Comment les protéines prennent leur pied (GPI)

Pascale Chenevier, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69007 Lyon, France

Cette petite revue sans prétention se veut accessible à tous les scientifiques non biologistes avec tout au plus l'aide d'un dictionnaire. Elle présente brièvement un sujet encore en friche mais déjà passionnant : un type particulier de protéine membranaire, découvert en 1985, les protéines à pied GPI. Le lecteur est invité à ne pas s'effrayer par les noms barbares qui truffent nécessairement toute revue biologique et à se laisser guider par le parfum de la découverte.

Le monde vivant réussit l'exploit de produire des organismes d'une diversité extraordinaire à partir d'un nombre très restreint de matériaux de base. En effet, quatre types de molécules suffisent à constituer (presque) entièrement toute la matière biologique :

- les acides nucléiques sont les mieux connus car leur structure est la plus simple : ce sont des polymères linéaires de quatre monomères, les nucléotides. Leur stabilité et leur capacité à s'apparier sélectivement (donc à servir de modèle pour la création d'une copie) sont utilisées pour le stockage de l'information.

- Les protéines, polymères linéaires d'acides aminés (il existe vingt aminoacides différents), prennent les formes et les rôles les plus variés grâce aux propriétés chimiques diverses de leurs constituants et à leur capacité à lier des particules non protéiques réactives (ions, hèmes, vitamines...). Ils sont les outils et les piliers des cellules et des organismes. Leur structure linéaire est codée par les acides nucléiques.

- Les sucres sont bien plus complexes que les précédents. D'une part, le nombre de monosaccharides différents dont dispose le monde vivant dépasse de loin le nombre de vingt. D'autre part, les quatre ou cinq sites de polymérisation possible de chaque unité glucidique rend la structure des polysaccharides inextricable. Leurs fonctions s'étendent du stockage de l'énergie et du soutien structural à la reconnaissance et à la défense (couverture glucidique de cellules ou molécules).

- Les lipides, quant à eux, ne sont pas des polymères. Plus énergétiques et plus denses que les glucides (qui se gonflent d'eau), ils constituent les réserves à long terme de l'organisme. Les lipides amphiphiles s'aggrègent pour former les membranes biologiques.

Les protéines à ancrage membranaire Glycosyl-PhosphatidylInositol (dites : à pied GPI) relèvent pour leur nature des trois dernières catégories... et pour leur assemblage correct de l'information génétique stockée dans la première. Le présent article s'intéresse à ces deux aspects : après avoir détaillé la structure de l'ancrage GPI, nous aborderons les grandes questions qui se posent à son sujet, i.e. comment les protéines à pied GPI sont synthétisées puis dirigées vers la membrane plasmique, et quelle peut être l'utilité de ce mode d'ancrage.

Mais voyons d'abord plus en détail ce qu'est la membrane où viennent s'ancrer les protéines à pied GPI.

1 La cellule eucaryote : un réseau de membranes

Les lipides amphiphiles (des phospholipides pour la plupart) rassemblent leurs têtes hydrophiles du côté de l'eau et leurs queues hydrophobes les unes contre les autres pour former une bicouche de phospholipides (voir le schéma 1). Cette bicouche constitutive des membranes biologiques est imperméable aux solutés acqueux (surtout aux molécules de grande taille) et même à ses propres constituants dans le sens où ils ne peuvent pas basculer d'une couche à l'autre. Les deux faces de la bicouche se distinguent ainsi non seulement par leur orientation mais aussi par leur composition.

Les fonctions biologiques de la membrane sont assurées par les nombreuses protéines qui y sont ancrées ou enchâssées : transport sélectif de solutés d'un côté vers l'autre, synthèse mue par le gradient de concentration d'un soluté entre deux compartiments, transmission de l'information, reconnaissance... L'assemblage membranaire peut donc être vu comme une solution bidimensionnelle de protéines dans un solvant lipidique dont la composition variable détermine la fluidité et la capacité à solvater les protéines dissoutes : c'est le modèle de la mosaïque fluide [1].

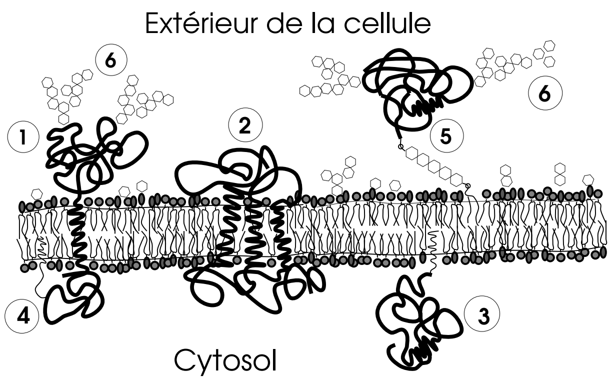

FIG. 1 - *Schéma d'une membrane plasmique dans le modèle de la mosaïque fluide*
1 : une protéine transmembranaire (simple ancrage peptidique).
2 : une protéine à multiples domaines transmembranaires.
3 : une protéine cytoplasmique liée par un lipide (myristoyle).
4 : certaines protéines transmembranaires possèdent aussi un ancrage lipidique.
5 : une protéine à pied GPI.
6 : presque toutes les protéines de la face externe portent des chaînes de glucides (glycosylations).

Il existe de nombreux types de membranes :

- la membrane plasmique qui limite la cellule est celle qui nous intéresse car elle est le lieu d'ancrage des protéines à pied GPI. Elle est présente chez les eucaryotes comme chez les procaryotes. Chez les organismes unicellulaires, elle est doublée d'un épais coussin glucidique, le glycocalyx, qui protège la cellule.
- Le réseau complexe de membranes internes qui distingue les eucaryotes des procaryotes enferme diverses organites [2] :
  - le noyau qui contient l'information génétique de la cellule;
  - les mitochondries et les plastes qui se chargent de fournir la cellule en énergie;
  - les peroxysomes et les lysosomes qui abritent les réactions de digestion;
  - les vésicules de transport;
  - enfin, le Réticulum Endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi où a lieu la biosynthèse des composants membranaires, en particulier des protéines à pied GPI.

Les protéines membranaires sont des biomolécules difficiles à étudier car leur caractère fortement hydrophobe complique singulièrement leur purification. Pour les détacher de la membrane, on a recours à des détergents; mais ceux–ci ont tendance à détruire l'arrangement fonctionnel des protéines : leur conformation spatiale, les associations de protéines nécessaires à leur fonction. De plus, les complexes ainsi solubilisés contiennent en général des lipides et des glucides en sus des protéines, ce qui rend leur analyse délicate. Les biochimistes les ont souvent éliminés pour simplifier leurs études, détruisant ainsi les types d'ancrage non peptidiques (dont les pieds GPI). C'est pourquoi la connaissance que nous avons de ceux–ci est plus récente et plus morcelée. Le schéma 1 illustre quelques uns des types connus de protéines membranaires et met en évidence l'originalité de l'ancrage GPI.

2 Où l'on découvre les protéines à pied GPI

C'est l'étude d'une enzyme hydrolysant spécifiquement les pieds GPI qui a conduit à leur découverte : il y a quelques trente ans, on constatait que l'infection d'un animal par *Bacillus Anthracis* (une bactérie) provoque un taux anormalement élevé de Phosphatase Alcaline (PA) dans le sang. Des études ultérieures (1976 : pour l'historique, consulter [3]) permirent d'isoler une protéine responsable du détachement de la PA (connue aujourd'hui sous le nom de PI–PLC pour PhosphatidylInositol Phospholipase C). Une controverse s'engagea alors sur le type d'interaction liant la PA à la membrane plasmique : pied peptidique (qui serait détruit par des traces de protéases dans les extraits de PI–PLC) ou lien covalent avec un lipide de la membrane. La solubilisation dans le butanol de la PA et des autres protéines sensibles à la PI–PLC avec leur ancrage permit la détermination de la structure de celui–ci telle qu'elle est explicitée dans la figure 2 (1985).

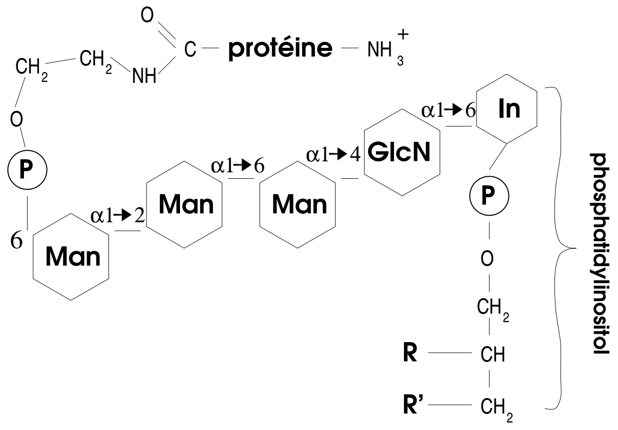

FIG. 2 - *Structure d'un ancrage GlycosylPhosphatidylInositol*

$$P = phosphate$$

$$\left.\begin{array}{lcl} Man & = & mannose \\ GlcN & = & glucosamine \\ In & = & inositol \end{array}\right\} glucides$$

$$R,\ R' = acides\ gras\ \}\ lipides$$

La biosynthèse et la maturation des protéines à GPI nécessite leur passage dans le RE et le Golgi (cf parties 1 et 3). Ce mode d'ancrage est donc spécifique aux eucaryotes. Dans l'évolution des eucaryotes, il a été particulièrement bien conservé dans sa structure ; il est très utilisé par les organismes unicellulaires (protozoaires) comme par les pluricellulaires dans tous leurs tissus et particulièrement dans les tissus épithéliaux [1] et endothéliaux [2]. Les protéines qui en sont munies ont des fonctions très variées ; en voici quelques exemples parmi les plus étudiés :

- des enzymes hydrolytiques (PA, acétylcholine estérase),
- des antigènes (Thy–1 chez les mammifères, les Glycoprotéines Variables de Surface ou VSG [4] chez les protozoaires),
- des protéines d'adhésion cellulaire (BD31 [5], protéoglycanes),
- des recepteurs membranaires (Decay Accelerating Factor DAF [6]).

1. Les cellules épithéliales tapissent toutes les surfaces des organes (par exemple, la peau, le tube digestif, les conduits de sécrétion...).
2. Les cellules endothéliales couvrent les surfaces internes du réseau sanguin.

Quelques unes de ces protéines existent sous différentes formes : ancrées par un pied GPI ou par un peptide transmembranaire, ou même sans ancrage. Si il existe une alternative à l'ancrage GPI, pourquoi a–t–il été aussi bien conservé durant l'évolution? Il présente au premier abord plusieurs avantages :

Eloignement de la membrane plasmique, ce qui favorise l'action des enzymes.

Isolement de la cellule (important pour les protozoaires) : la protéine à pied GPI n'a aucun contact avec le cytosol, donc sa destruction par une attaque extérieure ne risque pas de mettre la cellule en danger.

Détachement facile grâce à la PI–PLC ... mais les seuls cellules connues pour utiliser la PI–PLC sont des parasites qui endommagent de cette façon les cellules de leur hôte.

Densité de protéines membranaires élevée : dans les amas de protéines à pied GPI (voir partie 4), cette densité peut atteindre 30000 molécules/μm^2 [7], c'est–à–dire que les protéines sont espacées de 1 à 3 fois leur taille! Ceci fournit aux unicellulaires un manteau (porteur du glycocalyx) très étanche.

Affinité pour les lipides

Les parties 4 et 5 exposent les récentes découvertes sur l'utilisation de ces deux dernières propriétés chez les eucaryotes supérieurs, en particulier les mammifères.

3 Synthèse et acquisition du pied GPI

Le pied GPI est acquis en bloc par une protéine déjà entièrement synthétisée. Le glycosylphosphatidylinositol est préparé dans le RE [3] : sur une molécule de phosphatidylinositol (présent dans la membrane où il sert notamment de second messager), des enzymes spécifiques ajoutent successivement (voir la figure 2) :

- une molécule de *N*–acétylglucosamine hydrolysée par la suite en glucosamine (un sucre rare dans les glycosylations des protéines);
- une à une, trois molécules de mannose;
- une molécule de phosphoéthanolamine.

La chaîne peptidique en cours de traduction par les ribosomes du cytosol (à l'extérieur du RE) est introduite dans la lumière (intérieur) du RE par une machine de translocation qui reconnaît une séquence d'acides aminés particulière (appelée séquence signal du RE) [8]. À la fin de la traduction, la protéine pro–GPI est attachée transitoirement par un segment peptidique à la membrane du RE. Une deuxième séquence signal appelle la coupure de la protéine en deçà du pied peptidique transitoire et sa liaison au phosphatidylinositol préformé (il s'agit d'une transestérification à l'extrémité *C*–terminale). Trois séquences au moins sont donc nécessaires à l'acquisition d'un pied GPI : un signal d'entrée dans le RE, une séquence assez hydrophobe pour former un ancrage transitoire et un signal de fixation au GPI. Comme les autres protéines membranaires, les protéines à pieds GPI sont transportées dans l'appareil de Golgi où elles subissent des glycosylations et parviennent à maturité. Elles sont ensuite triées et envoyées vers la partie de la cellule à laquelle elles sont destinées.

4 Aiguillage et transport

C'est dans le dernier saccule de l'empilement golgien (le réseau trans–golgien) que s'opère le tri des protéines synthétisées dans le RE : certaines sont excrétées, d'autres envoyées dans différents organites ou dirigées vers la membrane plasmique. De plus, dans les cellules polarisées comme les neurones et les cellules épithéliales, les différentes parties de la membrane plasmique doivent être différentiées. Les mécanismes qui permettent ce tri sont diverses et encore mal connus. En survolant les multiples données (parfois contradictoires) aujourd'hui disponibles, tentons de comprendre comment les protéines à pied GPI parviennent à destination.

Dans les cellules épithéliales, les protéines à pied GPI peuvent être dirigées vers la partie basolatérale ou vers la partie apicale (au contact de la lumière). Le cas le plus fréquent (cellules MDCK [6]) est la localisation apicale ; mais certaines souches présentent aussi des protéines à pied GPI sur les faces latérale (protéine BD31 des hépatocytes [5]) ou basolatérale (cellules FRT [6]). Il semblerait que ce tri ne soit pas seulement la voie de livraison par défaut mais qu'il implique la présence du pied GPI et un signal dans les glycosylations de la protéine [13].

Des études sur la solubilisation par des détergents des protéines à pied GPI fournissent de nouvelles pistes : on constate que ces protéines sont solubles dans le Triton X100 [3] lorsqu'elles résident encore dans le RE et ne le sont plus lorsqu'elles atteignent l'appareil de Golgi. Ce changement de solubilité est dû, vraisemblablement, à la formation d'amas (appelés clusters) où elles s'aggrègent avec d'autres protéines et des lipides. De semblables clusters ont été isolés par immunoprécipitation [4] ou, par action de détergents, sous forme de vésicules [5]. L'analyse biochimique de ces clusters et vésicules très apparentés révèle de nombreuses protéines à pied GPI, des protéines impliquées dans la transmission de l'information dans la cellule (Protéine Tyrosine Kinase ou PTK) et des lipides. La composition lipidique de ces complexes est différente de l'ordinaire : glycérophospholipides, sphingolipides (dont 50% de GlycoSphingoLipides ou GSL) et cholestérol. Or les GSL sont connus pour "précipiter" sous forme de microdomaines dans les membranes de phospholipides artificielles [7] et le cholestérol rend les membranes plus rigides.

De ces observations se dégage le mécanisme de tri proposé par van Meer et Simons [12] : les sphingolipides, glycérophospholipides et cholestérol précipiteraient en larges plaques (les clusters isolés peuvent atteindre 100 nm de diamètre) incluant les protéines destinées à la partie apicale de la membrane plasmique qui auraient une grande affinité pour eux. Le tri se ferait donc par exclusion des autres protéines membranaires de ses zones.

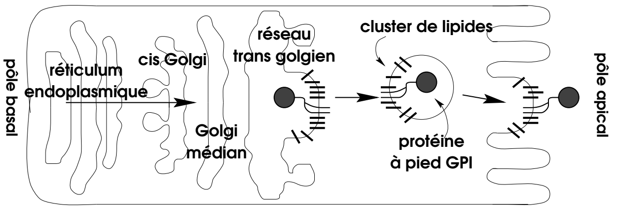

FIG. 3 - *Synthèse, tri et transport dans une cellule épithéliale d'après van Meer et Simons*

La voie normale de transport du Golgi à la membrane plasmique est la suivante : des cavités bourgeonnent dans la membrane du réseau trans–golgien sous l'action d'une protéine structurale spécialisée, la clathrine, qui se lie aux domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires (donc à l'extérieur du Golgi). Ces cavités se referment en

3. Le Triton X100 est un détergent non–ionique très doux.

4. La fixation d'anticorps sur les protéines du cluster l'alourdit suffisamment pour le faire précipiter ; diverses observations montrent que ces clusters existent sur la membrane même en l'absence d'anticorps.

5. Lambeaux de membranes qui peuvent se refermer.

vésicules entraînant les protéines triées, quittent le Golgi et viennent fusionner avec la membrane plasmique. Les protéines à pied GPI pourraient se lier à l'intérieur de ces cavités aux protéines transmembranaires et se retrouveraient ainsi livrées sur la face externe de la membrane plasmique[6]. Le modèle de Van Meer et Simons suppose que les clusters lipidiques forment leurs propres vésicules, peut–être avec l'aide d'une autre protéine structurale. Des études sur leur mobilité [14] montrent qu'une grande partie des protéines à pied GPI (de 20 à 85% selon les cas) restent agglutinées en clusters après leur livraison : serait–ce à cause de cette protéine structurale ou par simple affinité pour les lipides en clusters?

5 Caveolae : de surprenantes organelles

Les caveolae furent décrites il y a quarante ans par E.Yamada : ce sont de petites invaginations de ~100 nm de diamètre dans la membrane plasmique de certains tissus épithéliaux. Il faut attendre les travaux de Rothberg, Anderson et al [11] en 1990 pour leur découvrir une fonction. D'après l'analyse de leur composition, les caveolae ressemblent fortement aux clusters décrits précédemment (elles contiennent des protéines à pied GPI en grande concentration, du cholestérol, d'autres protéines membranaires). Elles s'en distinguent par leur forme et la présence d'une protéine structurale membranaire, la cavéoline. La cavéoline recouvre les caveolae comme la clathrine, les vésicules de transport. Et de fait, les fonctions de ces deux protéines sont similaires : la clathrine fait bourgeonner des vésicules de transport du Golgi et aussi de la membrane plasmique (c'est l'endocytose) pour permettre l'absorption de macromolécules et le recyclage de la membrane [8] ; la cavéoline provoque l'invagination des caveolae et leur fermeture[7].

Les caveolae sont plutôt adaptées à l'absorption de petites molécules ou d'ions : c'est la potocytose. Ce mécanisme a été mis en évidence sur des cellules endothéliales dans le cas du folate [15], une vitamine, que nous prendrons comme exemple. Le folate, présent à faible concentration dans le milieu extracellulaire est reconnu et fixé par un récepteur à pied GPI de la caveola. La caveola s'invagine et se ferme. Le folate se désorbe, peut–être à cause des pompes ioniques des caveolae qui abaissent le pH de la cavité. La concentration en folate dans la caveola est alors nettement supérieure à la celle du milieu extracellulaire : le folate est transporté dans le cytosol par un transporteur (qui reste à découvrir). Enfin, la réouverture de la caveola permet au récepteur de capter de nouvelles molécules de folate. La grande coopération des protéines concentrées dans la caveola rend ce processus très efficace.

Les clusters et les caveolae ouvrent de nouvelles perspectives en ce qui concerne l'utilité de l'ancrage GPI des protéines membranaires. En effet, sa nature lipidique le prédestine à une ségrégation naturelle dans les clusters qui fournissent un mode de tri original dans le réseau trans–golgien. La taille réduite et parfaitement soluble dans la membrane du phosphatidylinositol favorise par ailleurs d'extraordinaires concentrations de protéines à GPI dans de petits espaces fonctionnels : cette stratégie n'est pas sans rappeler celle des complexes enzymatiques développés par les eucaryotes supérieurs pour optimiser l'efficacité de leurs voies de biosynthèse (on pense par exemple au complexe Pyruvate Déshydrogénase et aux protéasomes). La fidèle conservation de ce type d'ancrage dans l'évolution serait peut–être due à la puissante coopération des protéines qu'il rassemble. Gageons que les multiples études menées aujourd'hui sur ce sujet aussi nouveau que florissant nous donneront de nouvelles occasions de nous émerveiller sur l'inventivité de la nature.

6. On sait par ailleurs qu'une partie des protéines à pied GPI emprunte les voies vésiculaires classiques d'endocytose, mais les récepteurs qui les y entraînent sont inconnus

7. On ne sait pas encore si les caveolae se détachent de la membrane plasmique ; vraisemblablement, elles ne font que se fermer transitoirement car elles sont instables.

Références

[1] Sj singer *et al.* (1972), *Science*, 175, 720:31

[2] Mw gray (1989), *Trends Genet.*, 5, 294:9

[3] Mg low (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 988, 427:54

[4] Maj ferguson (1994), *Parasit. Today*, 10, 48:52

[5] M rabino (1994), *J. Cell Sc.*, 107, 1413:28

[6] C zurzolo *et al.* (1994), *EMBO J.*, 13, 42:53

[7] Da brown (1992), *Trends Cell Biol.*, 2, 338:43

[8] B ALBERTS *et al.*, *Biologie Moléculaire de la cellule*, Médecine–Sciences Flammarion (1994)

[9] DP CERNEUS *et al.* (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 3150:5

[10] T CINEK *et al.* (1992), *J. Immunol.*, 149, 2262:70

[11] RGW ANDERSON (1993), *Curr. Biol.*, 5, 647:52

[12] K SIMONS *et al.* (1990), *Cell*, 62, 207:10

[13] P MORAN (1992), *J. Cell Biol.*, 119, 763:72

[14] DL KOOYMAN (1995), *Science*, 269, 89:92

[15] KG ROTHBERG *et al.* (1990), *J. Cell Biol.*, 110, 637:49