

## Arrangement physique des lipides membranaires susceptibles d'être utilisés par les processus d'adressage cellulaire des protéines

par Claude Wolf\*, Peter Quinn\*\*, Kamen Koumanov\*<sup>\*\*\*</sup>, Claude Chachaty\* et Boris Tenchov<sup>\*\*\*</sup>

\*Biochimie, CHU Saint-Antoine-CNRS, 27, rue de Chaligry, Paris 75012, France. \*\*Biochemistry Department, King's College, Campden Hill Rd., London W8 7AH, Grande Bretagne. \*\*\*Laboratoire de Biophysique, Académie Bulgare des Sciences, 1113 Sofia, Bulgarie.

Reçu le 15 janvier 1999

### RÉSUMÉ

Le rôle des domaines lipidiques distincts au sein de la matrice membranaire capables de servir de zone d'ancrage pour certaines protéines, est évoqué par de nombreuses observations biologiques. Les protéines glypiées (liées au glycosyl-phosphatidylinositol), palmitoylées et myristoylées présentent des chaînes grasses saturées susceptibles d'interagir avec la phase lamellaire ordonnée (Lo) constituée par les sphingolipides saturés et le cholestérol membranaire. La distribution focalisée de ces protéines sur la surface cellulaire, leur localisation identique à celle des sphingo(glyco)lipides saturés ou au contraire la dispersion de leur distribution hétérogène lorsque le cholestérol membranaire est extrait par un traitement à la méthylcyclodextrine ont confirmé l'existence *in vivo* de ces domaines membranaires.

L'étude par diffraction des rayons X d'un mélange quaternaire de lipides d'origine naturelle

(phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine, sphingomyéline et cholestérol dans le rapport molaire 1/4/3/3) permet de conforter l'hypothèse de la ségrégation d'un domaine lamellaire distinct produit par l'interaction préférentielle de la sphingomyéline et du cholestérol. L'arrangement interdigité de ce domaine Lo est évoqué par la faible distance répétitive. Les conditions physiques (température de l'ordre de la température physiologique) et chimiques (la composition du mélange lipidique riche en phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine, la présence favorable de calcium, la stéréospécificité de l'interaction entre le stérol et la sphingomyéline, l'asymétrie des chaînes grasses de ce dernier lipide) et la réversibilité de la ségrégation de phases suggèrent fortement la formation *in vivo* de tels domaines à la face interne de la membrane plasmique et leur interdigitation avec les domaines correspondant à la face extracellulaire.

### INTRODUCTION

Les divergences avec le modèle des membranes biologiques dit en « mosaïque fluide » supposant un mélange idéal des lipides (21) sont le résultat d'expériences biochimiques révélatrices (activités enzymatiques hétérogènes, sous-fractionnement membranaire en présence de détergent non ionique à froid, extraction sélective du cholestérol membranaire). Mais les observations physiques directes de l'hétérogénéité des membranes biologiques restent rares (2). Les observations biologiques ont pourtant suscité de nombreuses mesures biophysiques pour tenter de mettre en évi-

dence des domaines membranaires distincts dans les conditions physiologiques. Leur existence n'a pu être confirmée que dans certains cas seulement, et notamment par spectrométrie de résonance électronique (RPE) ou par la cinétique de restauration de la fluorescence après photoblanchissement laser (FRAP) (8, 15). Le problème théorique de l'adéquation entre le temps (très court) pendant lequel les molécules lipidiques restent en interaction avant d'être séparées par la diffusion latérale à 37°C et la fenêtre de temps requise pour les observations spectroscopiques ( $10^{-4}$  à  $10^{-2}$  s pour la RMN du proton jusqu'à  $10^{-4}$  s pour la RPE) est à l'origine de difficultés expérimentales fré-



quentes (voir la discussion présentée par 5). Quelques observations physiques qui utilisent les méthodes spectroscopiques adaptées ont cependant réussi à conforter l'opinion des biologistes que ces domaines existent bien *in vivo* (par quenching de fluorescence (1)). La dimension extrêmement réduite de ces domaines estimée par transfert d'énergie de fluorescence est inférieure à 70 nm, ce qui ajoute encore une difficulté pour leur observation directe (23).

Le regroupement des microdomaines lipidiques peut être observé par immunofluorescence après leur pontage par des anticorps multivalents (anti-phosphatase alcaline, anti-hémagglutinine d'*Influenza virus*) ou par une toxine (toxine cholérique spécifique du ganglioside GM1). On retrouve alors une distribution superficielle identique pour toutes les protéines membranaires partageant la même affinité pour la phase lipidique liquide ordonnée (Lo) enrichie en cholestérol et en sphingolipides saturés (9). Les récepteurs à la transferrine ou aux lipoprotéines LDL, qui ne sont pas associés à ces microdomaines Lo, ont une distribution complémentaire, ce qui illustre bien la ségrégation des domaines membranaires. Lorsque les membranes sont appauvries en cholestérol par une extraction sélective par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, on ne retrouve plus la localisation focalisée des constituants liés aux microdomaines Lo.

Les études physico-chimiques des constituants des microdomaines présentés ici ont pour but final de comprendre comment les particularités structurales des lipides peuvent rendre compte de leur association stable dans les conditions physiologiques. Le caractère saturé de la très longue chaîne grasse amidifiant les sphingolipides naturels rend déjà bien compte de leur température de transition gel/fluide ( $T_m$ ) exceptionnellement élevée par rapport aux glycérophospholipides membranaires polyinsaturés. La température de transition gel/fluide ( $T_m$ ) est supérieure à la température physiologique pour la plupart des espèces moléculaires naturelles de sphingomyéline. Plus de 11 % des espèces moléculaires de sphingomyéline du jaune d'œuf ont une inégalité de longueur de plus de 6 carbones et plus de 37 % dans la sphingomyéline extraite du cerveau de bœuf. La grande inégalité de longueur de chaîne grasse entre la sphingosine et l'acide gras provoque la formation d'une phase lamellaire interdiguée et une ségrégation de microdomaines de sphingolipides à une température inférieure à  $T_m$ . Ces microdomaines s'étendent latéralement dans la monocouche et transversalement après interdigitation des chaînes grasses entre les deux feuillettes de la bicouche. Ces microdomaines peuvent être détectés par FRAP au sein même d'un mélange comportant une phosphatidylcholine de même température de transition (9).

Une étude détaillée par RPE a démontré que l'interaction entre le cholestérol et la sphingomyéline est plus stable que celle entre le cholestérol et les glycérophospholipides (10). Cette étude a montré également que les glycérophospholipides anioniques (phosphatidylsérine et phosphatidylglycérol) sont associés au

cholestérol avec une énergie d'interaction encore plus grande que les glycérophospholipides neutres. Dans ces mélanges binaires sphingomyéline/cholestérol ou glycérophospholipide saturé/cholestérol, on observe un diagramme de phases comprenant trois régions en fonction de la température; une phase liquide désordonnée ( $L\alpha$ ), une phase liquide ordonnée ( $L\alpha$ ) et un domaine intermédiaire étendu où les 2 phases coexistent. L'intervalle de température où les 2 phases coexistent, s'étend jusqu'à une température très supérieure à la température de transition du phospholipide pur (par exemple, jusqu'à 85°C dans le cas de la sphingomyéline extraite du cerveau de bœuf). L'hétérogénéité du mélange binaire cholestérol/lécithine saturée (dipalmitoyl phosphatidylcholine) a été aussi démontrée à l'aide d'un phospholipide marqueur de spin biradicalaire à des températures très supérieures à  $T_m$  (60°C pour ce phospholipide pour lequel  $T_m$  est 41°C) (11).

Ces travaux suggèrent l'établissement d'une liaison par pont hydrogène entre l'hydroxyle du cholestérol et le groupe carbonyle en position 2 du phospholipide. Entre le cholestérol et la sphingomyéline le groupe amide accepteur jouerait un rôle important dans l'interaction préférentielle avec l'hydroxyle du stérol (12). On peut suggérer aussi que le rôle stabilisant des interactions van der Waals entre les chaînes grasses étendues (*all-trans*) du sphingolipide en dessous de  $T_m$  et la face  $\alpha$  du polycycle est augmentée par l'inégalité de longueur des chaînes qui favorise l'insertion du cholestérol. Dans les observations qui suivent, on montrera que l'interaction avec le cholestérol favorise l'interdigitation de ces chaînes grasses de longueur inégale.

La spécificité de cette interaction sphingomyéline-cholestérol servirait donc de «moteur» pour la formation des microdomaines Lo. On a vérifié par une méthode enzymatique que l'addition de sphingomyéline à un mélange binaire phosphatidylsérine/phosphatidyléthanolamine (1/4 : mole/mole) inhibe effectivement l'activité d'une phospholipase A2 exogène (13). L'enzyme se retrouve alors liée sur les domaines enrichis en sphingolipide. L'addition de cholestérol libère l'enzyme et supprime l'effet inhibiteur. La spécificité de l'interaction a pu être démontrée par une comparaison avec la D-dipalmitoylphosphatidylcholine qui ne provoque pas d'inhibition de l'enzyme (12).

Le mélange ternaire phosphatidylsérine/phosphatidyléthanolamine/sphingomyéline (PS/PS/SM) constitue un mélange hétérogène peu stable dont l'hétérogénéité est considérablement augmentée et stabilisée en présence de cholestérol. L'organisation de cette phase liquide ordonnée enrichie en cholestérol au sein du mélange quaternaire est réversible en fonction de la température. Elle est spécifique de la structure du polycycle stérolique. Ces caractères représentent l'indice qu'il s'agit du phénomène de ségrégation de phases lamellaires identique à celui qui donne naissance aux microdomaines Lo dans les membranes plasmiques. La caractérisation par diffraction des rayons X suggère qu'il s'agit d'une phase interdiguée.



## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les mélanges lipidiques sont réalisés à partir de phospholipides purifiés d'origine naturelle (PE et SM du jaune d'œuf, PS de cerveau de bœuf) obtenus commercialement (Sigma-Aldrich Chimie sari, L'Isle D'Abeau Chesnes, 38297 St.-Quentin Fallavier, France). Ces mélanges sont hydratés pendant plusieurs jours à une température supérieure à  $T_m$  par un tampon aqueux (eau/lipide : 2/1 : poids/poids) 100 mM Tris H Cl pH 8 et en présence de 10 mM de calcium.

Les diffractogrammes de rayons X aux petits angles et aux grands angles ont été obtenus sur les sites des synchrotrons de Daresbury (Grande Bretagne) ou de Hambourg (Allemagne).

## RÉSULTATS

1) Les mélanges binaire PE/PS (4/1 : mole/mole) et ternaire PE/PS/SM (4/1/2 : mole/mole) sont hétérogènes dans un intervalle large de température autour de 37°C.

L'hétérogénéité du mélange binaire PE/PS en présence de calcium (Fig. 1) consiste en 3 phases qui coexistent jusqu'à environ 30°C : une phase lamellaire avec une distance répétitive très courte ( $d_{\text{lam}}^{\text{lam}}$ ) de 5,2 nm, une phase hexagonale inversée  $H_{II}$  de  $d_{\text{lam}}^{\text{hex}}$

6,0 nm et une phase cubique dont l'arrangement possible  $Pn3m$  est compatible avec une  $d_{\text{lam}}^{\text{cub}}$  de 11,6 nm. La phase hexagonale inversée  $H_{II}$  disparaît à une température inférieure à 30°C pour fusionner avec la phase lamellaire. Cet arrangement est caractéristique de la phosphatidyléthanolamine insaturée au dessus de la température de transition gel-fluide. La phase lamellaire dont la distance répétitive est courte est attribuée à la phosphatidylsérine complexée par le calcium. La phase cubique apparaît comme une phase métastable après un chauffage initial du mélange lipidique au-delà de 60°C et subsiste jusqu'à une température très basse (vers 10°C).

Dans le mélange ternaire PE/PS/SM (Fig. 2) la grande polymorphie du mélange binaire se réduit à deux phases lamellaires coexistant jusqu'à 40°C. L'hétérogénéité très discrète de ce mélange de deux phases lamellaires ségréguées ne peut être détectée que par un élargissement de la tache de diffraction aux petits angles centrée sur la  $d_{\text{lam}}^{\text{lam}}$  de 6,3 nm. L'enregistrement simultané d'un pic de diffraction aux grands angles correspondant à l'arrangement quasi-hexagonal des chaînes grasses à l'état gel, montre que la coexistence des deux phases lamellaires de distance répétitive très proche s'observe lorsque la sphingomyéline du mélange reste (au moins en partie) sous forme gel au dessous de 40°C. L'hétérogénéité consiste donc en une ségrégation des lamelles de SM (espèces moléculaires de haut poids moléculaire) sous forme gel (L $\beta$ )

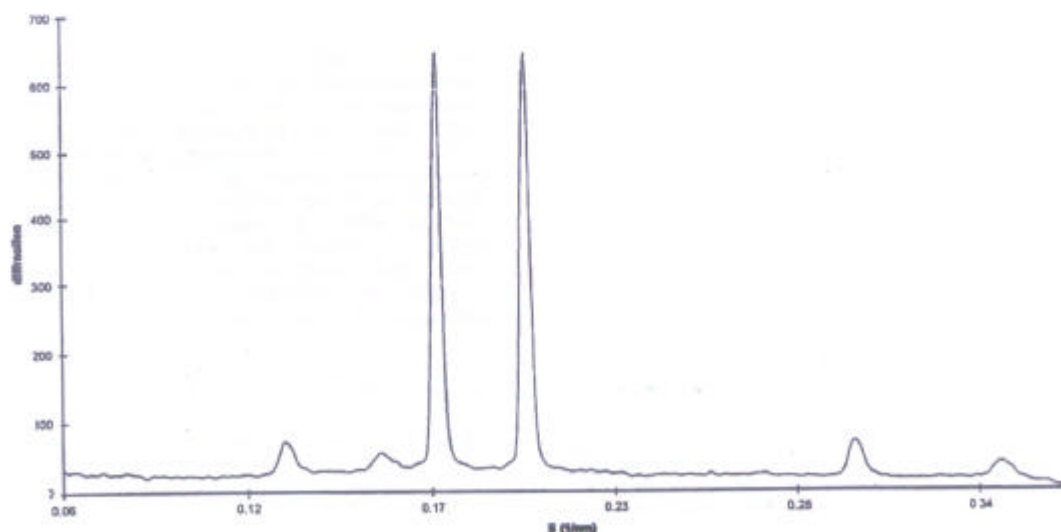


Fig. 1. - Diffraction des rayons X aux petits angles par le mélange phosphatidyléthanolamine/phosphatidylsérine (4/1 : mole/mole) hydraté (lipide/eau 50 % : p/p) en présence de calcium (10 mM). L'enregistrement de l'intensité des taches de diffraction est réalisé à 36°C en fonction des distances réciproques  $S$  exprimée en  $\text{nm}^{-1}$ . Trois phases coexistent : L'arrangement cubique apparaît après un préchauffage à 60°C de l'échantillon et donne les taches de diffraction à 0,125 et 0,15  $\text{nm}^{-1}$ , l'arrangement hexagonal inversé ( $H_{II}$ ) est observé au dessus de 25°C et donne les taches à 0,17, 0,30 et 0,35  $\text{nm}^{-1}$  et l'arrangement lamellaire donne la tache de diffraction à 0,19  $\text{nm}^{-1}$ .

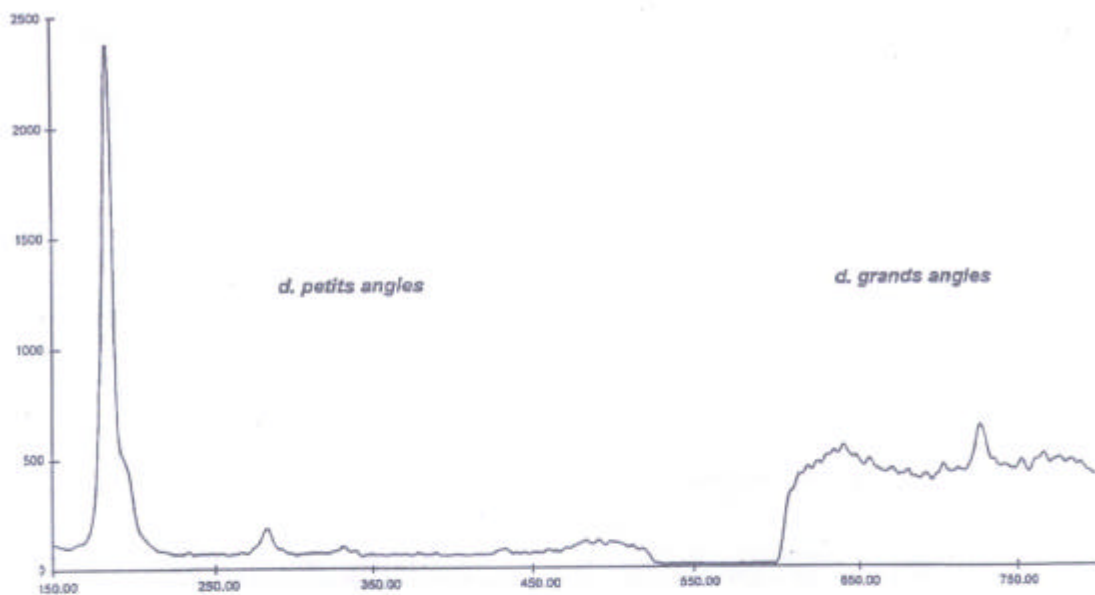


Fig. 2. — Diffraction des rayons X aux grands angles et aux petits angles par le mélange phosphatidyléthanolamine/phosphatidylsérine/sphingomyéline (4/1/2 : mole/mole) hydraté (lipide/eau 50 % : p/p) en présence de calcium (10 mM) à 36° C. Deux phases lamellaires coexistent: L'arrangement lamellaire majoritaire donne la tache de diffraction à 0,158 nm<sup>-1</sup> (canal 180 du détecteur indiqué sur l'axe des abscisses) et l'arrangement minoritaire donne une tache de diffraction non résolue à la base de la tache majoritaire dans le canal 200 et une tache de diffraction aux grands angles à 2,5 nm<sup>-1</sup> (canal 700) correspondant à l'arrangement gel des chaînes grasses.

*Lamelles*

et des lamelles fluides (L<sub>α</sub>) de PE/PS/SM de faible poids moléculaire. L'épaisseur des lamellaires hydratées de N-palmitoyl sphingomyéline pure constituant environ 78 % de la sphingomyéline du jaune d'œuf utilisée a été estimée antérieurement à 7,3 nm à 29° C (15) et à 6,6 nm à 55° C. Ces valeurs obtenues pour le lipide synthétique indiquent donc des distances répétitives sensiblement plus longues que celles que nous obtenons. Nous attribuons cette différence (+ 1 nm sous forme gel et + 0,3 nm sous forme fluide) à une diminution de la couche d'hydratation du sphingolipide dont la largeur est mesurée pour le lipide synthétique isolé à 2,2 nm et qui serait ici réduite dans le mélange par le calcium en interaction avec la PS. D'autre part, l'hétérogénéité de la tache de diffraction (dont la demi-largeur atteint ± 0,9 nm) autorise à considérer ici une juxtaposition de phases dont la distance répétitive se situerait entre 7,2 nm et 5,4 nm (6,3 ± 0,9 nm).

2) L'addition de cholestérol au mélange ternaire en quantité stœchiométrique avec la sphingomyéline (PE/PS/SM/CHOL: 4/1/2/2: mole/mole) induit une très nette séparation de deux phases lamellaires résolue par diffraction des rayons X aux petits angles sous la forme de deux taches distinctes de diffraction (6,3 nm et 5,5 nm à 30° C) (Fig. 3). Cette hétérogénéité peut être détectée jusqu'à 37° C par deux taches

distinctes et par une tache élargie au delà de cette température.

Nous attribuons cette séparation de deux phases lamellaires d'épaisseurs différentes à l'effet du cholestérol associé à la sphingomyéline. Nous vérifions cette interaction par la disparition dans le domaine des grands angles de la diffraction correspondant à l'arrangement quasi-hexagonal (distance répétitive 0,4 nm) des chaînes grasses de la SM. Il a été démontré antérieurement que le cholestérol diminue l'épaisseur de la bicouche hydratée de sphingomyéline pure sous forme gel, en réduisant aussi bien l'épaisseur de la couche d'hydratation (- 0,44 nm) que celle du lipide (- 0,44 nm) (15). Par contre, l'effet du cholestérol est très modéré sur la N-palmitoyl sphingomyéline fluide au dessus de 41° C (respectivement - 0,30 nm et + 0,16 nm sur la couche d'hydratation et sur l'épaisseur de la bicouche lipidique, soit au total - 0,14 nm). De plus nous suggérons l'émergence d'une interdigitation des chaînes grasses qui diminue très sensiblement l'épaisseur de la bicouche de SM/CHOL. Dans ces conditions, la séparation de la phase sphingomyéline/cholestérol devient résolue en dessous de la température de fusion des chaînes grasses de la sphingomyéline, c'est à dire lorsque l'épaisseur de la bicouche devient sensiblement inférieure à celle de la bicouche glycérophospholi-



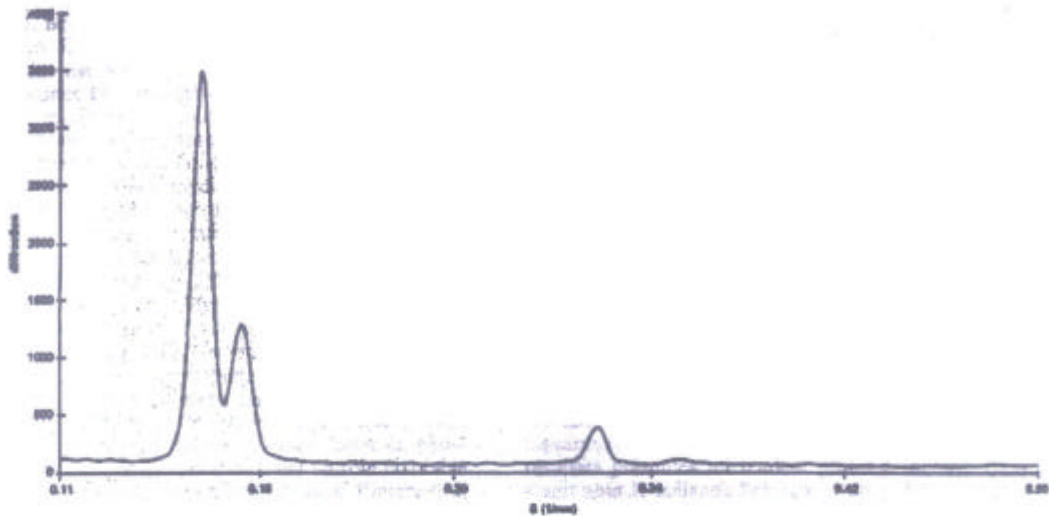


Fig. 3. - Diffraction des rayons X aux petits angles par le mélange quaternaire phosphatidyléthanolamine/phosphatidylsérine/sphingomyéline/cholestérol (4/1/2/2: mole/mole) hydraté (lipide/eau 50 %: p/p) en présence de calcium (10 mM). L'enregistrement est réalisé à 36° C mais les deux phases lamellaires coexistent et sont résolues jusqu'à plus de 37° C. L'arrangement lamellaire principal correspond à 0,16 nm<sup>-1</sup> et un arrangement dont la distance répétitive diminue avec la température (0,17 nm<sup>-1</sup> à 36° C) est attribué à la phase lamellaire interdiguée (cf. Résultats). Aucun pic de diffraction aux grands angles n'est observé.

pides/cholestérol. Les deux pics de diffraction « fusionnent » au delà de 37° C compte tenu de la résolution dont nous disposons (Fig. 3).

#### DISCUSSION

L'association préférentielle de certaines protéines avec les microdomaines liquide-ordonnés (Lo) membranaires peut être évoquée sur la base de nombreuses expériences biologiques et biochimiques réalisées *in vivo*. L'interprétation de ces expériences peut être utilement complétée par l'observation physique directe de ces domaines. Ces observations ne peuvent être réalisées actuellement dans de bonnes conditions qu'à l'aide de « membrane-modèle » *in vitro*. Cette approche nécessite que les mélanges lipidiques soit un reflet « réaliste » d'une partie de la membrane et que la structure chimique des lipides, à elle seule, c'est-à-dire en dehors des associations aux protéines membranaires, suffise pour la mise en place des microdomaines Lo. Si cette condition est remplie *in vitro*, il est possible de montrer que l'association spécifiques des lipides membranaires qui permet la formation des microdomaines, précède *in vivo* l'adressage sélectif des protéines.

Les observations par diffraction des rayons X qui sont présentées ci-dessus confirment effectivement qu'au sein d'un mélange de lipides d'origine naturelle

... ~~représenter un~~ ... ?

pouvant représenter d'un domaine enrichi en sphingomyéline de la face interne de la membrane plasmique, une phase liquide-ordonnée Lo peut être observée en présence de cholestérol. L'existence et l'importance métabolique de tels domaines sur la face cytoplasmique ont été récemment démontrées *in vivo* dans le mécanisme de l'apoptose (2, 4). Les dimensions et l'arrangement de ces domaines permettent leur mise en évidence sur les diffractogrammes du mélange modèle des lipides lorsque la température est proche de la température de transition gel/fluide de la sphingomyéline. On remarque que cette température est elle-même proche ou légèrement supérieure à la température physiologique pour la plupart des espèces animales et des espèces moléculaires de sphingolipides. L'extension latérale de ces domaines qui permet la coordination de l'arrangement des lipides et la diffraction est permise ici par la grande instabilité du mélange tertiaire utilisé (PE/PS/SM).

Nous avons vérifié que l'inclusion dans le mélange lipidique de phosphatidylcholine insaturée en remplacement de la sphingomyéline ne permet pas d'observer la ségrégation de la phase Lo dans les diffractogrammes. L'addition de ce phospholipide maintient une phase lamellaire unique pour le mélange dans tout l'intervalle de températures étudié. Nous vérifions également que la substitution du cholestérol par son précurseur immédiat le 7-déshydrocholestérol qui comporte une double liaison supplémentaire dans le

cycle B, ne permet pas d'observer la séparation de la phase Lo. L'association du cholestérol et de la sphingomyéline est donc spécifique et suffisante pour que les domaines Lo s'organisent. L'environnement membranaire intervient en modifiant la partition du cholestérol et l'équilibre de phase qui résulte des préférences de phase des différents lipides. L'environnement intervient aussi par l'intermédiaire de l'ion calcium fixé sur le phospholipide anionique du mélange (ici, la phosphatidylsérine). Le calcium pourrait agir en réduisant l'hydratation des lamelles lipidiques, ce qui favorise l'émergence sur les diffractogrammes d'une phase lamellaire d'épaisseur réduite. Le phospholipide anionique du mélange renforce également l'interaction avec le cholestérol (18). On remarque que les portions membranaires dites « résistantes » aux détergents non ioniques qui sont supposées représenter les microdomaines Lo, sont enrichies *in vivo* non seulement en sphingolipides et en cholestérol, mais aussi en phosphatidylinositol, ce qui pourrait jouer un rôle favorable pour la partition du cholestérol et pour l'interaction avec le calcium au moment de l'activation cellulaire (accroissement du calcium cytoplasmique) (7).

L'association des protéines membranaires avec ces domaines Lo est réalisée par l'intercalation des chaînes grasses saturées des copules lipidiques (chafnes

acylées en C14 et en C16 et GPI) (20). Un mode différent d'association entre protéine et domaine Lo est évoqué pour l'association de la séquence *trans*-membranaire de l'hémagglutinine d'*Influenza* dépourvue de lipides et la membrane du pôle apical des cellules infectées (10). Cette association pourrait résulter de l'adéquation « parfaite » entre la longueur effective de la séquence hydrophobe et l'épaisseur de la bicouche dans les domaines Lo. Cette possibilité a été développée de manière théorique à partir de plusieurs exemples de la littérature et évoque la possibilité d'un transfert progressif des protéines vers la membrane la plus riche en cholestérol à partir de l'appareil de Golgi (14). Cependant les estimations en fonction de la teneur membranaire en cholestérol sont indirectes (16) et les données de la littérature (13) ne permettent pas encore de penser que l'accumulation de cholestérol dans un domaine membranaire provoque systématiquement un épaississement de la bicouche. Les résultats présentés ici tendent plutôt à montrer qu'il s'agit pour le mélange lipidique d'un « amincissement » de l'épaisseur de la bicouche. Les mesures prévues prochainement où la séparation de phases lamellaires sera testée en présence de protéines virales de Rotavirus permettra peut être de lever cette contradiction.

**SUMMARY** Phase-separated membrane lipids could participate in protein sorting: evidences for cholesterol induced domains

Detection of immiscible lipid domains in biological membranes offers an alternative support to protein sorting. Liquid ordered domains ("rafts") comprising cholesterol and saturated sphingolipids incorporate saturated glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored or acylated (palmitoyl- and myristoyl-) proteins or particular transmembrane protein sequences. These lipid domains can be isolated in the form of Detergent resistant membranes (DRM) from biological plasma membrane preparations. Caveolae appear to be a differentiated fraction of plasma membranes comprising such numerous cross-linked microdomains associated with caveolin in different cell types. While the biological relevance of such membrane domains is evidenced *in vivo* by co-patching of proteins sharing the identical affinity for sphingolipids and by the disruption of co-patching following cell cholesterol depletion, only a few physical studies confort the principle of membrane heterogeneity.

Results are now presented where cholesterol addition in a tertiary lipid mixture forces out

phase-separation, as a realistic model where the lipid segregation can promote protein sorting to the segregated Lo phase. A lipid mixture comprising phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin of natural origin in the ratio (1/4/3: mole/mole) has been rendered neatly heterogeneous after the addition of cholesterol (27 mole %). Xray diffraction (Small angle Xray scattering) showed the splitting of two neatly resolved lamellar diffractions in the presence of cholesterol. Above 37° C the heterogeneity was traceable by a broadened diffraction spot up to the complete gel-to-liquid transition of sphingomyelin at temperatures > 40° C where the spot became again symmetrical and narrow. The large temperature range where the immiscible lamellar phases are detected, the specific requirement for cholesterol association with sphingomyelin, the positive influence of calcium and the reversibility of domain formation support the occurrence for such domains at the inner side of the plasma membrane whereon lipids-bound proteins concentrate.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Ahmed S. N., Brown D. A. & London E., On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*, 1972, 36, 10944-10953.
2. Andrieu N., Carpentier S., Salvayre R. & Levasse T., The tumour necrosis factor-sensitive pool of sphingomyelin is resynthesized in a distinct compartment of the plasma membrane. *Biochem. J.*, 1998, 333, 91-97.
3. Bar L. K., Barenholz Y. & Thompson T. E., Effect of sphingomyelin composition on the phase structure of phosphatidylcholine-sphingomyelin bilayers. *Biochemistry*, 1997, 36, 2507-2516.
4. Beltaieb A., Record M., Come M. G., Bras A. C., Chap H., Laurent G. & Jaffezeu J. P. *Blood*, 1996, 88, 1465-1472.
5. Bittman R., Kasireddy C. R., Mattjus J. P. & Slotte J. P., Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles. *Biochemistry*, 1994, 33, 11776-11781.
6. Bloom M. & Thewalt J. L., Time and distance scales of membrane domain organization. *Mol. Membr. Biol.*, 1995, 12, 9-13.
7. Brown D. A. & London E., Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1998, 14, 111-136.
8. Dupou L., Lopez A. & Tocanne J. F. *Eur. J. Biochem.*, 1988, 171, 669-674.
9. Harder T., Scheiffele P., Verkade P. & Simon K., Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.*, 1998, 141, 929-942.
10. Keller P. & Simons K., Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.*, 1998, 141, 1357-1367.
11. Koumanov K., Wolf C. & Bérézziat G., Modulation of human type II secretory phospholipase A2 by sphingomyelin and annexin VI. *Biochem. J.*, 1997, 326, 227-233.
12. Koumanov K., Quinn P. Q., Bérézziat G. & Wolf C., Cholesterol relieves the inhibitory effect of sphingomyelin on type II secretory phospholipase A2. *Biochem. J.*, 1998, 336, 625-630.
13. Maulick P. R. & Shipley G. G., N-Palmitoyl sphingomyelin bilayers: structure and interactions with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochemistry*, 1996, 35, 8025-8034.
14. Munro S., An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J.*, 1995, 14, 4695-4704.
15. Needham L., Finnegan I. & Houslay M. D., *FEBS Lett.*, 1985, 183, 81-86.
16. Ren J., Lew S., Wang Z. & London E., Transmembrane orientation of hydrophobic  $\alpha$ -helices is regulated both by the relationship of helix length to bilayer thickness and by the cholesterol concentration. *Biochemistry*, 1997, 36, 10213-10220.
17. Sankaram M. B. & Thompson T. E., Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*, 1990, 29, 10670-10675.
18. Sankaram M. B. & Thompson T. E., Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*, 1990, 29, 10670-10675.
19. Sankaram M. B. & Thompson T. E., Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 8686-8690.
20. Schroeder R., London E. & Brown D., Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and GPI-anchored proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 12130-12134.
21. Singer S. J. & Nicolson G. L., The fluid mosaic model of cell membranes. *Science*, 1972, 175, 720-731.
22. Tocanne J. F., Detection of lipid domains in biological membranes. *Comments Mol. Cell. Biophys.*, 1992, 8, 53-73.
23. Varma R. & Mayor S., GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, 1998, 394, 798-801.