifique entre ce lipide et une séquence de six acides aminés situés à 15 amino-acides de l'extrémité N-terminale, impliquant, entre autres, la charge positive portée par l'arginine 21 et la charge négative portée par le phosphate du phosphatidylglycérol, induit un changement de configuration qui conduit les groupements positifs portés par l'extrémité N-terminale de la protéine à interagir avec les charges négatives portées par les têtes polaires des phospholipides de la bi-couche. Ce changement de configuration permet à la protéine de se trouver à l'abri de coupures, par des protéases du stroma. D'autre part, il dégage un certain

nombre de charges négatives, portées par un segment du polypeptide situé juste au-delà du site d'interaction avec le phosphatidylglycérol, qui joueront un rôle essentiel dans la réalisation définitive de la structure complexe que constituera le thylakoïde. On a montré qu'il suffisait d'une molécule de phosphatidylglycérol interagissant au site de reconnaissance pour stabiliser la protéine. Ce type d'interaction joue un rôle considérable dans les problèmes de biologie structurale. Par exemple, s'agissant du LHC II, il n'a pas été possible de le cristalliser en l'absence du lipide. C'est donc la compréhension du rôle de ce lipide [40] dans le processus qui a permis de produire des cristaux bi- et tri-dimensionnels dont l'analyse par diffraction des rayons X a abouti à un modèle atomique de la structure du LHC II de feuille de pois, avec une résolution de 3,4 Angströms [37]. Le rôle crucial de l'interaction entre le phosphatidylglycérol et le LHC II a aussi été mis en évidence par spectroscopie d'absorption dans l'UV et dichroïsme circulaire à basse température. On a, en effet, montré que deux bandes d'absorption disparaissaient quand le phosphatidylglycérol était spécifiquement arraché du complexe par la phospholipase A2. Cela démontre que l'interaction entre le lipide et la protéine, en ce site précis, confère une orientation particulière aux molécules de chlorophylles au sein du complexe, permettant une transmission efficace de l'énergie d'excitation à travers l'antenne et jusqu'aux centres photochimiques [41].

Références

- Danielli, J. F.; Dawson, H. J. *Cell. Comp. Physiol* **1935**, *5*, 495-508.
- Singer, S. J.; Nicolson, C. L. *Science* **1972**, *175*, 720-731.
- Michell, B. *TIBS* **1995**, *20*, 326-329.
- Berridge, M. J. *Nature* **1993**, *361*, 315-325.
- Dicheva, N.; Banfic, H.; Irvine, R. F. *Cell* **1993**, *74*, 405-407.
- Capeller, R.; Cantley, L. C. *Bioessays* **1994**, *16*, 565-576.
- Jamney, P. A. *Ann. Rev. Physiol.* **1994**, *56*, 169-191.
- Exton, J. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1212*, 26-42.
- Bonner, R. W.; Thompson, N. T.; Randall, R. W.; Garland, R. G. *Biochem. J.* **1989**, *264*, 617-620.
- Moolenaar, W. H. *Trends Cell Biol.* **1994**, *4*, 213-218.
- Moolenaar, W. H.; Kranenburg, O.; Postma, F. R.; Zondag, G. C. M. *Current Opinion Cell Biol.* **1997**, *9*, 168-173.
- Münnich, T.; De Vrije, T.; Irvine, R. F.; Musgrave, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15708-15715.
- Hannun, Y. A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3125-3128.
- Dicheva, N.; Irvine, R. F. *Cell* **1995**, *80*, 269-278.
- Liscovitch, M.; Cantley, L. C. *Cell* **1994**, *7*, 329-334.
- Roberts, M. F. *Trends Cell Biol.* **1994**, *4*, 219-223.
- Furner, E. E.; Ryan, C. A. *The Plant Cell* **1992**, *4*, 129-134.
- Howe, C. A.; Lightner, J.; Browse, J.; Ryan, C. A. *The Plant Cell* **1996**, *8*, 2067-2077.
- Turner, A. J. The diversity of lipid modification of proteins. In: *Lipid modification of proteins, A practical approach*, Hooper, N. M.; Turner, A. J. Eds., IRL press, Oxford; pp 1-11.
- Rudnick, D. A.; Duronio, R. J.; Gordon, J. L. Methods for studying myristoylCoA:protein N-myristoyltransferase. In: *Lipid modification of proteins, A practical approach*, Hooper, N. M.; Turner, A. J. Eds. IRL press, Oxford; pp 37-59.
- Aitken, A. Structure of acylated proteins. In: *Lipid modification of proteins, A practical approach*, Hooper, N. M.; Turner, A. J. Eds. IRL press, Oxford; pp 63-86.
- Glomset, J. A.; Gelb, M. K. *Farnsworth CC TIBS* **1995**, *20*, 272-276.

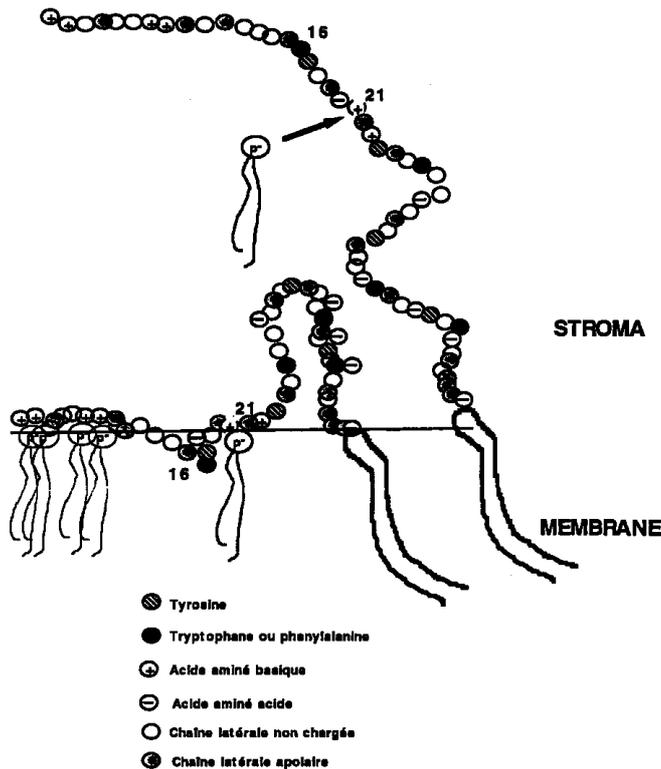


Figure 7. Interaction spécifique entre le phosphatidylglycérol et le LHC II dans la membrane photosynthétique. L'interaction entre la molécule de Phosphatidylglycérol et les 5 acides aminés situés entre 16 et 21, entraîne un changement conformationnel à l'extrémité N-terminale de la protéine, ce qui amène les charges positives situées à l'extrémité N-terminale à contracter des liaisons électrostatiques avec les charges négatives portées par la tête polaire des phospholipides de la membrane.

23. Gelb, M. H.; Farnsworth, C. C.; Glomset, J. A. Structural analysis of prenylated proteins. In: Lipid modification of proteins, A practical approach, Hooper, N. M.; Turner, A. J. Eds., IRL press, Oxford; pp 231-257.
 24. Mumby, S. M. *Current Opinion Cell Biol.* **1997**, *9*, 148-154.
 25. Mc Laughin, S. *Adren Am TIBS* **1995**, *20*, 272-276.
 26. Ames, J. B.; Ishina, R.; Tanaka, T.; Gordons, J. I.; Stryer, L.; Ikura, M. *Nature* **1997**, *389*, 198-202.
 27. Hooper, N. M. Identification of glycosyl-phosphatidylinositol anchor on membrane proteins. In: Lipid modification of proteins, A practical approach, Hooper, N. M.; Turner, A. J. Eds., IRL press, Oxford; pp 89-113.
 28. Field, M. C.; Menon, A. K. Biosynthesis of glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. In: Lipid modification of proteins, A practical approach, Hooper, N. M.; Turner, A. J. Eds., IRL press, Oxford; pp 155-189.
 29. Tartakoff, A. M.; Singh, N. *TIBS* **1992**, *17*, 470-473.
 30. De jungh, H. H.; Goormaghtigh, E.; Killian, J. A. *Biochemistry* **1994**, *33*, 14521-14528.
 31. Luzzati, V.; Gülik-Krzywicki, T.; Tardieu, A. *Nature* **1968**, *218*, 1031-1034.
 32. De Kruijff, B. *Nature* **1997**, *386*, 129-130.
 33. Bogdanov, M.; Sun, J.; Kubach, H. R.; Dowhan, W. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11615-11618.
 34. Rietveld, A. G.; Koorengel, M. C.; De Kruijff, B. *EMBO J.* **1995**, *14*, 5506-5513.
 35. Van't hof, R.; Van Klompenburg, W.; Pilon, M.; Kuzubek, A.; De Körte-Kool, G.; Demel, R. A.; Weisbeck, P. J.; De Kruijff, B. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4037-4042.
 36. Kühlbrandt, W. *Nature* **1991**, *350*, 130-134.
 37. Hobe, S.; Prytulla, S.; Kühlbrandt, W.; Paulsen, H. *EMBO J.* **1994**, *13*, 3423-3429.
 38. Hobe, S.; Förster, R.; Kindler, J.; Paulsen, H. *Biochemistry* **1995**, *43*, 10224-10228.
 39. Trémolières, A.; Siegenthaler, P. A. Reconstitution of photosynthetic structures and activities with lipids. In: Lipids in Photosynthesis: Structure, function and genetic, Siegenthaler, P. A.; Murata, N. Eds., Kluwer Academic press publisher, Dordrecht, 1998; pp 000-000.
 40. Nussberger, S.; Dörr, K.; Wang, D. N.; Kühlbrandt, W. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 347-356.
 41. Nussberger, S.; Dekker, J. P.; Kühlbrandt, W.; Van Bohluis, B. M.; Van Girondelle, R.; Van Amerongen, H. *Biochemistry* **1994**, *33*, 14775-14783.
-