

Le phosphatidylglycérol est le précurseur de la biosynthèse *de novo* de l'acide lysobisphosphatidique

F. Hullin-Matsuda^{1,2}, M. Murate¹, K. Kawasaki³, M. Lagarde², M. Nishijima³
and T. Kobayashi^{1,2}

¹ Sphingolipid Functions Laboratory, RIKEN, Wako-shi, Japan, ² UMR 585 INSERM/INSA, Villeurbanne, France, ³ Dept Biochemistry and Cell Biology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

Tel. : 048 467 9628 - Fax. : 048 467 9626

E-mail : hullin-matsuda@riken.jp

Résumé :

L'acide lysobisphosphatidique (LBPA) est un phospholipide particulier retrouvé enrichi dans les membranes internes des endosomes tardifs. Il joue un rôle crucial dans le remodelage de ces organelles, en particulier dans le transport intracellulaire du cholestérol. Peu de choses sont connues sur ses mécanismes de biosynthèse. Nous avons étudié la synthèse *de novo* du LBPA dans des lignées cellulaires thermo-sensibles déficientes en phosphatidylglycérophosphate synthase (PGP synthase), l'enzyme qui catalyse la première étape de la biosynthèse du phosphatidylglycérol (PG) et du cardiolipide (CL). Les cellules mutantes présentent une réduction significative du taux de synthèse du PG et du LBPA, ainsi que de leur contenu intracellulaire. De plus, les transformants transfectés avec le gène de la PGP synthase montrent une synthèse accrue du LBPA comparativement aux cellules mutantes et parentales. Nos résultats démontrent donc que le taux de biosynthèse et le contenu intracellulaire en LBPA sont étroitement corrélés à ceux du PG et donc que ce dernier est bien le *de novo* précurseur du LBPA. Comme la biosynthèse du PG est principalement localisée au niveau des mitochondries alors que le LBPA n'est retrouvé que dans les endosomes tardifs, il existe donc un transport lipidique actif de la mitochondrie aux endosomes tardifs.

Abstract :

Lysobisphosphatidic acid (LBPA) is a unique lipid enriched in the internal membranes of late endosomes. It plays a crucial role in the dynamic properties of these organelles and in particular, in the intracellular transport of cholesterol. Little is known about its biosynthesis. In order to study the *de novo* biosynthesis of LBPA, we used a temperature-sensitive Chinese hamster ovary (CHO) cell line mutant, PGS-S, which is defective in phosphatidylglycerophosphate synthase (PGP synthase) activity, which catalyzes the first step in the phosphatidylglycerol (PG) and Cardiolipin (CL) biosynthetic pathway. The defective mutant exhibits reduction in biosynthesis rate and cellular content of PG and CL. Interestingly, the PGS-S mutants transfected with the PGP synthase cDNA, *PGSI*, exhibited an increase of LBPA biosynthesis compared to the PGS-S mutants and CHO-K1 wild type. Our results show that both biosynthesis and content of LBPA are strongly correlated to those of PG, and thus indicate that PG is likely to be the *de novo* precursor of LBPA. Since PG biosynthesis and content are mainly restricted to mitochondria, the maintenance of LBPA in late endosome internal membranes might require an active lipid transport from mitochondria to late endosomes.

Introduction :

L'acide lysobisphosphatidique (LBPA) aussi appelé bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), est un phospholipide particulier enrichi dans les membranes internes des endosomes tardifs où il participerait à la régulation du transport intracellulaire du cholestérol (1,2). Les endosomes

tardifs contiennent tout un système complexe de membranes internes impliquées dans la dégradation et le recyclage des protéines et des lipides. Au cours du processus d'endocytose, ces organelles fonctionnent non seulement comme des étapes obligatoires pour les molécules destinées à être dégradées (lipoprotéines de basse densité LDL, facteurs de croissance..) , mais aussi comme un compartiment majeur dans le tri protéique et/ou le trafic membranaire. Il est de plus en plus évident que certains lipides ne sont pas distribués de façon homogène dans les membranes endosomales contribuant ainsi à la formation d'une mosaïque de domaines membranaires structuraux et fonctionnels (3).

Le LBPA représente environ 1% des phospholipides totaux cellulaires et plus de 15% des phospholipides des endosomes tardifs. C'est un isomère structural du phosphatidylglycérol (PG). Toutefois, il possède une stéréoconfiguration très particulière : sn-1-glycérophospho-sn-1'-glycérol, le rendant résistant à l'action de la plupart des phospholipases. Malgré de nombreuses études, peu de choses sont connues sur les propriétés et la biosynthèse du LBPA. Toutefois, le taux de LBPA a pu être augmenté dans des cellules cultivées en présence de PG exogène (4), suggérant que ce dernier soit un précurseur pour la biosynthèse du LBPA.

Résultats :

Afin de trancher sur l'identité du précurseur naturel du LBPA, nous avons utilisé des lignées cellulaires CHO (Chinese Hamster Ovary) déficientes en PGP synthase , PGS-S (5,6). La phosphatidylglycérophosphate synthase (PGP synthase) catalyse la réaction nécessaire à la synthèse du phosphatidylglycérol (PG) qui sert de précurseur métabolique au cardiolipide (CL) retrouvé principalement dans la membrane des mitochondries. Ces cellules mutantes ont une activité PGP synthase thermosensible puisque des cellules cultivées à 33°C et 40°C, présentent une activité de l'ordre de 14 % et 1%, respectivement, comparativement à celle de la lignée sauvage CHO-K1. Ces mutants présentent aussi un défaut de synthèse de PG et CL ainsi qu'un défaut de croissance cellulaire, qui sont dans les 2 cas sensibles à la température.

A- Défaut de biosynthèse du LBPA dans les mutants PGS-S :

Après marquage des cellules avec du phosphore ³²P pendant différents temps et à différentes températures ainsi qu'à 33°C et 40°C, nous avons pu montrer que la biosynthèse du LBPA et son contenu intracellulaire sont diminués significativement comparativement aux cellules parentales (diminution de la biosynthèse de 70 % à 33°C et complète inhibition aux temps précoces de biosynthèse à 40°C). De plus, la synthèse et le contenu intracellulaire en PG sont corrélés à ceux du LBPA..

B- Restauration de la biosynthèse du LBPA dans les transformants PGS-S /cPGS1

Les transformants transfectés avec le gène de la PGP synthase montrent une synthèse accrue du LBPA comparativement aux cellules mutantes (augmentation de 5 fois de la synthèse) et parentales (augmentation de 2 fois de la synthèse).

Nos résultats démontrent donc que le taux de biosynthèse et le contenu intracellulaire en LBPA sont étroitement corrélés à ceux du PG et donc que ce dernier est bien le *de novo* précurseur du LBPA.

C- Altération de la structure des endosomes tardifs:

L'observation en microscopie à fluorescence et électronique des cellules déficientes en PGP synthase montrent une désorganisation complète des endosomes, renforçant le fait que le PG soit le précurseur endogène du LBPA et suggérant que le LBPA grâce à sa structure en cône et ses propriétés fusogènes régule la formation des membranes internes des endosomes tardifs.

Conclusion-Perspectives :

Nos résultats montrent donc pour la première fois le PG est le précurseur naturel du LBPA et que ce dernier est un constituant essentiel des endosomes tardifs, participant activement à la structure et à la dynamique de leurs membranes internes de ces organelles. Grâce à l'utilisation des lignées déficientes en phosphatidylglycérophosphate synthase, nous disposons d'un modèle pour étudier le rôle des membranes internes des endosomes tardifs et donc du LBPA dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire.

Références

- 1- Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG and Gruenberg J. A lipid associated with antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature*. 392. 193-197 (1998)
- 2- Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, Frias S, Palmiter RD, Sakuraba H, Parton RG and Gruenberg J. Late endosomal membranes rich in lysobis-phosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biol*. 1. 113-118 (1999)
- 3- Kobayashi T, Beuchat MH, Chevallier J, Makino A, Mayran N, Escola JM, Lebrand C, Cosson P, Kobayashi T and Gruenberg J. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J.Biol.Chem*. 277. 32157-32164 (2002)
- 4- Amidon B, Schidtt JD, Thuren T, King L and Waite M. Biosynthetic conversion of phosphatidylglycerol to sn-1:sn-1' bis(monoacylglycero)phosphate in a macrophage-like cell line. *Biochemistry* 34:5554-5560 (1995).
- 5- Ohtsuka T, Nishijima M and Akamatsu Y. A somatic cell mutant defective in phosphatidylglycerophosphate synthase, with impaired phosphatidylglycerol and cardiolipin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 268, 22908-22913. (1993)
- 6- Ohtsuka T, Nishijima M, Suzuki K, and Akamatsu Y. Mitochondrial dysfunction of a cultured Chinese hamster ovary cell mutant deficient in cardiolipin. *J Biol Chem.*, 268, 22914-22919 (1993)