

2M11.2737.2

Université de Montréal

Analyse des techniques d'isolement des caveolae

Par

Maxime Denis

Programme de sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
En Sciences Biomédicales

Mai 1999

© Maxime Denis 1999



J. F. F. F. J. M. G.

W
4
U58
1999
v. 139

Université de Montréal

Analyse des techniques d'isolement des caroténoïdes

Par

Marianne Tremblay

Programme de sciences pharmaceutiques

Faculté de médecine

Marianne Tremblay présente à la Faculté des études supérieures
pour l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences pharmaceutiques
En Sciences Pharmaceutiques

Mai 1999

© Marianne Tremblay 1999



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Analyse des techniques d'isolement des caveolae

Et présenté par

Maxime Denis

a été évalué par un jury composé de:

Dr. Michel Bouvier	Président rapporteur
Dr. Lucian Ghitescu	Membre du jury
Dr. Jacques Genest Jr	Directeur

Mémoire accepté le: 99-11-04

Sommaire

Les caveolae sont des microdomaines invaginés de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingomyéline. Ces domaines sont impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires comme l'endocytose, la transduction de signaux et le transport du cholestérol. Notre laboratoire a récemment caractérisé un défaut d'efflux de cholestérol sur les fibroblastes de patients ayant un taux de HDL bas. Les caveolae étant impliquées dans le transport du cholestérol, nous avons émis l'hypothèse que ces structures avaient un rôle à jouer dans cette anomalie. Dans le but de déterminer les paramètres à respecter pour l'isolement des caveolae par des techniques biochimiques, trois techniques d'isolement des caveolae ont été testées sur des fibroblastes cutanés humains dont les lipides sont radio-marqués pendant la croissance cellulaire. La première technique (en présence de Triton X-100) permet l'obtention d'une fraction riche en cavéoline, mais abolit la co-distribution du cholestérol et de la sphingomyéline. La deuxième (au carbonate de sodium) évite l'utilisation du détergent, mais comporte des étapes critiques importantes comme l'homogénéisation et la sonification. Une variation de ces paramètres change la composition biochimique de la fraction enrichie en cavéoline. La troisième technique (sur gradient d'Optiprep) permet la séparation simultanée de plusieurs compartiments cellulaires, mais l'isolement des différents compartiments varie selon l'osmolarité, l'homogénéisation, le type cellulaire et la sonification. Ce travail compare les trois techniques entre elles et permet de tirer des principes généraux importants pour l'obtention des caveolae.

Table des matières

Sommaire	(iii)
Table des matières	(iv)
Liste des tableaux et figures	(v)
Liste des abréviations	(vi)
Première partie: Introduction	(1)
État actuel des connaissances	
1) Transport du cholestérol par les lipoprotéines	(3)
2) Déficience familiale en HDL	(4)
3) Transport intracellulaire du cholestérol	(4)
4) Caveolae: Structure et fonctions	(8)
5) Les techniques d'isolement des caveolae	(21)
6) Quelques principes en biologie cellulaire	(27)
Deuxième partie : hypothèse de travail	(31)
Troisième partie : matériel et méthodes	
1) Matériel	(32)
2) Culture cellulaire	(33)
3) Isolement des caveolae	(33)
4) Dosage des protéines	(36)
5) Mesure des lipides	(36)
6) Immunodétection	(38)
7) Activités enzymatiques	(39)
Quatrième partie : résultats	
1) La technique au Triton X-100 (Sargiacomo/Lisanti)	(41)
2) La technique au carbonate de sodium (Song)	(44)
3) La technique sur gradient d'Optiprep (Smart).	(50)
Cinquième partie : discussion	
1) La technique au Triton X-100 (Sargiacomo/Lisanti)	(64)
2) La technique au carbonate de sodium (Song)	(66)
3) La technique sur gradient d'Optiprep (Smart)	(68)
4) Comparaison des techniques	(70)
Sixième partie : conclusion	(73)
Sources documentaires	(74)

Liste des figures

- Figure 1:** Modèle l'homoéostasie du cholestérol intracellulaire (p. 6)
- Figure 2:** Les caveolae vues en microscopie électronique (p. 9)
- Figure 3:** La famille des cavéolines (p. 12)
- Figure 4:** Techniques courantes d'isolement des caveolae (p. 23)
- Figure 5:** Technique de séparation des lipides sur CCM (p. 38)
- Figure 6:** Isolement des caveolae par la technique au Triton X-100 : effet de l'homogénéisation (p. 42)
- Figure 7:** Isolement des caveolae par la technique au carbonate de sodium : effet de la sonification après un broyage mécanique au Polytron (p. 46)
- Figure 8:** Isolement des caveolae par la technique au carbonate de sodium : effet de la sonification après une homogénéisation manuelle (p. 49)
- Figure 9:** Effet de préparations hypo-osmotique et iso-osmotique du gradient de Percoll 30% (p. 52)
- Figure 10:** Distribution de billes de densité dans un gradient de Percoll 30% (p. 54)
- Figure 11:** Effet de l'homogénéisation sur la séparation des compartiments cellulaires dans un gradient de Percoll (p. 57)
- Figure 12:** Séparation des compartiments cellulaires de cellules HUVEC sur un gradient de Percoll 30% avec le protocole original (p. 59)
- Figure 13:** Effet de la sonification sur la distribution des marqueurs et des protéines dans un gradient d'Optiprep (p. 62)

Abréviations utilisées dans cet ouvrage

- #, No: numéro
[sucrose]: concentration de sucrose
- ACAT: Acyl-CoA:Cholestérol
Acyltransférase
- ACEH: Hydrolase acide des esters de
cholestérol (*Acid Cholesterol Ester
Hydrolase*)
- AMP: adénosine mono-phosphate
- ARF: facteur de ribosylation de l'ADP
(*ADP ribosylating factor*)
- ARN: Acide Ribonucléique
- apoAI: apolipoprotéine AI
- BSA: albumine de sérum de bovin
(*Bovine serum albumin*)
- cav: cavéoline
- CCM: Chromatographie sur couche
mince
- CE & EC: Cholestérol estérifié
- CL: Cholestérol libre
- COP: protéine "coatamer" (*Coatamer
Protein*)
- Cyto: Cytosol
- DIG: Membranes insolubles au détergent
et enrichies en glycosphingolipides
(*Detergent-Insoluble, Glycosphingolipid-
enriched membranes*)
- DMEM: Milieu Eagle modifié par
Dulbelcco (*Dulbelcco's modified
Eagle Medium*)
- DRM: Membrane résistante au détergent
(*Detergent Resistant Membrane*)
- ECGS: Supplément de croissance pour
cellules endothéliales (*Endothelial
Cell Growth Supplement*)
- ECL: Chimiluminescence à émission
amplifiée (*Enhanced emi-chemi-
luminescence*)
- EDTA: Acide éthylènediamine
tétraacétique (*Ethylenediamine
tetraacetic acid*)
- EGTA: Acide éthylène Glyco-bis(β -
-aminoéthyl éther) N,N,N',N'
tétraacétique (*Ethylene Glyco-bis(β -
aminoethyl ether) N,N,N',N' tetraacetic
acid*)
- EGF: Facteur de croissance épidermique
(*Epidermal Growth Factor*)
- eNOS: Oxyde nitrique synthase
endothéliale (*endothelial Nitric
Oxide Synthase*)
- FCS: Sérum de veau fœtal (*Fetal Calf
Serum*)
- FHD: Déficience familiale en HDL
(*Familial HDL Deficiency*)
- g: accélération gravitationnelle (9.8m/s^2)
- GAP: Protéine activant une GTPase
(*GTPase Activating Protein*)
- GDI: Inhibiteur de dissociation du GDP
(*GDP Dissociation inhibitor*)
- GDP: Guanosine di-phosphate
- GEM: Membrane enrichie en
glycosphingolipides
(*Glycosphingolipid-enriched membrane*)
- GPI: Glycosyl-phosphatidylinositol
- GTP: Guanosine tri-phosphate
- ^3H -: tritié
- HBP: Protéine liant les HDL (*HDL-
Binding Protein*)
- HDL : Lipoprotéine de haute densité
(*High Density Lipoprotein*)
- HDL₃: Lipoprotéine de haute densité de
sous-classe 3
- Hepes: Acide (N-[2-hydroxyéthyl]
pipérazine- N'-[2 éthanesul-
fonique]) (*(N-[2-hydroxyethyl]
piperazine-N'-[2 ethanesulfonic acid])*)
- HMG-Co-A: hydroxyméthylglutaryl
coenzyme A
- Hsp: Protéine du choc thermique (*Heat-
Shock Protein*)

- HUVEC:** Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*)
- IDL:** Lipoprotéine de densité intermédiaire (*Intermediate Density Lipoprotein*)
- IM:** Membranes internes
- Kd:** constante de dissociation
- LDL:** Lipoprotéine de faible densité (*Low Density Lipoprotein*)
- LDM:** Membranes de faible densité (*Low Density Membrane*)
- LDTI:** Insoluble au Triton et de faible densité (*Low Density, Triton-Insoluble*)
- LYS:** Lysosome
- M-199:** Milieu 199
- MAP:** Protéine activée par un agent mitogénique (*Mitogen Activated Protein*)
- MBS:** Solution saline tamponnée avec du MES (*MES buffered saline*)
- MDCK:** Cellules de rein de chien Martin Darby (*Martin Darby Canine Kidney*)
- MDR:** Protéine de multirésistance aux drogues (*Multi-drug Resistance*)
- MES:** Acide 2-[N-morpholino] éthanesulfonique
- NCEH:** Hydrolase neutre des esters de cholestérol (*Neutral Cholesterol Esters Hydrolase*)
- NCS:** Sérum de veau nouveau-né (*Newborn Calf Serum*)
- ND:** Non déterminé
- PAGGE:** Electrophorèse sur gel à gradient de polyacrylamide (*Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis*)
- PBS:** Solution saline tamponnée au phosphate (*Phosphate buffered saline*)
- PC:** Phosphatidylcholine
- PKC:** Protéine Kinase C
- PLD1:** Phospholipase D1
- PLD2:** Phospholipase D2
- PM:** Membrane plasmique
- PMA:** Acétate de phorbolmyristate (*Phorbolmyristate acetate*)
- PMSF:** Fluorure de phénylméthyl Sulfonyle (*Phenylmethyl Sulfonyl fluoride*)
- PNS:** Surnageant post-nucléaire (*post-nuclear supernatant*)
- PVDF:** Difluorure de polyvinylidène (*Polyvinylidenedifluoride*)
- RCF:** Force centrifuge relative (*Relative Centrifugal Force*)
- REL:** Réticulum endoplasmique lisse
- RER:** Réticulum endoplasmique rugueux
- rpm:** rotations par minute
- RSV:** Virus du sarcome de Rous (*Rous sarcoma virus*)
- SCP:** Protéine transportant les stérols (*Sterol Carrier Protein*)
- SDS:** Dodécyl sulfate de sodium (*Sodium dodecyl sulfate*)
- SM:** Sphingomyéline
- SOS:** protéine "Son of Sevenless"
- SR-BI:** Récepteur "Scavenger" de type B-I (*Scavenger Receptor type B-I*)
- SR-BII:** Récepteur "Scavenger" de type B-II (*Scavenger Receptor type B-II*)
- SRE:** Élément de réponse aux stérols (*Sterol Response Element*)
- TBS-T:** Solution saline tamponnée avec du Tris et contenant du Tween-20 (*Tris buffered saline-Tween 20*)
- TCA:** Acide trichloroacétique (*Trichloroacetic acid*)
- TGN:** Réseau trans-Golgi (*Trans-Golgi Network*)

U: unité
UTC: Ultracentrifugation

VLDL: Lipoprotéine de très faible
densité (*Very Low Density
Lipoprotein*)

PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires sont la cause la plus importante de mortalité à l'échelle mondiale actuellement, et pour les prochains 20 ans (1). C'est pourquoi beaucoup de recherches sont réalisées sur ce sujet. Un niveau élevé de cholestérol sanguin représente un facteur de risque majeur pour l'apparition de maladies cardiovasculaires. Dans le plasma, le transport du cholestérol entre les différents tissus est assuré par les diverses lipoprotéines plasmatiques et un niveau élevé de HDL (*High Density Lipoprotein*) est considéré comme protecteur contre les maladies cardiovasculaires. Un trait de déficience familiale en HDL a été rapporté chez des patients canadiens-français (FHD) (2). Une étude approfondie du comportement des cellules de ces patients a indiqué que leur déficience en HDL était reliée à un défaut de transport intracellulaire du cholestérol (3).

Dans la cellule, plusieurs mécanismes sont impliqués dans le transport du cholestérol. Récemment, il a été démontré que les caveolae, des invaginations de la membrane plasmique observées au microscope électronique, étaient impliquées dans l'acheminement du cholestérol nouvellement synthétisé vers la membrane plasmique (4). D'autres leur ont attribué un rôle important dans l'efflux de cholestérol (5). Il fut donc essentiel d'investiguer l'apport de ces structures dans le transport du cholestérol chez les sujets normaux et de vérifier si les patients avec des niveaux bas de HDL présentaient un défaut de transport relié aux caveolae.

Pour ce faire, il a fallu mettre au point une technique permettant d'étudier leurs propriétés biochimiques. Les techniques biochimiques courantes (pour l'étude de cellules en culture) ont donc été testées. On remarquera ainsi qu'aucune technique étudiée n'isole parfaitement les caveolae, probablement dû au fait que ce sont des structures dynamiques en constantes interactions avec d'autres structures intracellulaires. Le but de cette étude est d'analyser les techniques d'isolement des caveolae et de définir par quelle technique on considérera pouvoir obtenir ces structures.

Il sera fait, dans une première partie, une description du transport du cholestérol, de l'implication du défaut de transport du cholestérol chez les FHD et une description de la structure étudiée ainsi que les fonctions cellulaires connues à ce jour qui y sont associées. Ensuite, compte tenu des connaissances actuelles, la stratégie employée sera présentée. Après une description exhaustive des techniques utilisées en troisième partie, une quatrième partie détaillera les résultats obtenus. La cinquième partie permettra une discussion des résultats tandis que la sixième partie donnera la conclusion.

Par ailleurs, «*caveolae*» est un mot originaire du latin proposé par Yamada (6) sous la forme de «*caveolae intracellularis*». Écrit de cette façon, il représente le pluriel de «*caveola*». Il est parfois traduit par les Français par «cavéole» (7), signifiant petite cave, cavité, ou plutôt, dans notre cas, «invagination». Les Américains, quant à eux, conservent la terminologie latine et les plus attentifs prennent soin de faire l'accord. Ils utilisent donc «**une** caveola» (**a** caveola) et «**plusieurs** caveolae» (**many** caveolae) (8).

Dans le présent document, la terminologie latine sera employée. Le puritain y verra évidemment un affront à la langue française. La recherche dans ce domaine a été menée majoritairement du côté américain. On leur cède donc le privilège de nommer les choses comme ils le désirent. Cela n'alourdira nullement le texte ni ne nuira à sa clarté. De toute façon, le mot «*caveolae*» est contesté par les Américains eux-mêmes (voir section 4B). La terminologie importe donc peu. Ce qui compte, c'est de s'entendre sur le fait que ce mot représente «*des microdomaines invaginés de la membrane plasmique enrichis en cholestérol et en sphingomyéline*».

ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

1. Transport du cholestérol par les lipoprotéines

Les lipides, des molécules peu hydrosolubles, sont transportés entre les différents tissus via des complexes macromoléculaires solubles: les lipoprotéines. Elles sont composées de triglycérides, de cholestérol libre et estérifié, de phospholipides, d'apolipoprotéines et d'autres protéines. On sépare les lipoprotéines en différentes catégories selon leur densité. On distingue les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (en anglais : VLDL), les lipoprotéines de faible densité (en anglais : LDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (en anglais : IDL) et les lipoprotéines de haute densité (en anglais : HDL). À ces lipoprotéines s'ajoutent celles de structures, de densités et de compositions transitoirement intermédiaires dont il n'est pas lieu ici de faire la revue (pour revue, voir 9). Chacune de ces particules a une composition lipidique et protéique, de même qu'une taille et un rôle bien définis. Par exemple, les VLDL et les LDL sont impliquées dans le transport des triglycérides et du cholestérol à partir des sites de synthèse (foie) vers les tissus périphériques, alors que les HDL sont responsables du transport à rebours, c'est-à-dire des tissus périphériques jusqu'au foie et jusqu'aux tissus stéroïdogéniques (surénales).

Un taux élevé de LDL-cholestérol est considéré comme un facteur de risque pour le développement de la maladie coronarienne. Ces complexes macromoléculaires, lorsque oxydés, sont captés par les macrophages qui deviendront spumeux et contribueront à former la plaque athéromateuse. Il en résultera ultimement un blocage de l'artère. Inversement, un taux élevé de HDL-cholestérol est considéré comme protecteur puisque ces particules retirent le cholestérol de la circulation en plus de transporter des molécules aux vertues anti-oxydantes. Une baisse importante de la quantité de HDL-cholestérol constitue donc un facteur de risque pour le développement de la maladie coronarienne (10).

2. La déficience familiale en HDL

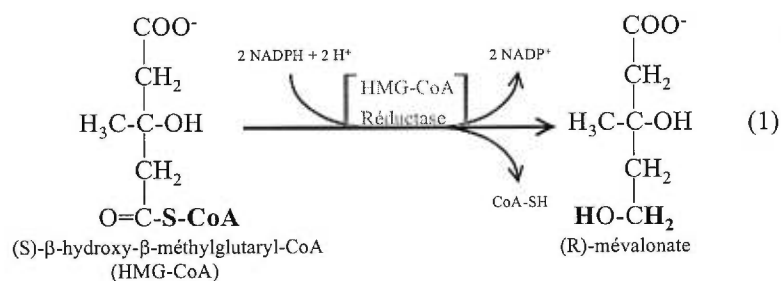
Récemment, Marcil et collaborateurs (2) ont répertorié des patients ayant une déficience familiale en HDL (FHD: *Familial HDL Deficiency*) d'origine inconnue. Lorsque des expériences d'efflux de cholestérol et de phospholipides ont été réalisées sur les fibroblastes en culture de ces patients, on a remarqué que ce processus était défectueux (3). Ce comportement s'apparente (voir 11) à celui des cellules des patients atteints de la maladie de Tangier (12, 13) qui présentent aussi un défaut d'efflux du cholestérol. De plus, Walter et coll. (14) ont décrit un problème chez ces patients dans la signalisation induite par les HDL via les phospholipases C et D spécifiques à la phosphatidylcholine. Il a été proposé que le trait de déficience familiale en HDL soit causé par une anomalie intracellulaire de transport du cholestérol. En effet, si la particule HDL pauvre en lipides ne trouve pas de quoi s'en enrichir au contact des cellules, elle sera rapidement catabolisée (15). Le défaut de transport intracellulaire de lipides serait donc la cause primaire, la baisse des HDL plasmatique en serait la conséquence.

3. Le transport intracellulaire du cholestérol

La cellule non-hépatique tend à garder constante la quantité de cholestérol intracellulaire (homéostasie) (voir **figure 1**). Le cholestérol peut d'abord être capté sous une forme estérifiée du LDL dans les puits tapissés de clathrine (16) via le récepteur des LDL. Après l'hydrolyse des esters par l'ACEH dans le lysosome, il est soit acheminé au réticulum endoplasmique rugueux pour y être réesterifié par l'ACAT (17), soit transporté à la membrane plasmique (18). Récemment, il a été démontré par des expériences de «pulse-chase» avec des LDL marqués au ^3H -cholestérol que le cholestérol provenant des LDL et ciblé à la membrane plasmique était acheminé aux caveolae (19). Ces conclusions proviennent du fait que, au temps zéro et à 4°C, le ^3H -cholestérol co-migre avec des fractions enrichies en transférine et en clathrine (protéines des puits tapissés de clathrine) dans un gradient de D₂O-Ficoll. Lorsque les cellules sont incubées en absence de LDL marqués et transférées à 31°C pour 15 minutes, un déplacement du ^3H -cholestérol est

observé vers les fractions enrichies en cavéoline et en phosphatase alcaline (deux protéines concentrées dans les caveolae).

Par ailleurs, le cholestérol peut aussi provenir d'une synthèse endogène impliquant entre autres l'enzyme-clé HMG-CoA réductase. Cette enzyme catalyse la réaction :



Cette réaction est une étape limitante dans la biosynthèse du cholestérol. Cette dernière est réalisée dans le réticulum endoplasmique lisse. Une fois synthétisé, le cholestérol est acheminé vers les caveolae (4) avant d'être redistribué à la membrane. Cette évidence provient d'expériences de «pulse-chase» utilisant de l'acétate tritié, un précurseur dans la biosynthèse du cholestérol. Le cholestérol nouvellement synthétisé à partir de ce précurseur est retrouvé d'abord dans les caveolae, puis transféré aux portions non-cavéolaires de la membrane plasmique, telles qu'obtenues sur un gradient d'Optiprep.

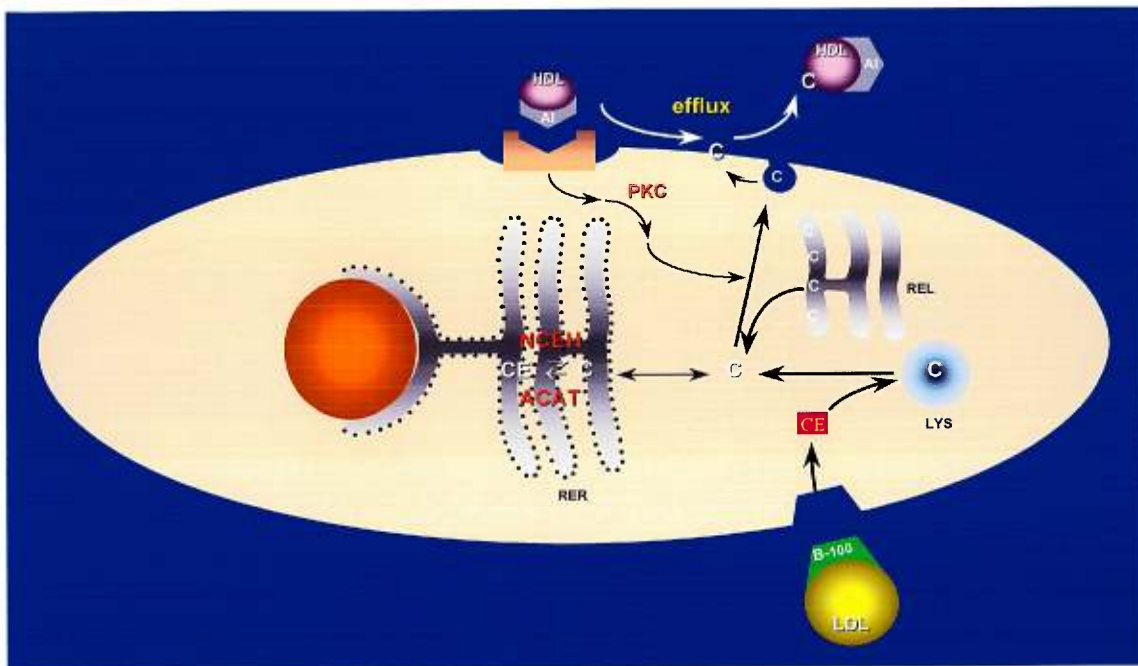


Figure 1: Modèle de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire. La quantité de cholestérol intracellulaire est gardée constante grâce à quatre mécanismes de régulation. 1° Le cholestérol estérifié (CE) de la particule LDL peut-être capté dans les puits tapissés de clathrine par endocytose médiée par le récepteur aux LDL et déestérifié dans le lysosome (LYS). 2° La synthèse de novo de cholestérol se fait dans le réticulum endoplasmique lisse (REL). 3° L'ACAT et la NCEH sont les enzymes du réticulum endoplasmique rugueux (RER) responsables de l'estérification et de la déestérification du cholestérol respectivement. 4° Lorsque la particule HDL₃ ou son apoprotéine majeure, l'apoAI, viennent en contact avec la cellule, il y a alors induction de signaux intracellulaires, comme l'activation de la PKC. Ce signal active par un mécanisme inconnu la translocation du cholestérol, médiée par les caveolae, jusqu'à la membrane où il y a alors efflux sur la particule HDL₃.

Lorsque la particule HDL pauvre en lipides vient en contact avec la surface cellulaire, il y a alors captage du cholestérol (20, 21) entre autre par diffusion passive. De plus, la particule HDL a la capacité d'activer les phospholipases C et D (14), la PKC α (22) et l'hydrolyse des esters de cholestérol dans le réticulum endoplasmique (3). Ce double phénomène de désorption du cholestérol et d'induction probable du transport intracellulaire s'appelle l'efflux. C'est ce mécanisme qui est apparemment défectueux chez les patients FHD. L'interaction entre la cellule et la particule HDL est le sujet de plusieurs recherches. Certains récepteurs potentiels ont été proposés pour expliquer cette

interaction. Ces récepteurs comprennent entre autres la famille des SR-B1/SR-BII/Cla-1 dans les cellules stéroïdogéniques, les récepteurs HBP, dont un semble ancré à la membrane par un groupe GPI, le récepteur HB₂ (23) ayant une certaine homologie avec des molécules d'adhésion, etc. (pour revue, voir Fidge (24))

Plusieurs protéines sont impliquées dans le transport du cholestérol. Les cellules stéroïdogéniques captent le cholestérol des HDL. Celui-ci est alors pris en charge par les protéines transporteuses de stérols, les SCP, qui transportent ce cholestérol capté à la membrane plasmique vers les sites de synthèse des hormones stéroïdiennes. Toutefois, il semble que la direction de transport varie d'un tissu à l'autre (25). Une autre protéine de la famille des MDR (protéines de résistance à plusieurs drogues), semble impliquée dans le transport intracellulaire du cholestérol. En effet, la protéine MDR1 augmente l'estérification du cholestérol et fonctionne comme une «flippase» permettant de transporter des lipides d'une face à l'autre de la membrane plasmique (26). Récemment, la protéine MDR-Pgp a été reliée à cette action de «flippase» du cholestérol, tel que démontré par transfection de cellules NIH 3T3. Ces cellules, lorsqu'elles sont transfectées avec l'ADN complémentaire de Pgp, augmentent leur capacité d'estérification du ³H-cholestérol, alors que le ³H-cholestérol membranaire diminue (27). Par ailleurs, des expériences d'immunoprécipitation de la cavéoline cytosolique ont co-précipité les protéines chaperones Hsp56, Cyp 40 et CypA. Ces dernières forment un complexe cytosolique avec la cavéoline-1 et transportent le cholestérol vers les caveolae (28). À noter que les chaperones sans la cavéoline sont incapables de transporter le cholestérol. Auparavant, des expériences in-vitro avaient montré que la cavéoline-1 possède en soi la capacité de lier le cholestérol (29) puisque son incorporation dans des liposomes n'était possible que lorsque ces derniers possédaient plus que 30% (ratio molaire) de cholestérol. De plus, l'expression de la cavéoline-1 est modulée par le cholestérol puisqu'il y a deux éléments homologues aux séquences SRE (sterol response element) dans le promoteur du gène de la cavéoline-1 (30). Finalement, il a été démontré que la quantité d'ARN messager de la cavéoline est surabondante en présence de grandes quantités de cholestérol et beaucoup moindre en présence de stérols oxydés (31).

L'implication des caveolae dans le transport du cholestérol a été démontrée de plusieurs façons. D'abord elles sont enrichies en récepteurs potentiel des HDL (SR-BI, SR-BII, HBP, CD-36) (32 - 35). De plus, il a été montré que l'incubation de cellules en présence d'une séquence nucléotidique antisens pour la cavéoline a pour effet de diminuer la quantité d'ARN messager de la cavéoline de 42% de même que de réduire l'efflux de cholestérol d'une valeur similaire (47%) (31). Par ailleurs, les caveolae seraient impliquées dans l'influx de cholestérol. En effet, au niveau des cellules hépatiques, suivant la liaison du HDL avec le SR-BI, les éthers de cholestérol (un analogue non-hydrolysable des esters de cholestérol) sont transférés au domaine cavéolaire (isolé sur gradient d'Optiprep) avant d'être transférés aux domaines intracellulaires (36). Par ailleurs, il a été observé sur des cellules intestinales CaCo-2 que le cholestérol provenant de la lumière intestinale s'aggrège dans les caveolae (isolées par gradient de sucrose) avant d'être transporté vers le réticulum endoplasmique (37), suggérant un rôle des caveolae dans l'influx de cholestérol vers les sites de stockages.

4. Caveolae : Structure et fonctions

a) Structure.

La composition protéique et lipidique des caveolae peut changer selon la technique d'analyse utilisée et le type cellulaire étudié (voir les sections résultats et discussion). Les techniques communes d'isolement des caveolae seront présentées plus loin.

Les caveolae sont des microdomaines invaginés de la membrane plasmique enrichis en cholestérol et en sphingomyéline. Ils ont d'abord été décrits en microscopie électronique par Georges Palade (38) et Eichi Yamada (6). Ce sont des domaines morphologiquement et constitutivement distincts des puits tapissés de clathrine (de l'anglais *clathrin coated pits*) (39, 40) et du reste de la membrane plasmique. On trouve en effet dans ces domaines en forme de oméga (Ω) (voir **figure 2**) une forte concentration en cholestérol (8, 41-42) en microscopie électronique et par isolement sur gradient de sucrose. De plus, les gradients de sucroses révèlent une forte concentration en sphingolipides et en glycolipides (42). La structure contient aussi plusieurs protéines,

dont une majoritaire : la cavéoline. Elle y fut localisée par immuno-microscopie électronique (40). Quoique les caveolae fussent découvertes comme étant directement associées à la membrane, la question demeure toujours aujourd'hui à savoir si l'organelle peut bourgeonner de la membrane plasmique et se déplacer à l'intérieur de la cellule jusqu'à même fusionner avec d'autres organelles (42) et ainsi être considérées comme des endosomes (44, 45). Enfin, les caveolae sont capables de se refermer sur elles-mêmes, créant ainsi, selon Anderson, un micro-environnement favorable à la tenue d'événements biologiques (46).

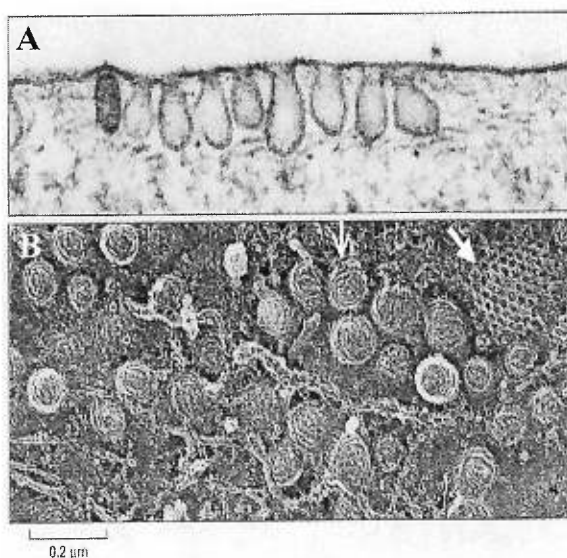


Figure 2: Les caveolae vues en microscopie électronique. (Tiré de réf 39, figure 13-48, image obtenue de 40). **A)** Micrographie électronique d'un fibroblaste en coupe transversale. Les caveolae forment des invaginations de la membrane plasmique. **B)** Micrographie électronique en cryodécoupage montrant des caveolae (flèche ouverte) sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Leur composition et leur structure sont bien distinctes des puits tapissés de clathrine (flèche pleine).

Le cholestérol est une composante essentielle de la caveola puisque les drogues le liant comme la filipine (8), celles inhibant sa synthèse comme la compactine (47) ainsi que celles modifiant sa structure chimique comme la cholestérol oxidase (48) désassemblent la caveola et causent la redistribution de la cavéoline au réticulum endoplasmique et au Golgi.

La famille des cavéolines

Les fonctions des caveolae sont souvent intimement liées aux propriétés intrinsèques des protéines les constituant. On connaît à l'heure actuelle, trois membres

d'une famille de cavéolines : cavéoline-1, cavéoline-2 et cavéoline-3. La première se présente sous deux isoformes : α et β . La **figure 3** représente schématiquement toutes ces formes.

Le gène de la cavéoline-1 est localisé sur le chromosome 7q31. La cavéoline-1 possède deux isoformes en raison d'un site alternatif d'initiation à la traduction. Il n'y a donc qu'un seul ARN messager et deux protéines de séquences identiques sauf que l'une est plus courte que l'autre de 31 acides aminés à l'extrémité amino-terminale (49). Bien que les deux isoformes semblent avoir des localisations intracellulaires quelque peu différentes en microscopie confocale, une technique d'isolement sur gradient de sucrose en présence de détergent les place dans la même fraction du gradient (49). Les analyses de type Northern détectent leur ARN messager commun en majorité dans le cœur, le placenta, les poumons (50), dans les cellules adipeuses (51) et un peu dans le muscle squelettique (50, 52). Des analyses de type Western ont révélé une immunoréactivité d'anticorps contre la cavéoline avec des complexes de haut poids moléculaires (> 200kDa). De ces expériences ont été tirés le constat que la cavéoline-1 est capable de dimérisation et même d'homo-oligomérisation (14-16 unités) (53, 54) rendant le complexe résistant au SDS (51, 54). Le marquage de l'extrémité N avec un épitope-HA et l'extrémité C-terminale de la cavéoline avec un épitope-myc, a permis de déterminer que la protéine expose ses deux extrémités vers l'intérieur de la cellule. En effet, les cellules transfectées avec cette construction n'ont donné une immunoréactivité en microscopie que lorsque les cellules furent traitées par un détergent, qui permettait l'entrée des anticorps anti-HA et anti-myc. Ceci suggère fortement que la protéine expose ses extrémités amino et carboxy-terminales du côté cytoplasmique (56). Une région intramembranaire en forme de crochet permet l'ancrage de la protéine à la membrane (55, 56). De plus, la protéine peut renforcer son ancrage par l'ajout de trois groupes palmitates sur les trois cystéines du côté carboxyterminal (56, 57). Ceci a été mis en évidence par l'incorporation de ^3H -palmitate à la protéine. La mutation séquentielle des cystéines (l'acide aminé auquel s'ajoute le palmitate) diminuait l'incorporation de palmitate.

Par ailleurs, elle possède des sites de phosphorylation par des kinases. La cavéoline-1 est phosphorylée par l'action tyrosine kinase de l'oncogène *src*. En effet, lorsque des fibroblastes de poulet sont infectés par le virus RSV (*Rous sarcoma virus*), ils expriment alors la protéine v-src, qui phosphoryle la cavéoline (58). Aussi, Sargiacomo a proposé, lors d'expériences de phosphorylation *in-vitro* à l'aide d'inhibiteurs spécifiques des kinases, que la caséine kinase II phosphorylait la cavéoline sur un site consensus à la sérine 88 (59). Par contre, il excluait une phosphorylation sur le site consensus par la PKC à la sérine 37. Enfin, la caséine kinase I était incapable de la phosphoryler la cavéoline.

La protéine a une activité inhibitrice des sous unités G_{α} des protéines hétérotrimériques. Des essais *in-vitro* faisant usage de sous unités G_0 et G_{12} recombinantes et de mutants de délétion de la cavéoline-1, ont démontré que les acides aminés 82-101 de la cavéoline-1 étaient capables d'inhiber l'activité d'échange GDP/GTP de ces sous-unités. Elle empêche la dissociation du GDP de la sous-unité, et cette région de la cavéoline-1 a donc une activité «GDI» (GDP Dissociation Inhibitor) (60).

En plus de médier l'interaction avec les protéines G, la région comprenant les acides aminés 82-101 constitue aussi le site d'interaction avec la PKC (61). Cette région est appelée la région d'échaffaudage (*scaffolding domain*) de la protéine. En effet, en plus de médier l'interaction avec plusieurs protéines, il joue un rôle primordial dans le ciblage de la cavéoline aux caveolae. Les mutants de délétion ne comportant pas cette région ne sont pas ciblés aux caveolae tel que détecté par insolubilité au Triton X-100 et par migration dans un gradient de sucrose (62).

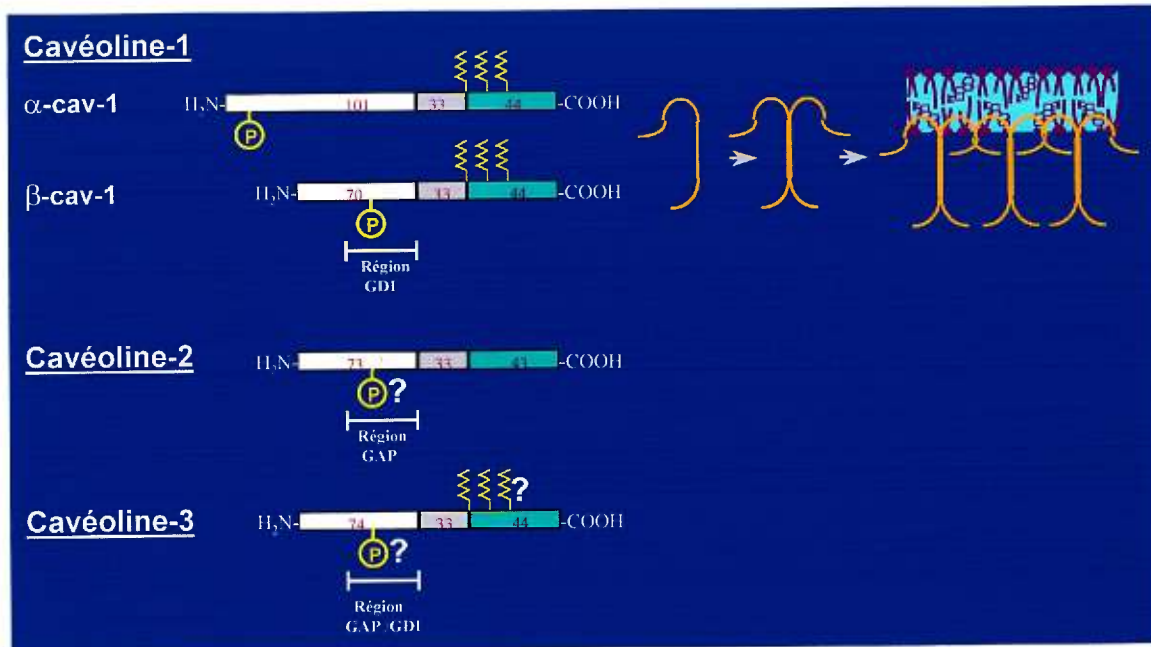


Figure 3: La famille des cavéolines. La cavéoline-1 existe sous deux isoformes α et β , cette dernière étant un produit alternatif de traduction. La cavéoline-1 est synthétisée sous la forme d'un monomère, forme ensuite un dimère puis des homo-oligomères dans le réticulum endoplasmique. Elle est phosphorylée à son extrémité amino-terminale et est palmitylée du côté carboxy-terminal. La cavéoline-1 a une région GDI (GTP-dissociation inhibitor), tandis que la cavéoline-2 a une région GAP (GTPase activating protein). On ne sait pas à ce jour si elle est phosphorylée. La cavéoline-3 est spécifique au muscle et possède les deux activités GAP et GDI. On ne sait pas si elle est palmitylée et/ou phosphorylée. Les trois cavéolines ont une structure similaire: les deux extrémités carboxy et amino-terminales sont cytoplasmiques (vert et blanc), pendant qu'un crochet intramembranaire permet l'ancrage de la protéine. Le nombre d'acides aminés de chaque domaine est indiqué.

Les cavéolines-2 et 3 proviennent de gènes distincts. La cavéoline-2 a une structure similaire à celle de la cavéoline-1. De plus, son ARN messenger se retrouve dans les mêmes tissus que celui de la cavéoline-1 et la protéine colocalise avec la cavéoline-1 en microscopie à fluorescence et par isolement sur gradient de sucrose (51) en présence de Triton. Par contre, plutôt que d'avoir une activité GDI, la cavéoline-2 a une activité GAP (GTPase –activating protein). La capacité *in-vitro* d'une protéine G_o purifiée à hydrolyser le GTP a été mesurée en présence d'un peptide dérivé de la région de la cavéoline-2 liant potentiellement les protéines G. Il a été démontré que la cavéoline-2, contrairement à la cavéoline-1, augmentait l'activité GTPasique de la sous-unité G α .

Il est donc proposé que la cavéoline-1 agisse de concert avec la cavéoline-2, l'une maintenant (activité GDI), l'autre plaçant activement (activité GAP) les sous-unités $G\alpha$ dans leur conformation liée au GDP (conformation inactive). Il n'est pas connu à l'heure actuelle si la cavéoline-2 est capable d'oligomérisation, ni si elle s'ancre à la membrane par des groupes «palmitate». On sait par contre que l'association cavéoline-1/cavéoline-2 forme un hétérodimère phosphorylé sur la cavéoline-2 et ciblé au pôle basolatéral des cellules MDCK. En contre partie, les homo-oligomères de cavéoline-1 sont ciblés au pôle apical. (63). Il est en effet possible d'immuno-isoler les membranes apicales des membranes basolatérales de cellules polarisées lorsque ces dernières sont infectées par des virus dont les protéines virales se retrouvent exclusivement à la partie apicale ou basolatérale.

La cavéoline-3, quant à elle, a un ARN messager spécifiquement musculaire (diaphragme, coeur et muscle squeletique) (52) tel que déterminé par des analyses de type Northern. Dans des cellules COS co-transfectées par les cavéolines-1 et 3, les deux protéines co-migrent dans les mêmes fractions dans un gradient de sucrose en présence de Triton. De même, une co-migration est observée lorsque les mêmes cellules perméabilisées par 0.1% Triton X-100 et étudiées par microscopie confocale. Cependant, il n'est pas connu si la cavéoline-3 est capable d'oligomérisation ou d'ancrage par palmylation, ni si elle est phosphorylée. En revanche, la cavéoline-3 possède les deux activités, GAP et GDI (52). Toujours dans des essais *in-vitro*, à des concentrations de l'ordre de la nanomole, la cavéoline-3 augmente l'activité GTPasique des protéines G trimériques alors qu'à des concentrations de l'ordre de la micromole, elle supprime cette activité.

b) Fonctions :

Les différentes cavéolines et la composition lipidique confèrent aux caveolae des propriétés et des fonctions particulières. Parmi les fonctions proposées, on compte la

transcytose, l'endocytose et la potocytose, la prolifération cellulaire, la transduction de signaux, l'ancrage de protéines et le transport du cholestérol.

La transcytose est le transport de molécules d'un pôle à l'autre de cellules. Ce transport se fait par bourgeonnement membranaire d'un pôle et fusion à l'autre pôle (64, 65). L'albumine, notamment, est transportée par transcytose au travers de la paroi capillaire (67). Ces constats proviennent d'analyses en microscopie électronique utilisant de l'albumine marquée à l'or colloïdal. D'autres ont observé, toujours en microscopie électronique, la formation de canaux intracellulaires dérivant des caveolae (65, 66). Plus récemment, un rôle des caveolae dans la transcytose de particules LDL de part et d'autre de la barrière hémato-encéphalique a été proposé (68) suite à des expériences de co-cultures d'astrocytes et de cellules endothéliales. La voie « transcytosique » des caveolae serait privilégiée par rapport à l'internalisation par les puits tapissés de clathrine qui conduit à la dégradation lysosomale de la particule LDL.

L'implication cavéolaire dans l'endocytose (l'internalisation sélective de grosses molécules vers les endosomes qui fusionnent ensuite avec les lysosomes) a été démontrée en microscopie électronique notamment par le fait que l'insuline et la toxine du choléra sont internalisées via les caveolae tandis que l' α_2 -macroglobuline est internalisée via les puits tapissés de clathrine (69, 70).

La potocytose est l'internalisation de petites molécules. Par exemple, l'acide folique, une vitamine, est internalisé via les caveolae. Son récepteur, une protéine ancrée à la membrane par un groupe GPI, a été localisé dans les régions bordant les caveolae par microscopie électronique à l'aide d'anticorps couplé à des billes d'or (71). De plus, ce récepteur est isolé dans les mêmes fractions que la cavéoline-1 dans un gradient d'Optiprep (72). Selon le modèle actuel, la potocytose de la vitamine s'effectue en quatre étapes : le récepteur au folate 1) capte la vitamine; 2) il y a alors fermeture de la caveolae, changement de pH à l'intérieur de l'organelle; 3) ouverture d'un pore, entrée de l'acide

folique dans la cellule; et 4) réouverture de la caveolae pour un nouveau cycle de potocytose (46). Dans ce cas-ci, il n'y aurait pas de bourgeonnement de la membrane.

Le contrôle de la prolifération cellulaire par les caveolae a été mis en lumière notamment parce que la cavéoline-1 est phosphorylée lorsque les cellules sont modifiées par la variante virale de l'oncogène *src* (58). Aussi, lorsque la protéine Ras localisée dans les caveolae (73, 74) devient activée, elle y recrute la protéine Raf et induit la cascade de MAP kinases (75) conduisant à la prolifération cellulaire. Par ailleurs, l'utilisation d'une séquence oligonucléotidique antisens afin de sous-réguler la cavéoline-1 transforme les fibroblastes NIH 3T3 en cellules tumorales et suractive la cascade de MAP kinases p42/p44 (76). Enfin, des cellules A459 (carcinome de poumon humain) résistantes au Taxol (drogue anti-tumorale) surexpriment la cavéoline-1 et démontrent, en microscopie électronique, une plus grande quantité de caveolae à la surface cellulaire (77).

Le rôle des caveolae dans la transduction de signaux est fortement suggérée par le fait que plusieurs molécules ayant ce rôle s'y retrouvent concentrées (pour revue, voir (89)). C'est le cas notamment des protéines SOS, Grb2 et Ras qui y ont été localisé par co-migration avec la cavéoline-1 dans des gradients d'Optiprep réalisés à partir de cellules Rat-1. Les protéines Ras et le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) co-migrent avec la cavéoline dans un gradient d'Optiprep. Lorsque les cellules sont mises en présence du ligand, l'EGF, on retrouve aussi Raf dans les fractions enrichies en cavéoline, indiquant que l'activation de la cascade de signalisation se fait bel et bien dans les caveolae. Cette activation permet de recruter Raf aux caveolae (73). D'autre part, dans une étude indépendante sur des cellules MDCK, Song a démontré que Ras co-migrait avec la cavéoline dans un gradient de sucrose et de carbonate de sodium. Il a aussi trouvé que les sous-unités $G_{i2\alpha}$ et G_{β} des protéines G hétérotrimériques co-migraient avec la cavéoline dans ce gradient (74). La co-migration avec la cavéoline de ces deux dernières avait déjà été démontrée par Smart dans des gradients d'Optiprep (80).

L'adénylate cyclase produit un second messenger majeur, l'AMPcyclique, impliqué dans l'activation de cascades de signallement comme celle de la protéine kinase A. Il a été proposé que la cavéoline-1, via sa région d'échaffaudage (scaffolding domain), soit capable d'inhiber l'activité des adénylate cyclases III et V (81) surexprimées dans des cellules d'insectes H5. Le mécanisme réel de cette inhibition reste toutefois à démontrer. Il se pourrait en effet que ce peptide de la cavéoline-1 lie la protéine G et inhibe ainsi l'activation de l'adénylate cyclase. L'interaction pourrait ne pas être aussi directe que les auteurs le sous-entendent.

Il a aussi été proposé que la phospholipase D (PLD) se trouve dans les caveolae, tout comme ses activateurs, le PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) (82) et la PKC α . Sur un gradient de sucrose en présence de TritonX-100, il a été trouvé que l'activité spécifique de la phospholipase D était concentrée dans les fractions où migre la cavéoline dans les cellules NIH 3T3 et sur les kératinocytes humains HaCaT (85). Toutefois, les auteurs détectèrent la PLD1 par immunodétection sur membrane (*Western blot*) dans les fractions **non**-cavéolaires. Ils proposent donc que ce soit la PLD2 (pour laquelle ils ne possèdent pas d'anticorps) qui soit responsable de cet effet.

La relation entre les caveolae et la protéine kinase C (PKC) a été montrée de diverses façon. D'abord, la PKC α co-localise avec la cavéoline dans des gradients d'Optiprep (80) réalisés à partir de fibroblastes cutanés humains. Ensuite, son activation par le PMA empêche l'internalisation des caveolae dans les cellules MA104 (83), inhibant ainsi la potocytose du folate. Par ailleurs, la cavéoline de souris possède une région putative de phosphorylation par la PKC (84). Enfin, la PKC α co-migre avec la cavéoline dans un gradient d'Optiprep réalisé à partir de cellules Rat-1, mais seulement lorsque la concentration de calcium est suffisante (86). Aussi, dans des cardiomyocytes, les PKC α , δ et ϵ activées sont transloquées aux caveolae, tel qu'observé par co-migration avec la cavéoline sur gradient de sucrose en présence de carbonate de sodium (87).

Enfin, des récepteurs à activité tyrosine kinase (78) (tels que le récepteur à l'insuline), les récepteurs à neurotrophines et de non-récepteurs à activité tyrosine kinase comme Grb2, Ras, les protéines hétérotrimériques liant le GTP (G_{α} et G_{β}), et ERK2 ont été localisées dans les LDM (*low-density membrane*, voir ci-après, section 2c)iii) de synaptosomes de rat, par centrifugations sur gradients d'Optiprep.

Les caveolae servent de site d'ancrage pour plusieurs protéines. Plusieurs auteurs suggèrent qu'on y retrouve en effet les protéines ancrées du côté externe de la membrane par un groupe GPI (récepteur au folate, phosphatase alcaline). Toutefois, les travaux de Schnitzer (88) suggèrent qu'il est possible que les techniques d'isolement utilisées aient induit des co-migrations entre la cavéoline et ces protéines. Pour lui, la co-migration des protéines à GPI avec les caveolae est artéfactuellement induite par les techniques de purification.

D'autre part, du côté intracytoplasmique de la membrane, les protéines possédant une modification lipidique palmitate ou myristate (Ras, protéines G hétérotrimériques (79), cavéoline-1, eNOS) se retrouvent en association avec les caveolae. Dans certains cas, la cavéoline-1 joue un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique. C'est le cas notamment de eNOS (90, 91) qui lui est associée dans sa forme inactive, mais qui s'en dissocie en présence de calmoduline activée et produit l'oxyde nitrique, un puissant vasodilatateur.

Le transport du cholestérol est un rôle important des caveolae dont il a déjà été fait mention plus haut.

2. Complexité du transport cellulaire

On distingue généralement trois types de vésicules de transport : les vésicules tapissées de clathrine, les vésicules tapissées de coatamères et les caveolae.

a) Les vésicules tapissées de clathrine

Ces vésicules servent notamment à l'importation de molécules ou de particules à l'intérieur de la cellule. Par exemple, lorsque la particule LDL vient en contact avec son récepteur, il y a alors association de triskélions de clathrine pour former une cage. Une fois que la particule est internalisée, la cage se dissocie et la *clathrine redevient cytosolique* (92). La particule, dans son endosome primaire, est alors acheminée au lysosome, tandis que le récepteur est recyclé à la surface cellulaire (39).

b) les vésicules tapissées de coatamères

Ces vésicules effectuent un transport non-spécifique du réticulum endoplasmique vers le Golgi et vice-versa, entre les différentes citernes golgiennes, et du trans-Golgi vers la membrane. Ce processus requiert que les protéines entourant la vésicule, *les coatamères*, composés eux-mêmes de l'assemblage de protéines *COPs* (*Coatamer proteins*) demeurent en permanence associées à la vésicule jusqu'à ce qu'elle ait atteint sa cible. Contrairement à l'enrobage de clathrine, il semble que l'assemblage du manteau de coatamères requière un apport énergétique dépendant de l'ATP (39). Par ailleurs, la protéine ARF, une GTPase monomérique acylée, joue un rôle primordial dans l'assemblage et la dissolution du manteau.

c) les caveolae et autres dénominations

i) les «DRMs», «DIGs» et les «GEMs»

Les caveolae ont déjà été décrites précédemment. Cependant, le mot «caveola» n'est pas uniformément utilisé. Brown (93, 94) les nomme *DRM* (*detergent-resistant membranes*), vu leur insolubilité dans le Triton X-100. Elle fait cependant remarquer que les *DRMs* en question contiennent probablement aussi une partie du trans-Golgi (TGN)

(93), leur site d'origine, puisque sa composition lipidique est similaire à celle des *DRMs* membranaires (95) (caveolae). Certains (96, 97) utilisent aussi la dénomination des *DIGs*, c'est-à-dire des «*detergent-insoluble, glycosphingolipid-enriched complexes*», ou encore des *GEMs* (28, 98), des «*glycosphingolipids-enriched membranes*», en faisant référence cette fois aussi au fait que les domaines sont enrichis en glycosphingolipides.

ii) les «*LDMs*» et les «*LDTIs*»

Par ailleurs, certains ont trouvé des «simili-caveolae» («*caveolae-like*») dans des cellules n'exprimant pas la cavéoline (78, 99, 100). Ils appelèrent alors ces domaines des *LDMs*, «*low density membranes*» (78), en faisant référence à leur flottation dans un gradient d'Optiprep. D'autres les nomment des *LDTIs* «*low-density Triton-insoluble*» (99), en faisant encore référence à leur insolubilité au détergent et à leur flottation dans un gradient de sucrose. Cette dernière dénomination a été utilisée aussi lors de la détection de ces domaines chez la levure *S. cerevisiae* (101).

iii) les «rafts» et le «TGN»

L'apparition de «simili-caveolae» sans cavéoline et résistantes au détergent, a fait surgir l'hypothèse que la cavéoline ne soit pas indispensable au maintien de la structure cavéolaire. En outre, il a été démontré que lorsque le cholestérol est oxydé au moyen de la cholestérol oxydase, la cavéoline quitte la caveola et retourne au TGN, sans pour autant modifier la morphologie de l'organelle (102). Cependant, la déplétion en cholestérol par l'utilisation de drogues liant le cholestérol ou inhibant sa synthèse a un effet dramatique sur la morphologie cavéolaire en l'aplatissant (8). Pour concilier ces deux idées, Simons proposa l'existence de «*rafts*», des radeaux de glycosphingolipides et de cholestérol flottant dans une mer de phospholipides (96, 97). Ces «*rafts*» sont littéralement des plates-formes rigides, capables d'agrégations latérales induites par un stimulus, et qui iraient même jusqu'à s'invaginer, le tout fortifié par la cavéoline ; elle serait en quelque sorte l'anneau autour du baril. Cette hypothèse est renforcée par l'apparition de caveolae dans les cellules n'en possédant pas lorsqu'elles sont transfectées avec le gène de la cavéoline (103).

En 1994, Mayor a démontré que les protéines ancrées par GPI étaient artéfactuellement retrouvées dans les caveolae. Il a trouvé que la bivalence d'un anticorps secondaire utilisé pour visualiser ces protéines en microscopie électronique était la raison de leur concentration apparente dans les caveolae (104). Pour Simons, les protéines à GPI sont ancrées dans les «rafts» et l'utilisation d'un anticorps secondaire permet l'agrégation des «rafts». Ces derniers s'invaginent alors pour former la caveolae, le tout renforcé par la cavéoline.

Toutefois, la chose se complique puisque ces plate-formes sont capables d'être internalisées. Fielding propose que la caveola soit une structure fixe à la membrane tandis que les «rafts» transportent des molécules comme le cholestérol, les protéines à GPI et la cavéoline de la caveola jusqu'au TGN ou vice-versa (105).

iv) les *caveolae*

Que sont les caveolae ? Elles sont probablement des agrégats de rafts insolubles au Triton, maintenus ensembles par la cavéoline dans certains types cellulaires, ayant une faible densité dans un gradient de sucrose ou d'Optiprep et dérivant du TGN. Enfin, le fait qu'elles soient strictement confinées à la membrane plasmique ou mobiles n'a pas été définitivement élucidé (43).

5. Les techniques d'isolement des caveolae

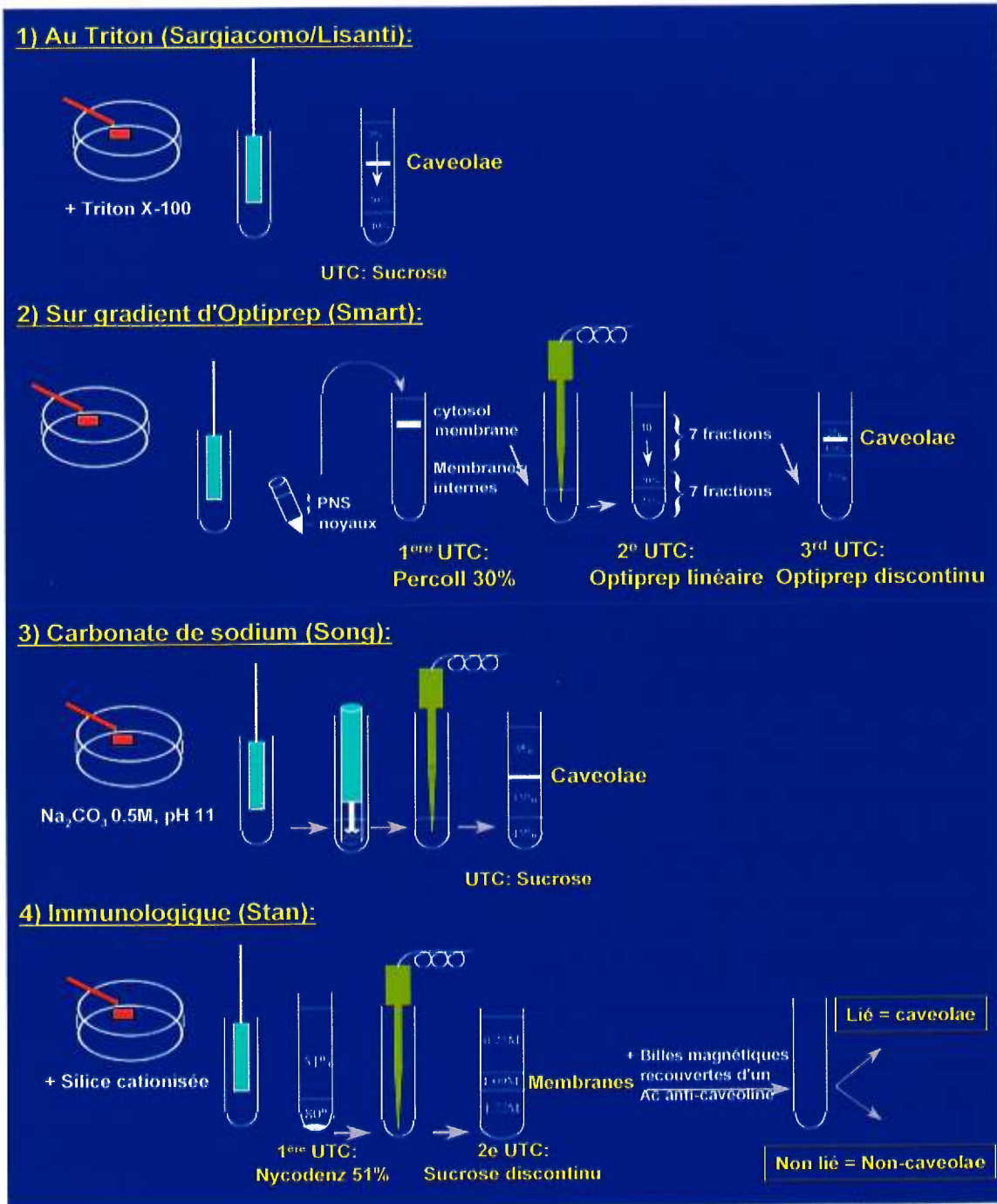
Les premières caractérisations effectuées sur les caveolae furent d'abord d'ordre morphologiques. Ces observations furent obtenues à l'aide du microscope électronique (38). Vinrent ensuite des techniques biochimiques permettant d'isoler l'organelle sur gradient de sucrose (42). L'insolubilité au Triton fut premièrement utilisée pour les isoler. Vinrent ensuite les techniques sans détergent, puis celles immunologiques. Aujourd'hui, les techniques les plus couramment utilisées sont celles décrites par Sargiacomo/Lisanti (106, 107), Smart (80), Song (74) et Stan (108). Ces techniques sont représentées schématiquement à la **figure 4** dans leur ordre chronologique d'apparition. Il existe bien sûr d'autres techniques moins utilisées (109) et des variantes de techniques déjà existantes (110, 111).

a) La technique de *Sargiacomo/Lisanti* ou la technique *au Triton X-100*

Cette technique fait appel à la propriété que possèdent les domaines riches en sphingolipides et en cholestérol de flotter sur un gradient de sucrose. Elle fut la première couramment utilisée et qui permit de mettre à jour plusieurs caractéristiques et propriétés des caveolae. Elle consiste principalement à lyser les cellules dans un tampon contenant du Triton X-100 et à déposer l'homogénat sous un gradient de sucrose linéaire. Après une centrifugation de 16 à 20h, les caveolae flottent à une faible densité dans ce gradient. L'utilisation d'un détergent permet habituellement de solubiliser les protéines en masquant les sites hydrophobes sur ces dernières. Le détergent solubilise aussi les lipides en interagissant avec leur portion hydrophobe. C'est de cette propriété qu'il est fait usage ici puisque la forte interaction cholestérol/sphingolipide rend ces microdomaines résistants au détergent.

Toutefois, il a été démontré que des détergents liant les lipides (comme la saponine) brisaient cette interaction rendant le complexe cholestérol/sphingomyéline si stable (94). Dans une étude dans laquelle l'intégrité lipidique est importante, l'utilisation d'un

détergent entraîne aussi des risques de solubilisation partielle d'une composante étudiée. L'utilisation de cette technique présente donc certains inconvénients. Aussi, d'autres techniques sans détergent ont ensuite été utilisées et permirent de découvrir que le détergent causait le relâchement de l'organelle de molécules qui y étaient associées comme le récepteur à l'EGF (80) et des molécules prénylées (74) comme $G_{\beta\gamma}$ (109) et Ras (112).



(légende page suivante→)

Figure 4: Techniques courantes d'isolement des caveolae (présentées selon leur ordre chronologique d'apparition dans la littérature). Dans la première (1), les cellules sont récoltées dans un tampon contenant du Triton X-100, homogénéisées et déposées sous un gradient continu de sucrose. Après une centrifugation de 16-20h, une bande blanche flottant dans le gradient contient les caveolae. Dans la technique de Smart (2), les cellules sont récoltées, puis homogénéisées. Le surnageant post-nucléaire est déposé sur un gradient de Percoll 30%, lequel, après centrifugation, donne une bande blanche contenant les membranes plasmiques. La bande blanche est recueillie, soumise à une sonification, ajustée à 23% d'Optiprep et recouverte d'un gradient de 20-10% d'Optiprep. Après centrifugation, les fractions supérieures contenant les caveolae sont concentrées par un deuxième gradient d'Optiprep, discontinu cette fois-là. Ce dernier gradient permet de recueillir les caveolae dans une seule fraction. Dans la technique de Song (3), les cellules sont récoltées dans un tampon basique de carbonate de sodium, homogénéisées, broyées, sonifiées, puis déposées sous un gradient discontinu de sucrose. Après la centrifugation, les caveolae sont recueillies à l'interface 5/35% de sucrose. Dans la technique de Stan (4), le tissu est perfusé avec de la silice cationisée, homogénéisées, et déposées sous une solution de Nycodenz 51% (gradient autoformant). Le culot résultant de cette centrifugation est récolté, sonifié puis séparé dans un gradient discontinu de sucrose. La fraction correspondant aux membranes est extraite puis incubée en présence de billes magnétiques préalablement recouvertes d'un anticorps anti-cavéoline. Après l'incubation, il ne reste plus qu'à récolter les billes, et le matériel qui leur est lié est nul autre que les caveolae.

b) La technique de *Smart* ou la technique avec *Optiprep*

Première technique sans détergent, elle est réalisée en trois principales étapes. Premièrement, le lysat cellulaire dépourvu de noyaux est déposé sur un gradient de Percoll permettant d'isoler, après 30 minutes de centrifugation, une fraction contenant la membrane plasmique. La fraction membranaire est sonifiée et placée sous un gradient continu d'Optiprep. Les fractions supérieures obtenues de ce premier gradient d'Optiprep (durée de centrifugation de 90 minutes) sont regroupées puis recouvertes d'un gradient discontinu d'Optiprep. Après centrifugation (90 minutes), les caveolae se retrouvent flottant dans une seule fraction de ce gradient .

c) La technique de *Song* ou la technique *au carbonate de sodium*

Cette technique est en tout point similaire à celle de Sargiacomo/Lisanti, sauf en ce qui a trait au détergent. En effet, les cellules sont récoltées dans un tampon contenant du carbonate de sodium, homogénéisées, broyées et placées sous un gradient discontinu de sucrose. Après une centrifugation de 16 à 20h, les caveolae flottent à une interface. Le carbonate de sodium est couramment utilisé afin de déterminer si une protéine est associée à la membrane par un ancrage direct ou par une interaction protéine/protéine (113). Le carbonate de sodium à pH très alcalin change les charges partielles des protéines et cause leur désappariement (114). À partir de ce principe, le carbonate de sodium est aussi utilisé pour l'isolement d'organelles (115).

d) La technique de *Stan* ou la technique *immunologique*

Il y est fait usage d'un anticorps anti-cavéoline afin d'isoler les caveolae des autres compartiments membranaires. Le procédé débute avec l'adsorption de billes de silice cationisées à la surface cellulaire. Après homogénéisation, le lysat est placé sous un gradient de Nycodenz. Après une heure de centrifugation, le culot contenant les membranes est nettoyé, puis soniqué et déposé sous un gradient discontinu de sucrose. Ce gradient centrifugé de 16 à 20h donne une fraction flottante qui est ensuite incubée pendant la nuit en présence de billes magnétiques recouvertes d'un anticorps anti-cavéoline. Les billes sont ensuite séparées magnétiquement, les caveolae étant rattachées à ces billes. Cette technique a été moins utilisée jusqu'à maintenant en raison d'une non-disponibilité commerciale de l'anticorps anti-cavéoline utilisé.

6. Quelques principes en biologie cellulaire

Les techniques d'isolement en biologie cellulaire sont l'application physico-chimiques qu'il convient ici de rappeler. Ces lois concernent notamment l'homogénéisation, la centrifugation et la séparation de constituants par chromatographie et électrophorèse. Il a été jugé superflu de faire une description exhaustive de tous les principes utilisés. Toutefois, un rappel des principes généraux s'impose.

a) Homogénéisations

i) Manuelle

L'homogénéisation manuelle est habituellement réalisée à l'aide d'un «Potter» ou d'un «Dounce». Le nombre de coups de piston à exécuter dépend du tissu et du jeu entre le piston et le cylindre. Le but est de briser les cellules sans endommager les noyaux et les organites. Il faut généralement environ 10 coups de piston, mais on ne devrait pas dépasser 20. On considère qu'on a une bonne homogénéisation lorsque 80-90% des cellules sont brisées et que les noyaux sont intacts (116). Le milieu d'homogénéisation doit être iso-osmotique (dans le cas d'isolation d'organites) et de pH neutre afin de conserver l'intégrité des compartiments cellulaires. Les cations divalents comme le Ca^{2+} ou le Mg^{2+} sont nécessaires à la conservation des noyaux intacts, cependant ils sont aussi responsables du phénomène de *coacervation*, c'est-à-dire l'agrégation lente et irréversible de particules. Il est donc impératif de contrôler la quantité d'ions divalents afin de minimiser l'agrégation entre les membranes. Ceci peut être réalisé à l'aide d'EDTA, chélateur d'ions divalents, ou d'EGTA, chélateur de Ca^{2+} seulement. À noter que l'utilisation d'anti-protéases est recommandée, les protéases endogènes étant très actives lors de leur relargage. Finalement, le processus doit être réalisé rapidement et à 4°C afin d'éviter la dégradation et l'agrégation des structures.

ii) Sonification

La sonification brise les structures à l'aide d'ultrasons. Il est généralement recommandé de faire attention avec ce processus capable même de briser des macromolécules. Encore une fois, le processus doit être réalisé à basse température (4°C).

b) Centrifugations

i) Principes généraux

La centrifugation permet de créer un effet centrifuge imitant la gravité. On calcule, dans une centrifugation, que la force centrifuge relative (RCF = *relative centrifugal force*) exprimée en nombre de «g» est donnée par :

$$\text{RCF} = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (1) \quad \begin{array}{l} \text{où } \omega = \text{vitesse angulaire (radians/sec)} \\ r = \text{rayon} \\ g = \text{force gravitationnelle} \end{array}$$

Toute particule sphérique soumise à une force gravitationnelle dans un liquide suit l'équation de Stokes :

$$v = \frac{d^2 (\rho_p - \rho_l) X g}{18 \mu} \quad (2) \quad \begin{array}{l} \text{où } v = \text{vitesse de sédimentation de la sphère} \\ d = \text{diamètre de la sphère} \\ \rho_p = \text{densité de la particule} \\ \rho_l = \text{densité du liquide} \\ \mu = \text{viscosité du liquide} \end{array}$$

g = force gravitationnelle

ii) Types : isocynétique et isopycnique

On distingue deux types de centrifugations préparatives : la centrifugation isocynétique (zonale, différentielle ou de vitesse) et la centrifugation isopycnique.

La centrifugation isocynétique est utilisée entre autres afin de déterminer le coefficient de sédimentation (S) d'une particule. Dans cette technique, le matériel de départ est déposé sur un gradient préformé. La vitesse de sédimentation des particules augmenterait à mesure qu'une particule évolue dans le gradient, si ce n'était justement que ce gradient de viscosité croissante contrebalance la force centrifuge. Les particules se déplacent donc dans le gradient en fonction de leur vitesse de sédimentation. Cette vitesse

permet de calculer le coefficient de sédimentation (s) exprimé en Svedbergs (S) (10^{-13} sec) propre à la particule:

$$dr/dt = s \omega^2 r \quad (3) \text{ où } s = \text{coefficient de sédimentation (S)}$$

$r = \text{distance entre la particule et le centre de rotation (cm)}$
 $\omega = \text{vitesse angulaire (radians/sec)}$
 $dr/dt = \text{vitesse de la particule (cm/sec)}$

Dans cette technique, la densité du milieu doit être inférieure à la densité intrinsèque de l'organelle pendant la centrifugation. Ceci est utile si l'on veut déterminer un coefficient de sédimentation.

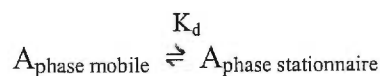
La centrifugation isopycnique est utilisée pour l'isolement de particules. C'est ce type qui est utilisé dans les gradients de sucrose et d'Optiprep et même de Percoll (117). Dans cette technique, le matériel est déposé au fond du tube et recouvert d'un gradient continu ou discontinu. La séparation se fait alors suivant la densité de la structure. En effet, la particule va migrer dans le gradient jusqu'à ce que la densité du milieu soit égale à la sienne. En effet, à ce moment, le numérateur de l'équation (2) devient égal à zéro, et donc la vitesse résultante de la particule devient zéro aussi.

c) Techniques de séparation

i) Chromatographie sur couche mince (CCM)

La technique est basée sur la partition d'une molécule entre deux phases immiscibles : l'une solide stationnaire (plaque de silice) et l'autre liquide et mobile (solvant d'élution). Chaque particule d'un mélange possède une affinité plus ou moins grande pour chaque phase. Chaque particule possède donc une constante de dissociation qui lui est propre :

Soit la particule A en équilibre entre une phase mobile et une phase stationnaire :



On peut donc lui attribuer un $K_d = \frac{[A]_{\text{stationnaire}}}{[A]_{\text{mobile}}}$

Dans le cas où la phase stationnaire est composée de silice et la phase mobile composée de solvants organiques, une molécule ayant une K_d faible sera facilement transportée par l'éluant organique et migrera plus haut sur une plaque chromatographique. C'est le cas généralement d'une substance très liposoluble. En revanche, une molécule au K_d élevé sera plus retenue par la phase stationnaire et ne migrera que peu ou pas du tout. C'est le cas d'une substance hydrosoluble possédant plus d'affinité pour la silice que pour l'éluant organique.

ii) Électrophorèse

Lorsque des protéines sont mises en présence du réducteur β -mercaptoéthanol et du détergent SDS, les ponts disulfures sont brisés et les molécules sont linéarisées. Le SDS étant un détergent ionique, toute la surface protéique est ainsi recouverte de charges négatives. Dans un gel sur lequel on applique un champ électrique, les protéines chargées négativement vont se déplacer vers la borne positive. Les plus grosses molécules sont en principe plus chargées négativement et devraient se déplacer plus rapidement vers la borne positive que les petites. Cependant, le gel a un rôle de tamis moléculaire, permettant aux petites protéines de se faufiler plus facilement que les grosses. Il en résulte que dans un gel de polyacrylamide, les plus petites molécules se déplacent plus facilement vers la borne positive que les grosses, permettant une séparation selon la taille.

DEUXIÈME PARTIE: HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

Dans la cellule normale, le cholestérol est rapidement transporté des compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique en réponse à une stimulation par les HDL. Cependant, notre laboratoire a montré par le passé que des patients ayant un phénotype de HDL bas de type «FHD» avaient un problème de transport intracellulaire de cholestérol.

Puisque les caveolae sont des domaines enrichis en cholestérol, impliqués dans la transduction de signaux par les protéines G, la phospholipase D et la PKC, et impliqués dans le transport du cholestérol, il fut impératif de se tourner vers ces structures afin de regarder si leur fonctionnement était compromis chez les patients avec FHD.

Dans le cadre d'un projet voulant déterminer l'implication des caveolae dans le transport du cholestérol induit par les HDL et voir si ce transport est défectueux chez les patients avec FHD, il a fallu mettre au point une technique permettant d'isoler les caveolae.

Face aux techniques disponibles, les questions suivantes ont été posées:

1. Quels sont les paramètres expérimentaux à respecter pour isoler les caveolae par une technique donnée?
2. Les différents protocoles permettent-ils une définition biochimique identique des caveolae?
3. Quel protocole est le plus approprié pour étudier le transport du cholestérol?

Pour répondre à ces questions, la stratégie suivante a été employée:

1. Identifier les étapes critiques d'une technique donnée et faire varier ces paramètres pour déterminer quelles sont les conditions optimales d'isolement;
2. Évaluer les autres techniques;
3. Comparer les techniques entre elles.

TROISIÈME PARTIE: MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

Les fibroblastes sont obtenus de donneurs volontaires par biopsie de la peau. Les cellules HUVEC sont de American Type Culture Collection (ATCC # 1730-CRL), Rockville, Maryland. Le milieu de culture pour fibroblastes (DMEM), la pénicilline/streptomycine, la trypsine-EDTA, le sérum NCS (*Newborn Calf Serum*) le FCS (*Fetal Calf Serum*) et l'héparine sont de Life Technologies. Le milieu de culture des cellules HUVEC, le M-199, ainsi que l'ECGS (#E0760) sont de Sigma. Pour les autres solutions, le sucrose est de Life Technologies, la tricine, l'EDTA·2H₂O, le MES, le Na₂CO₃, l'acide trichloroacétique (TCA) et le déoxycholate de sodium sont de Sigma. Le Triton X-100, l'acrylamide, β-mercaptoéthanol, le persulfate d'ammonium et le réactif de Bradford sont de Bio-Rad. Le PMSF et l'aprotinine sont de ICN. La leupeptine et la glycine sont de Boehringer Mannheim. Le Percoll et les billes de densité sont de Pharmacia. L'Optiprep est de Life Technologies. La membrane de PVDF Immobilon-P est de Millipore Canada. Les anticorps monoclonaux (anti-clathrine #C43820, anti-Hsp70 #H53220, anti-calnexine #C45520, anti-PKCα #P16520, anti-cavéoline #C37120) et l'anticorps polyclonal (anti-cavéoline #C13630) sont de Bio/Can Scientific, distributeur pour Transduction Laboratories, Lexington, KY. Les anticorps secondaires anti-souris (#NA931) et anti-lapin (#NA934) couplés à la peroxidase sont de Amersham. Le réactif nécessaire à la révélation de l'activité de la peroxidase est de Chromatographic Specialties, distributeur pour Pierce. Les réactifs pour l'activité galactosyltransférase et un ensemble (*kit*) pour la mesure de l'activité lactate déshydrogénase sont de Sigma. Les plaques chromatographiques «Whatman Diamond LK6F silica gel 60A», le cholestérol tritié (NET-139), ainsi que la choline tritiée (NET-109) sont de Mandel. Le méthanol, le chloroforme, le bisacrylamide et le SDS sont de ACP. Le NaCl est de BDH. Le Tris, le Tween-20, le scintillant et l'éther éthylique sont de Fisher Scientific. L'heptane est de Laboratoires MAT.

2. Culture cellulaire. Au jour 0, 250 000 fibroblastes humains/pétris de 150mm sont ensemencés dans du DMEM pénicilline/streptomycine (100U/ml) + 10% NCS. Les cellules sont radiomarquées selon la méthode de Mendez (118) avec quelques modifications. Brièvement, au jour 3 (approximativement à la mi-confluence), le milieu est changé pour du milieu frais auquel on ajoute 0.1 μ Ci/ml de 3 H-cholestérol pour marquer le cholestérol cellulaire et 0.1 μ Ci/ml de chlorure de 3 H-choline (de l'anglais *3 H-choline chloride*) pour marquer la sphingomyéline et la phosphatidylcholine. Au jour 6, à 95-100% confluence, le milieu est retiré et on procède à l'isolement des caveolae. Pour les cellules HUVEC, les pétris sont préalablement recouverts de 10 μ l/cm² de gélatine (Sigma) et au jour 0, 500 000 cellules/pétris sont ensemencées dans du M-199 pénicilline/streptomycine (100U/ml) + 10% FCS. À tous les deux jours, la moitié du milieu est retirée et remplacée par du frais. À 90% confluence, le milieu est retiré et on procède à l'isolement des caveolae.

3. Isolement des caveolae

a) Méthode au Triton X-100 Elle est réalisée en suivant la technique de Lisanti (107) avec quelques modifications. Deux pétris (150mm) confluent sont rincés deux fois avec 10ml de PBS froid. Les cellules du premier pétri sont récoltées à l'aide d'un grattoir à cellules dans 1ml de MBS (MBS = 0.25mM MES, 0.15M NaCl, pH 6.5) contenant 1% de Triton X-100 et 1mM de PMSF. La suspension est transférée dans le second pétri et les cellules sont récoltées au grattoir. La suspension cellulaire est transférée dans un homogénéisateur de 2ml (Wheaton # 08-414-16A). Le volume est ajusté à 2ml avec du MBS/PMSF + 1% Triton X-100 et les cellules sont homogénéisées à l'aide de 10 ou 20 coups de piston. Le lysat est ensuite placé dans un tube pour rotor Beckman SW41 et 2ml de sucrose 80% préparé dans MBS sont ajoutés. Après avoir mélangé au vortex pour 5 secondes, un gradient **discontinu** est formé en déposant 3.5ml de sucrose 30%/MBS avec précaution sur la couche de 40%. Sur la couche de 30% de sucrose, sont déposés 3.5ml de sucrose 5%/MBS, avec précaution, en évitant de perturber la couche inférieure. La préparation est ensuite centrifugée à 39 000 rpm pendant 20h à 4°C, avec accélération et décélération douces. Dix fractions de 1.1ml sont récoltées à l'aide d'une pipette

automatique à partir du haut du tube. Le culot au fond du tube est resuspendu et réhomogénéisé dans la dixième fraction.

b) Méthode au carbonate de sodium. Cette technique est réalisée selon celle publiée par Song et collaborateurs (74) avec quelques modifications.

Avec homogénéisateur : un pétri confluent de 150mm est rincé deux fois avec 10ml de PBS froid. Les cellules sont ensuite récoltées au grattoir dans 1ml de Na_2CO_3 0.5M dans H_2O , pH \sim 11.3 (le pH ne doit pas être ajusté, Michael P. Lisanti, communication personnelle) contenant 10mM de PMSF, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'aprotine et 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptine et transférées dans un homogénéisateur de 2ml. Le volume est ajusté à 2ml avec le même tampon et les cellules sont homogénéisées sur glace avec 20 coups de piston. L'homogénat est transféré dans un tube pour rotor Beckman SW41 et sonifié à l'aide d'un Vibra Cell Sonicator 400W, 3X 20s, avec les paramètres indiqués ci-après.

Avec le Polytron : deux pétris confluent de 150mm sont rincés deux fois avec 10ml de PBS froid. Les cellules du premier pétri sont récoltées au grattoir dans 1ml de Na_2CO_3 0.5 M pH \sim 11.3 et transférées dans le deuxième pétri. Les cellules du deuxième pétri sont grattées puis transférées dans un tube pour rotor Beckman SW41. Le volume est ajusté à 2ml avec le même tampon. Les cellules sont ensuite homogénéisées sur glace à l'aide d'un Polytron 3 X 10s. Elles sont ensuite sonifiées 3X 20s avec les paramètres indiqués ci-après (voir section résultats).

La concentration de sucrose est ensuite ajustée à 45% par l'ajout d'un volume (2ml) d'une solution de 90% sucrose/MBS (25mM MES, 0.15M NaCl, pH 6.5), puis vortexé 5 secondes. Afin de retirer \sim 90% des bulles d'air, le tube est centrifugé brièvement, 5 min, à 2000 rpm (\sim 1000g). Puis sont déposés 3.5ml de sucrose 35%/MBS contenant du Na_2CO_3 0.25M et une couche de 3.5ml de sucrose 5%/MBS/ 0.25M Na_2CO_3 . Après 18h de centrifugation à 39 000 rpm à 4°C avec accélération et décélération douces, dix fractions de 1.1ml sont récoltées à la pipette automatique en commençant par le haut. Le culot est resuspendu dans la dernière fraction.

c) Méthode au gradient d'Optiprep. Cette technique est réalisée en suivant le modèle publié par Smart et collaborateurs (80) avec quelques modifications. Est décrite ici la préparation des solutions, car cette étape est, en elle-même, une source d'erreurs fréquente (Eric J. Smart, communication personnelle).

Préparation des solutions :

Tampon A **2X** : 0.5M sucrose/2mM EDTA/40mM Tricine, pH 7.8;

Tampon A **1X** : Tampon A **2X**/H₂O nanopure dans une proportion de 1:1;

Percoll 30% : Percoll/tampon A **2X**/H₂O, dans une proportion de 30 : 50 : 20;

Tampon B : 0.25M sucrose/6mM EDTA/120mM Tricine, pH 7.8;

Optiprep 50% : Optiprep/tampon B, dans une proportion de **5 : 1**;

Optiprep 20% : Optiprep 50%/tampon A **1X** dans une proportion de 2 : 3;

Optiprep 10% : Optiprep 50%/tampon A **1X** dans une proportion de 1 : 4.

Isolement des caveolae : 5 pétris à 90% confluence de 150mm sont rincés deux fois avec 10ml de tampon A 1X. Les cellules de chaque pétri sont récoltées à l'aide d'un grattoir dans 6ml de tampon A 1X et combinées dans un tube de 50 ml. Les cellules sont concentrées au fond du tube par centrifugation douce à 1750rpm (700g) dans une centrifugeuse Beckman GS-6R. Le surnageant est décanté et le culot est suspendu dans 1ml de tampon A 1X en vortexant. La suspension est transférée dans un homogénéisateur et homogénéisée avec le nombre de coups de piston indiqués ci-après (voir section résultats). L'homogénat est transféré dans un tube de type *Eppendorf*TM et centrifugé à 1000g (3500rpm) dans une microcentrifugeuse *Eppendorf*TM 5415C à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant post-nucléaire (PNS= *post-nuclear supernatant*) (1ml) est récolté et conservé sur glace. Le culot est resuspendu dans 1ml de tampon A 1X, réhomogénéisé avec le même nombre de coups et recentrifugé avec les mêmes paramètres. Le surnageant est récolté (~1ml) et combiné à celui gardé sur glace précédemment. Le surnageant post-nucléaire (~2ml) est déposé sur 23 ml de Percoll 30% dans un tube de 25ml pour un rotor Beckman 60Ti. La préparation est centrifugée pendant 30 minutes à 29 000rpm à 4°C. Après centrifugation, des fractions de 1ml sont récoltées à la pipette automatique en

commençant par le haut. D'une façon routinière, on récolte le premier millilitre que l'on considère comme un fraction cytosolique (Cyto) et on retire le matériel au-dessus de la bande blanche à environ 5.7cm du bas du tube. La bande blanche est retirée et considérée comme la fraction membranaire (PM). Les fractions sous la bande blanche sont laissées dans le tube, on complète le volume à 25ml avec du tampon A 1X et on centrifuge à 55 000rpm pendant 45 min à 4°C. La bande blanche flottant au dessus du culot de Percoll est récoltée et considérée comme étant la fraction des membranes internes (IM).

Le Percoll doit être retiré des fractions PM et IM avant tout dosage de protéines. Ceci est réalisé en centrifugeant ces fractions pendant 30 minutes dans un rotor Beckman 120.4Ti à 90 000rpm à 4°C. La bande blanche au-dessus du culot de Percoll est récoltée ainsi que tout le surnageant.

Lorsque l'on poursuit au gradient d'Optiprep, le volume de la fraction PM récoltée est ajusté à 2ml avec du tampon A 1X pour être ensuite sonifiée 3X 10s avec les paramètres indiqués ci-après dans un tube pour rotor Beckman SW41. Cette fraction est alors ajustée à 23% d'Optiprep à l'aide de 1.84ml d'Optiprep 50% et de 0.16ml de tampon A 1X. Après avoir mélangé au vortex pendant 5 secondes, un gradient linéaire d'Optiprep (3ml de 20% + 3ml de 10%) est déposé au-dessus à l'aide d'une pompe. Le tout est ensuite centrifugé pendant 90 minutes à 17 500rpm à 4°C avec accélération et décélération douces. Quatorze fractions de 700µl sont récoltées à la pipette automatique en commençant par le haut.

4. Dosage des protéines. Les protéines sont dosées selon le protocole proposé par la compagnie Bio-Rad. Brièvement, 100µl de chaque fraction sont mélangés à 3ml de réactif de Bradford 5X préalablement dilué avec quatre volumes d'eau. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant de l'albumine de sérum de bovin (BSA).

5. Mesure des lipides. Les lipides sont extraits en ajoutant 1ml d'un mélange de chloroforme/méthanol (2 : 1) à un aliquot de 200µl de chaque fraction dans un tube de

type *Eppendorf™*, avec agitation par inversion toute la nuit (*over-night ~16h*). Deux cent quarante microlitres d'une solution de NaCl 0.9% froid sont ajoutés et le mélange est centrifugé pour 10 minutes à 4°C dans une microcentrifugeuse *Eppendorf™ 5415C* à 5000 rpm. La phase supérieure contenant les protéines est retirée et la phase inférieure est évaporée sous atmosphère d'azote. Les lipides sont conservés à -20°C jusqu'à leur séparation par CCM.

Lors de l'extraction de lipides sur des fractions contenant des traces de Percoll, ce protocole est modifié. Après extraction par inversion toute la nuit, les tubes sont laissés en position verticale pour 1h à 4°C. La phase supérieure (couche blanche) est retirée par aspiration et séparation de phase à l'intérieur même de l'embout de la pipette. Une fois le maximum de la phase supérieure retirée, 120µl de NaCl 0.9% froid sont ajoutés et le tube refermé est vortexé 5 secondes, puis centrifugé 10 min à 5000rpm, 4°C. La phase supérieure est retirée et 350µl de phase organique sont transférés dans un nouveau tube et évaporés sous atmosphère d'azote. Les lipides sont conservés à -20°C jusqu'à leur séparation par CCM.

Un système a été mis au point pour permettre la séparation des esters de cholestérol, du cholestérol libre, de la phosphatidylcholine et de la sphingomyéline sur une seule plaque chromatographique avec deux systèmes d'élution différents. Les lipides sont resuspendus dans 30µl de chloroforme contenant un mélange de cholestérol oléate, cholestérol, phosphatidylcholine et sphingomyéline froids (2mg/ml chacun) pour aider à la visualisation des lipides. Chaque tube est ensuite rincé avec 20µl de chloroforme qui est déposé sur la plaque. Le premier système d'élution contient de l'heptane/éther éthylique/méthanol/acide acétique dans une proportion de 80 : 30 : 3 : 1.5. Quand l'éluant atteint le haut de la plaque, elle est séchée 10 minutes à la température de la pièce et est déposée dans la deuxième chambre d'élution contenant chloroforme/méthanol/eau dans une proportion de 65 : 35 : 4. On laisse alors migrer l'éluant jusqu'à une hauteur de 14 cm calculé à partir du bas de la plaque (voir **figure 5**).

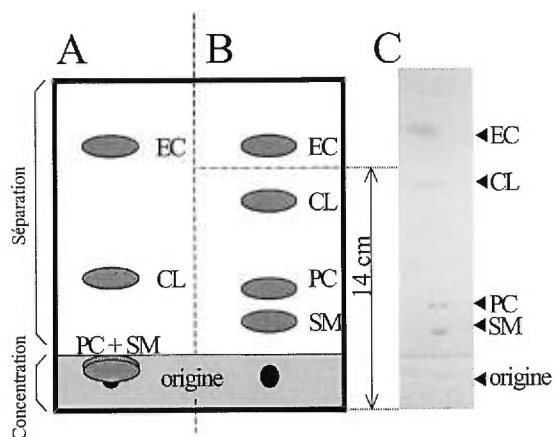


Figure 5: Migration schématique (A & B) et réelle (C) des lipides sur une plaque chromatographique Whatman LK6F Silica 60A. La plaque est divisée en deux parties: la première section de chargement en est une de concentration. La deuxième permet la séparation des échantillons. Un premier système d'éluion (A) composé d'heptane/éther éthylique/méthanol/acide acétique 80:30:3:1.5 est utilisé. Ce système permet une séparation des esters de cholestérol (EC) et du cholestérol libre (CL). Les phospholipides ne quittent pas l'origine. Le deuxième système d'éluion (B) qui migre jusqu'à 14cm du bas de la plaque permet la résolution de la phosphatidylcholine (PC) et de la sphingomyéline (SM). (C) Position des standards après les deux migrations tel que révélée par coloration dans un bain saturé de vapeurs d'iode.

A la fin de la migration, la plaque est séchée 10 min à température ambiante et la position des lipides est révélée par incubation dans un bain saturé de vapeurs d'iode. La silice aux positions correspondantes à chaque lipides est grattée et déposée dans une cuvette à scintillation. Après ajout du scintillant, les cuvettes sont vortexées et laissées à température ambiante au moins 8h avant comptage de la scintillation dans un compteur β .

6. Immunodétection. Les fractions provenant de gradients d'Optiprep sont précipitées dans du TCA et du déoxycholate de sodium. Brièvement, le volume de chaque fraction est ajusté à 1ml avec de l'eau. Cent microlitres de déoxycholate de sodium 0.15% sont ajoutés et la solution est maintenue à température ambiante pour 10 minutes. Cent microlitres de TCA 72% sont ensuite ajoutés et la solution est incubée à 4°C pour 20 minutes. Après 15 minutes de centrifugation à 14 000rpm, le surnageant est retiré. Le culot est lavé trois fois avec de l'acétone, en **centrifugeant brièvement entre les lavages** (paramètre critique). Les culots sont finalement resuspendus dans 90 μ l de tampon Laemmli 5X contenant 1.2% de β -mercaptoéthanol. Aux fractions tournant au jaune à cette étape sont rajoutés quelques microlitres de NaOH afin de rétablir le pH.

Des fractions provenant d'un gradient de Percoll ou de sucrose, on prend un aliquot de 100µl auquel on ajoute 25µl de tampon Laemmli 5X contenant 1.2% de β-mercaptoéthanol.

Les échantillons sont vortexés puis chauffés à 95°C pendant 3 minutes. Après quoi ils sont centrifugés pendant 1 minute à 16 000g dans une microcentrifugeuse pour retirer les bulles et 45µl sont chargés sur un gel à gradient linéaire de polyacrylamide de 4-12.5% contenant du SDS. Après une migration de 25mA/gel, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF à raison de 1mA/cm² pendant 1-2h avec un système semi-sec («*semi-dry transfer*»). Après coloration au rouge Ponceau et décoloration, la membrane est bloquée dans du tampon TBS-T (20mM Tris, 137mM NaCl, pH=7.5, 0.5% Tween 20) contenant 5% de lait en poudre toute la nuit avec agitation. La solution de blocage est décantée et la membrane est transférée dans une solution de TBS-T + 1% lait en poudre contenant l'anticorps primaire (dilution 1 : 1000 pour les monoclonaux, 1 : 5000 pour le polyclonal) pendant 1h15 à température ambiante. Après trois lavages de 10 minutes avec TBS-T + 1% lait, la membrane est incubée pendant 1h à température ambiante dans du TBS-T+1% lait contenant un anticorps anti-souris ou anti-lapin (1 :12500) couplé à la peroxidase de raifort. Après trois lavages, la révélation est réalisée en utilisant le révélateur ECL de Pierce.

7. Activités enzymatiques. L'activité lactate déshydrogénase est mesurée à toutes les minutes pendant 4 minutes sur un aliquot de 100µl de fractions fraîches. L'activité calculée est celle correspondante à la variation d'absorbance à 340nm/minute. L'activité galactosyltransférase est déterminée selon la méthode de Graham (119) avec quelques modifications. Brièvement, un aliquot de 20µl est transféré dans un tube contenant 60µl d'une solution contenant Hepes 13.3mM, β-mercaptoéthanol 5mM, MnCl₂ 50mM, N-acétylglucosamine 66.7mM et 0.02µCi/µl uridine diphospho-[6-³H]-galactose et le tout est incubé à 37°C pendant 30 minutes. Après quoi, la réaction est arrêtée par l'ajout de 20µl d'EDTA 0.3M et le mélange est conservé sur glace jusqu'à ce qu'il soit passé sur une colonne de Dowex-2 (2X8-400) avec élution par 2X500µl d'eau. Dix millilitres de liquide

à scintillation sont ajoutés et la radioactivité est déterminée au compteur β . Un blanc contenant 20 μ l d'eau + le mélange réactionnel est passé sur une colonne et la radioactivité déterminée au compteur est soustraite de la valeur de chaque échantillon.

QUATRIÈME PARTIE: RÉSULTATS

1. La technique au Triton X-100 (Sargiacomo/Lisanti)

Cette première technique d'isolement des caveolae est basée sur leur insolubilité au Triton X-100 et leur flottation dans un gradient de sucrose. Cette technique a permis une première caractérisation du microdomaine. Plusieurs auteurs ont pu isoler les caveolae de différents types cellulaires. C'est dans le but de déterminer quelle était la composition des caveolae dans les fibroblastes cutanés humains en culture que cette technique a été mise au point.

Des fibroblastes cutanés humains obtenus de biopsie de volontaires ont été utilisés. À mi-confluence de quatre pétris de 150mm, on change le milieu de culture (DMEM + 10% NCS) pour du milieu frais contenant du ^3H -cholestérol afin de marquer le cholestérol et les esters de cholestérol intracellulaires. Pour marquer la phosphatidylcholine et la sphingomyéline, le milieu contient aussi de la ^3H -choline. À confluence, le milieu est changé et à l'isolement des caveolae selon le protocole décrit dans la partie «méthodes» (section 3) est effectué. Une fois les cellules récoltées au grattoir, elles sont regroupées, puis reséparées en deux parties égales. Une étape critique de cette technique est l'homogénéisation des cellules et c'est pourquoi deux conditions (10 coups de piston et 20 coups de piston) ont été utilisées.

Il a été observé pendant l'homogénéisation que dix coups de piston ne réussissaient à homogénéiser qu'environ 60% des cellules (observation au microscope photonique) tandis que vingt coups de piston brisaient environ 80% des cellules (données non présentées). Après l'isolement, des immunodétections sont réalisées sur un aliquot de chaque fraction du gradient. De même, les lipides sont extraits, séparés par CCM et leur emplacement est révélé par coloration à l'iode. La silice aux positions correspondantes aux lipides d'intérêt est grattée et la radioactivité qu'elle contient est mesurée par scintillation dans un compteur β .

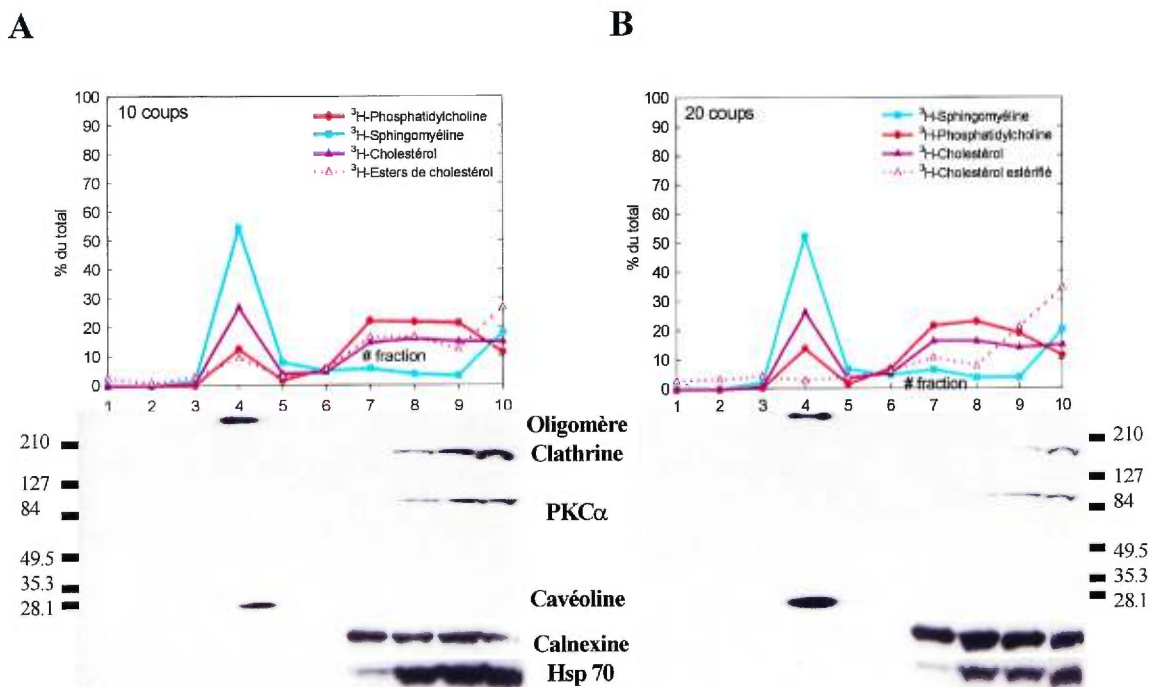


Figure 6: Isolement des caveolae par la technique au Triton X-100 : effet de l'homogénéisation. Les fibroblastes cutanés humains marqués à mi-confluence avec du ^3H -cholestérol et de la ^3H -choline de quatre pétris confluents (150mm) sont récoltés dans un tampon MBS contenant 1% de Triton X-100 et homogénéisés avec **A)** dix coups de pistons ou **B)** vingt coups de piston de l'homogénéisateur. Après centrifugation sous un gradient discontinu de sucrose, dix fractions sont récoltées. Un aliquot de chaque fraction est chauffé à 95°C pendant trois minutes puis séparé sur un gel SDS-PAGE 4-12.5%. Les protéines sont transférées ensuite sur une membrane de PVDF soumise à des immunodétections avec des anticorps anti-cavéoline-1 (Cavéoline & Oligomère), anti-clathrine (Clathrine) ou anti- $\text{PKC}\alpha$ ($\text{PKC}\alpha$). Un nouveau gel est préparé et deux immunodétections sont réalisées avec des anticorps anti-calnexine (Calnexine) ou anti-Hsp70 (Hsp 70). Les lipides sont extraits sur un aliquot de chaque fraction, séparés par chromatographie en couche mince (CCM) et comptés au compteur- β . Les résultats présentés dans chaque cas sont les résultats d'une seule expérience.

Les résultats démontrent que toute la cavéoline migre à l'interface 5-30% de sucrose (**Figure 6**, fraction 4). De même, on retrouve à cet interface $\sim 53\%$ de la sphingomyéline et 26% du cholestérol totaux ($n=2$). Étonnamment, $\sim 13\%$ de la phosphatidylcholine ($n=2$) cellulaire se retrouvent dans cette fraction dépourvue des autres marqueurs cellulaires. En effet, la clathrine est retrouvée seulement dans les fractions de départ (fractions 8-10), ce qui permet d'exclure toute contamination membranaire dans la fraction habituellement

considérée comme «cavéolaire» (fraction 4). Aussi, une chaperonne résidente du réticulum endoplasmique, la calnexine, est absente de cette fraction. Enfin, la PKC α cytosolique et la chaperonne cytosolique Hsp 70 demeurent dans les fractions de départ.

Dans cette technique, l'homogénéisation n'a pas d'influence sur la distribution de la plupart des protéines (comparer **figure 6A et 6B**) ni sur celle de la plupart des lipides. En contre partie, elle influence la distribution des esters de cholestérol (comparer **figure 6A et 6B**). En effet, la fraction «cavéolaire» devient contaminée avec un peu (~10%) d'esters de cholestérol (une molécule connue pour se retrouver dans le réticulum endoplasmique) lorsque l'homogénéisation est insuffisante.

Il a été démontré par Sargiacomo que la cavéoline était résistante au détergent SDS (54). Scherer a proposé que l'oligomère de cavéoline soit une association cavéoline-1/cavéoline-1 et n'impliquerait pas d'association cavéoline-1/cavéoline-2 (réf. 51, figure 3A). Il est trouvé ici qu'une partie de la cavéoline demeure oligomérisée en présence de SDS et ce même après que les échantillons aient été chauffés à 95°C pendant trois minutes avant la migration sur gel (**figure 6, Oligomère**). Dans ce cas-ci, la composition exacte de l'oligomère apparaissant à un poids moléculaire plus grand que 210kDa n'a pas été déterminée. Des travaux supplémentaires seraient requis afin d'en déterminer la composition exacte.

2. La technique au carbonate de sodium (Song)

Un détergent est une molécule capable de solubiliser les graisses. Dans le but de faire une étude sur le transport du cholestérol, il faut donc chercher à éviter l'utilisation de détergents. Une autre technique, développée par Song (74), suit un protocole similaire sauf que les cellules sont récoltées dans un tampon basique de carbonate de sodium.

Dans le but de déterminer s'il est possible d'isoler les caveolae de fibroblastes cutanés en culture avec ce protocole et de voir si le détergent influence la définition biochimique des caveolae, la technique au carbonate de sodium a été testée. Les étapes critiques de cette technique résident entre autres dans l'homogénéisation et la sonification.

Deux types d'homogénéisation ont été testées: le broyage des cellules au Polytron et l'homogénéisation manuelle au Potter. Pour chaque condition d'homogénéisation, quatre conditions de sonification sont testées. Cette façon de faire permet à la fois de comparer les deux types d'homogénéisation et de déterminer l'effet de la sonification pour une condition d'homogénéisation donnée.

Les fibroblastes cutanés humains de quatre pétris (150mm) confluent (radio-marqués à mi-confluence comme précédemment) sont récoltés dans le tampon carbonate de sodium pH~11.3. Pour éviter toute variation possible entre les pétris, les cellules sont regroupées, le volume est ajusté à 8ml et les cellules sont séparées en quatre volumes égaux de 2 ml. L'observation au microscope photonique avant l'homogénéisation a permis de constater que le tampon carbonate causait de lui-même la lyse de près de 90% des cellules sans toutefois endommager les noyaux.

a) Homogénéisation au broyeur Polytron:

Le broyage des cellules 3 X 10⁶ avec un Polytron fut d'abord utilisé pour suivre le protocole publié par Song. Cette façon de faire cause un déchiquetage dramatique des

cellules et détruit les noyaux dès le premier 10s de broyage (données non-présentées). Ensuite, différentes conditions sont utilisées afin d'étudier l'effet de la sonification dans des conditions de broyage mécanique. On sonifie ainsi en utilisant 0% (aucune sonification), 10%, 20% et 40% de la puissance de l'appareil de 400 Watts (0, 40 Js, 80 Js et 160 Js respectivement), trois fois 10 secondes. Après centrifugation et fractionnement du gradient, un aliquot de chaque fraction est utilisé la pour migration sur gel et on procède à l'immunodétection anti-cavéoline-1 et anti-clathrine, anti-calnexine et anti-Hsp70 comme contrôles. En effet, même si la plupart des auteurs utilisant cette technique omettent de faire tous ces contrôles, il est pourtant clair ici qu'ils sont indispensables (voir **figure 7**).

Ceci révèle que le broyage sans sonification (**figure 7A**) permet la séparation de trois domaines. Le premier (fraction 1) contient probablement des lipides libres flottant sur le gradient puisque environ 20% de la phosphatidylcholine s'y retrouve mais aucun des marqueurs protéiques ne s'y retrouvent. Aucune expérience n'a été effectuée afin de confirmer que ce premier domaine contient uniquement des lipides libres. Le deuxième contient ~57% du cholestérol et de la sphingomyéline totaux et ~25% de phosphatidylcholine. Il contient une bonne partie du marqueur cavéolaire «cavéoline-1» et est dépourvu de contaminants d'autres membranes comme la clathrine et la calnexine. Par contre, le marqueur cytosolique Hsp 70 est présent dans les fractions «cavéolaires» (fractions 3-4). Le troisième domaine correspondant aux fractions de départ (fractions 8-10) contient une portion de la cavéoline, la plus grande partie des autres marqueurs, et une proportion importante des lipides étudiés.

Une sonification à 10% de la puissance de l'appareil n'a que des effets mineurs sur la distribution des marqueurs dans le gradient. Le premier domaine contient encore une portion de lipides libres flottant sur le gradient. Le domaine représenté par les fractions 3 et 4 perd un peu de sphingomyéline et de cholestérol (~51% du total), tandis que la phosphatidylcholine reste à peu près constante (~23% du total). La distribution des marqueurs protéiques demeure inchangée.

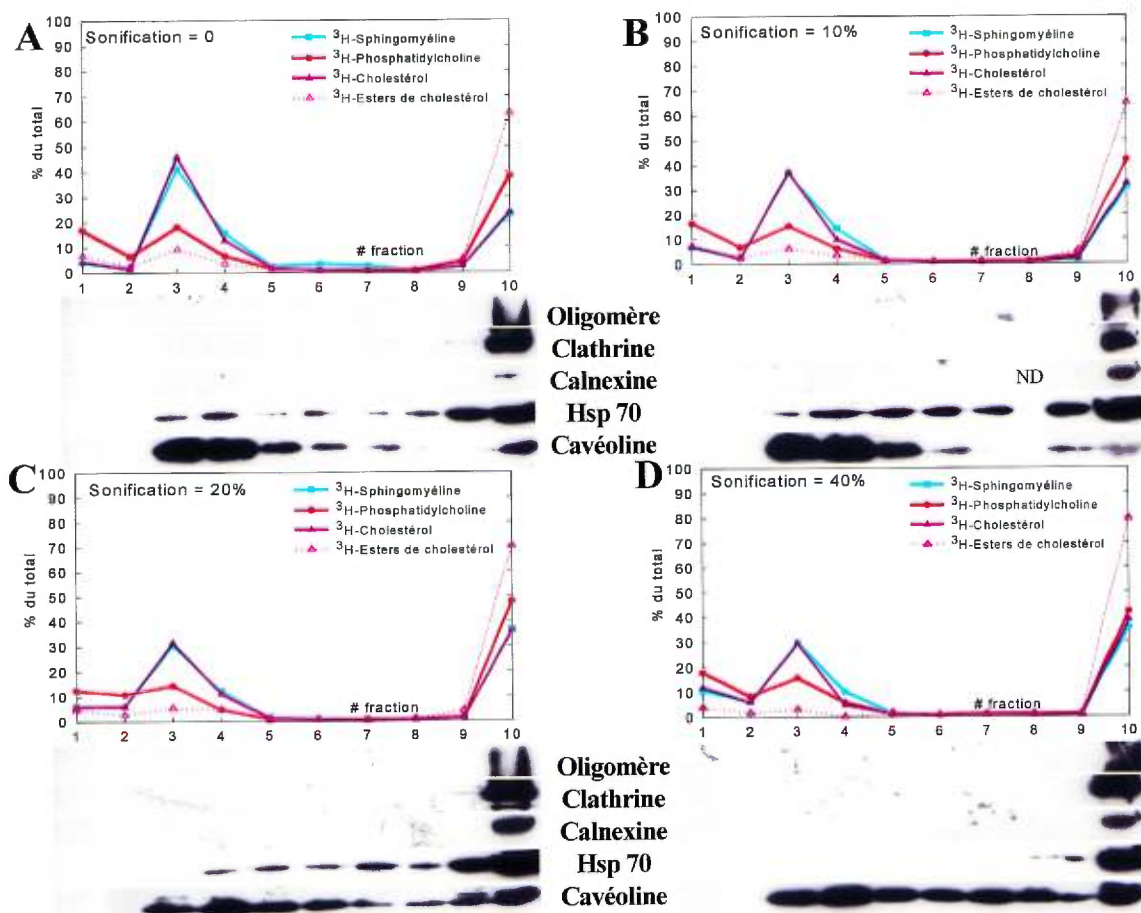


Figure 7: Isolement des caveolae par la technique au carbonate de sodium : effet de la sonification après un broyage mécanique au Polytron Les fibroblastes cutanés humains marqués à mi-confluence avec du ^3H -cholestérol et de la ^3H -choline de quatre pétris (150mm) confluents sont récoltés dans un tampon contenant 0.5M Na_2CO_3 et broyés avec 3 X 10s de Polytron. Les cellules sont ensuite sonifiées en utilisant 0% (A), 10% (B), 20% (C) et 40% (D) de la puissance de l'appareil. Après centrifugation sous un gradient discontinu de sucre, dix fractions sont récoltées. Un aliquot de chaque fraction est chauffé pendant trois minutes à 95°C puis déposé sur un gel SDS-PAGE 4-12.5%. Après transfert sur une membrane de PVDF, cette dernière est coupée et chaque partie est soumise à une immunodétection avec des anticorps correspondants anti-cavéoline-1 (Cavéoline & Oligomère), anti-clathrine (Clathrine), anti-calnexine (Calnexine) ou anti-Hsp70 (Hsp 70) (expositions en ECL de 3 à 30 minutes). Sur un aliquot de chaque fraction sont extraits les lipides, qui sont ensuite séparés sur CCM et comptés au compteur- β . L'immunodétection est manquante pour la fraction 8 du gel B (ND). Les résultats présentés proviennent d'une seule expérience et sont représentatifs des résultats obtenus de deux répétitions de cette expérience.

La sonification à 20% de la puissance de l'appareil n'a virtuellement pas d'influence sur la distribution des lipides et des marqueurs protéiques. La sonification maximale (40% de la puissance de l'appareil) (**figure 7D**), a pour effet de faire disparaître des fractions 3 et 4 le marqueur cytosolique Hsp 70 et de faire augmenter la proportion de lipides libres.

Toutes ces distributions sont fort différentes de celles obtenues en présence du Triton utilisé précédemment. Encore une fois, la présence de l'oligomère de cavéoline est détectée, mais cette fois uniquement dans le culot.

Il est impossible de conclure ici à l'isolement des caveolae avec ces paramètres puisque la meilleure condition (0% de sonification) présente une contamination par un marqueur cytosolique. L'inefficacité apparente de la sonification sur la purification des caveolae et la présence de lipides flottant sur le gradient porte à penser que le broyage au Polytron avait déjà brisé toutes les structures et permis le largage de lipides libres. Des conditions plus douces d'homogénéisation ont donc dû être testées.

b) Homogénéisation manuelle au Potter

Le broyage au Polytron est une technique appropriée dans le cas de tissus entiers. Dans le cas de nos cellules en culture, il n'est pas nécessaire d'être si brusque. Une deuxième technique d'homogénéisation au Potter a donc été testée dans le but de déterminer l'importance de l'homogénéisation dans le procédé.

Les fibroblastes cutanés humains de quatre pétris d'égale confluence à ceux utilisés précédemment et radio-marqués en croissance sont récoltés dans le tampon carbonate de sodium pH~11.3. Encore pour éviter toute variation possible entre les pétris, les cellules sont regroupées, le volume est ajusté à 8ml et les cellules sont séparées en quatre volumes égaux de 2 ml. Chacun de ces aliquots est transféré dans un Potter et les

cellules sont homogénéisées avec 20 coups de piston (condition douce à laquelle 100% des cellules sont brisées sans pour autant détruire tous les noyaux). Les échantillons sont

ensuite sonifiés en utilisant les mêmes conditions que précédemment (aucune sonification, 10%, 20% et 40% de la puissance de l'appareil) afin de permettre une comparaison des résultats. Après centrifugation et fractionnement du gradient, un aliquot de chaque fraction est chauffé et séparé par migration sur gel, et les immunodétections sont réalisées.

Les résultats montrés à la **figure 8** permettent de constater que la distribution des lipides et des marqueurs protéiques varie en fonction de la sonification. Sans sonification (**figure 8A**), tous les marqueurs sont situés dans la fraction «cavéolaire» (fraction 4), à l'exception de la Hsp 70 et de la clathrine cytosoliques qui n'y sont pas majoritaires. Une sonification à 10% de la puissance de l'appareil permet de séparer trois domaines. Le premier contient des lipides libres. Le deuxième, à l'interface 5-35% (**Figure 8 B**, fractions 3 et 4), contient ~46% de toute la sphingomyéline et du cholestérol, ~18% de phosphatidylcholine cellulaire et la cavéoline-1 s'y retrouve exclusivement. Ce deuxième domaine possède toutes les caractéristiques requises pour être considéré comme «cavéolaire». Le troisième domaine semble contenir le reste de la cellule dont les différents compartiments se retrouvent dans les fractions 7-10. Une sonification un peu plus forte à 20% (**figure 8C**) cause un étalement de la cavéoline dans les fractions plus lourdes, et diminue légèrement la quantité de sphingomyéline et du cholestérol (~ 39%) dans les fractions «cavéolaires» (fractions 3 et 4) sans pour autant affecter la quantité de phosphatidylcholine (~16%). La quantité de lipides libres est cependant augmentée. Une sonification à 40% (au maximum) de puissance de l'appareil (**figure 8D**) abolit la concentration de la cavéoline dans les fractions «cavéolaires». De plus, on voit réapparaître le marqueur cytosolique Hsp 70 dans ces fractions et la proportion de sphingomyéline et de cholestérol diminuent également à ~27%.

Par ailleurs, on constate encore une fois qu'en absence de détergent, les courbes de cholestérol et de sphingomyéline se superposent presque parfaitement. L'absence de détection de l'oligomère de cavéoline est inexplicable. Il est possible qu'une exposition prolongée soit nécessaire pour le révéler.

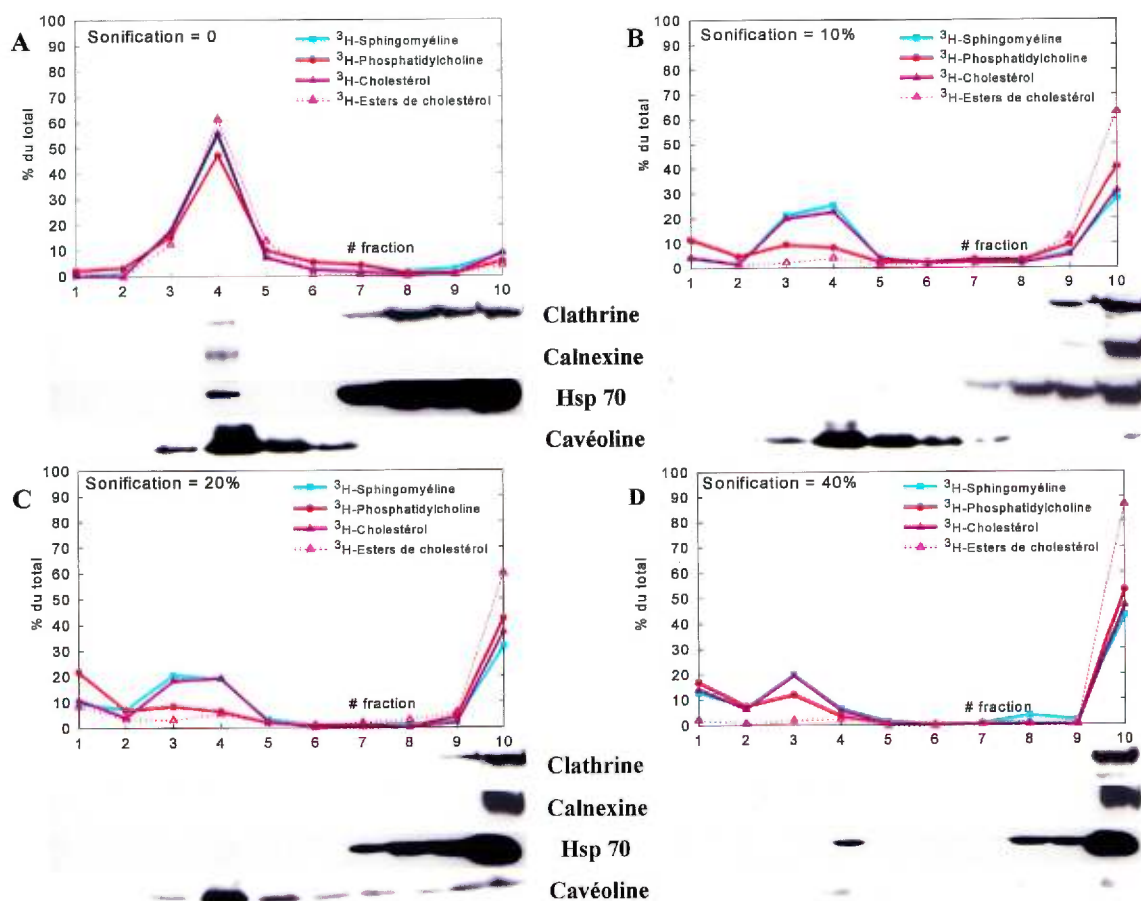


Figure 8 : Isolement des caveolae par la technique au carbonate de sodium : effet de la sonification après une homogénéisation manuelle. Les fibroblastes cutanés humains marqués à mi-confluence avec du cholestérol et de la choline tritiés de quatre pétris confluent sont récoltés dans un tampon contenant 0.5M Na_2CO_3 et homogénéisés avec vingt coups de piston de l'homogénéisateur. Les cellules sont ensuite sonifiées en utilisant 0% (A), 10% (B), 20% (C) et 40% (D) de la puissance de l'appareil. Après une centrifugation sous un gradient discontinu de sucrose, dix fractions sont récoltées. Un aliquot de chaque fraction est chauffé pendant trois minutes à 95°C, puis migré sur un gel SDS-PAGE 4-12.5%. Après transfert sur une membrane de PVDF, les immunodétections sont réalisées avec des anticorps anti-cavéoline-1 (Cavéoline), anti-clathrine (Clathrine), anti-calnexine (Calnexine) ou anti-Hsp70 (Hsp 70) (expositions de 3 à 10 minutes). Sur un aliquot de chaque fraction sont extraits les lipides, qui sont ensuite séparés sur CCM et comptés au compteur- β . Aucune cavéoline oligomérisée n'était visible. Les résultats présentés proviennent d'une seule expérience et sont représentatifs des résultats obtenus de trois répétitions de cette expérience.

Avec ces paramètres et par cette technique, il est possible d'obtenir une fraction relativement enrichie en marqueurs cavéolaires. Cependant, cette technique ne permet pas de distinguer les uns des autres les différents compartiments cellulaires.

3. La technique sur gradient d'Optiprep (Smart)

Une autre technique sans détergent est disponible pour l'isolement des caveolae. Cette technique sépare plusieurs compartiments cellulaires importants lorsque le travail est réalisé dans une optique d'étude du transport du cholestérol. En effet, le cholestérol est synthétisé dans le réticulum endoplasmique, est transporté dans le cytosol via un processus méconnu (cependant, voir (28)), est acheminé aux caveolae et est ensuite redistribué à la membrane (4). Or la technique sur gradient d'Optiprep offre la possibilité d'examiner tous ces compartiments simultanément. Dans le but de tirer profit de ces avantages, cette technique a été testée.

Cinq pétris (150mm) à 80-100% confluence de fibroblastes cutanés humains ou de cellules endothéliales de type HUVEC sont utilisés pour chaque condition. Dans certains cas, les fibroblastes sont marqués à mi-confluence avec du ^3H -cholestérol et de la ^3H -choline. Le milieu est retiré et les cellules sont rincées deux fois avec le tampon A 1X. Elles sont ensuite recueillies avec un grattoir à cellules et homogénéisées au Potter. Après enlèvement des noyaux et des cellules non-brisées, le surnageant post-nucléaire est déposé sur un gradient autoformant de Percoll 30%. Smart et collaborateurs (80) décrivent que les deux premiers millilitres contiennent le cytosol, la bande blanche visible à 5.7cm du fond du tube contient la membrane plasmique alors que les fractions inférieures contiennent toutes les membranes internes mélangées (réticulum endoplasmique, Golgi, lysosomes et mitochondrie). La bande blanche est récoltée et sonifiée avant d'être déposée sous un gradient linéaire d'Optiprep. Les cinq premiers millilitres de ce gradient contiennent les caveolae dépourvues de clathrine (voir réf. 72, Fig 1), tandis que les fractions inférieures contiennent le reste de la membrane plasmique. Les caveolae des cinq premiers millilitres sont subséquemment concentrées en une seule fraction par un deuxième gradient d'Optiprep. Cette dernière étape n'est pas critique (sauf

si l'Optiprep n'est pas préparé adéquatement); il n'en sera donc pas fait mention. Par contre, les autres étapes sont très importantes. L'isolement des caveolae varie selon l'osmolarité du gradient de Percoll, l'homogénéisation, le type cellulaire utilisé, la préparation du gradient d'Optiprep, et la sonification.

a) Osmolarité du gradient de Percoll

L'osmolarité est un facteur important dans une expérience dont le but est l'isolement d'organelles selon la densité puisque un tampon hypo-osmotique cause le gonflement des organelles par l'entrée d'eau dans l'organelle. L'organelle, en gonflant, diminue sa densité, car elle augmente son volume. En contre partie, une organelle dans un tampon hyper-osmotique perdra de l'eau et, diminuant ainsi son volume, augmentera sa densité.

Tel que mentionné dans la section méthodes, la préparation du gradient de Percoll est une étape critique. Elle peut se faire par dilution directe avec le tampon A **1X** (0.25M sucrose). Il en résulte que la concentration finale de sucrose est de 0.175M, ce qui en fait une solution hypo-osmotique. Par contre, si on dilue le Percoll à 30% v/v avec du tampon A **2X** (0.5M sucrose) et qu'on complète avec de l'eau, en faisant en sorte que la concentration finale de sucrose soit de 0.25M, alors la solution est iso-osmotique.

Pour vérifier l'influence de l'osmolarité, deux fois cinq pétris (150mm) de fibroblastes confluents sont préparés selon le protocole avec 2 X 20 coups d'homogénéisateur manuel tel que recommandé par Smart et collaborateurs (Smart 95). Les surnageants post-nucléaires sont ensuite déposés sur 23 ml de deux solutions de Percoll 30%, l'une préparée avec du tampon A **1X** ($[\text{sucrose}]_{\text{finale}} = 0.17\text{M}$), l'autre avec du tampon A **2X** ($[\text{sucrose}]_{\text{finale}} = 0.25\text{M}$) afin d'évaluer la capacité de chacune à séparer les compartiments cellulaires. Après une centrifugation de 30 minutes à 29 000rpm, 17 fractions sont récoltées dans un premier cas (**figure 9A**) et, dans un deuxième cas, les neufs premières fractions sont récoltées, tandis que le reste est concentré (**figure 9B**) tel que décrit dans la section méthodes. Un aliquot de chaque fraction est migré sur gel

réducteur à gradient 4-12.5% SDS-PAGGE et immunodéecté sur PVDF avec les anticorps appropriés. Les données de la **figure 9** proviennent de deux expériences différentes et sont représentatifs des résultats couramment obtenus dans chaque condition.

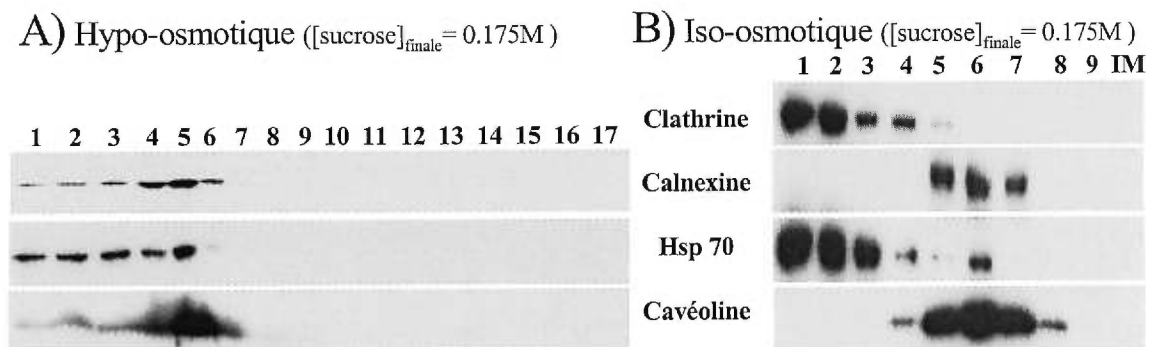


Figure 9: Effet d'une préparation hypo-osmotique et iso-osmotique du gradient de Percoll 30%. Résultats de deux expériences différentes. Dans chaque cas, cinq pétris confluents de fibroblastes cutanés humains sont rincés et les cellules récoltées dans le tampon A 1X. Elles sont ensuite homogénéisées avec 2 X 20 coups de piston (tel que recommandé par Smart et collaborateurs). Les surnageants post-nucléaires sont déposés sur 23ml de Percoll 30% v/v préparé par dilution directe avec le tampon A 1X (A), (rendant la solution hypo-osmotique), ou par dilution avec le tampon A 2X (B) et complétion du volume avec de l'eau (rendant la solution iso-osmotique). Après la centrifugation, (A) 17 fractions sont récoltées ou (B) 9 fractions et les autres concentrées (IM = *internal membranes*). Un aliquot de chaque fraction est séparé sur gel et les immunodétections sont réalisées sur une membrane de PVDF. La détection anti-clathrine n'a pas été réalisée dans le premier cas, celle de la Hsp 70 étant suffisante comme contrôle du cytosol. Les résultats sont représentatifs d'au moins cinq expériences (n=5).

Le **figure 9** montre que lorsque le Percoll n'est pas iso-osmotique, tout le matériel cellulaire est retrouvé dans les fractions supérieures, tandis qu'il y a une nette séparation du cytosol d'avec les membranes plasmiques et internes lorsque le Percoll iso-osmotique. En effet, lorsque le Percoll est hypo-osmotique, le marqueur cytosolique Hsp 70, la clathrine, la cavéoline-1 et la calnexine co-migrent dans les premières fractions (**figure 9A**). À noter que la « bande blanche visible à 5.7 cm du bas du tube » est bel et bien en place, telle que décrite par Smart et collaborateurs (80). Le gradient iso-osmotique par contre, permet une séparation du cytosol des compartiments à membranes (**figure 9B**) puisque la clathrine cytosolique et la majorité de la Hsp 70 migrent dans les premières fractions. Cependant, le marqueur de la membrane plasmique (dans ce cas-ci), la

cavéoline-1 et la chaperonne du réticulum endoplasmique calnexine se sont pas séparées l'une de l'autre. La « bande blanche visible à 5.7 cm du bas du tube » est bel et bien présente et contient, mélangés, la membrane plasmique et les membranes internes. Dans l'espoir de séparer ces deux compartiments, une expérience dans laquelle on modifie le protocole original en utilisant une solution de Percoll 30% hyper-osmotique ($[\text{sucrose}]_{\text{finale}} = 0.35\text{M}$) a été réalisée. Toutefois, cette solution n'a pas permis une meilleure séparation (données non-présentées) entre la membrane plasmique et les membranes internes que celle déjà obtenue dans les condition iso-osmotiques.

Tel que précédemment mentionné, dans un gradient de Percoll 30% v/v iso-osmotique, les fractions supérieures contiennent le cytosol, la bande blanche contient tous les marqueurs de membranes plasmiques tandis que les fractions inférieures contiennent les membranes internes (voir 80). La séparation cytosol/membranes est efficace dans des conditions iso-osmotiques. Ceci fut confirmé par la détermination de l'activité lactate déshydrogénase trouvée seulement dans les trois premières fractions (données non-présentées). Cependant, la séparation membranes/membranes internes ne fonctionne pas du tout. Ceci fut aussi confirmé par la détermination de l'activité phosphatase acide (enzyme lysosomiale) qui est retrouvée uniquement dans les fractions 5, 6 et 7 (données non-présentées).

Afin de s'assurer qu'une mauvaise façon de faire n'était pas la cause de l'absence de séparation entre les membranes internes et la membrane plasmique, une visite au laboratoire du Dr Eric J Smart à University of Kentucky, Lexington, Kentucky a été effectuée. Une expérience visant à déterminer si la préparation du gradient de Percoll était en cause dans la mauvaise séparation a été réalisée. Des billes de densité (Pharmacia) ont été déposées* sur 23ml de Percoll 30% v/v et le tout centrifugé pendant 30 minutes à 29 000rpm dans un rotor Beckman 70Ti. La position des billes de densité a ensuite été déter-

*Les règles de présentation d'un mémoire sont très strictes quant au travail réalisé par l'auteur et ceux empruntés à une tierce personne. À noter que ce travail exécuté au Kentucky a bel et bien été réalisé par l'auteur de ce mémoire, mais dans le laboratoire du Dr Smart et ensuite, à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal.

minée par rapport au fond du tube. Au retour au laboratoire, les billes de mêmes densités (gracieuseté du Dr Smart) sont traitées de la même façon et centrifugées pendant 30 minutes à 29 000rpm dans notre rotor Beckman 60Ti (rotor similaire au 70Ti)

La comparaison a permis de détecter seulement une différence non significative entre les deux gradients (**figure 10**). À noter que les billes ont été choisies en fonction de densités comparables à celle des organelles (membranes plasmiques $\sim 1.04\text{g/ml}$, réticulum endoplasmique $\sim 1.055\text{g/ml}$).

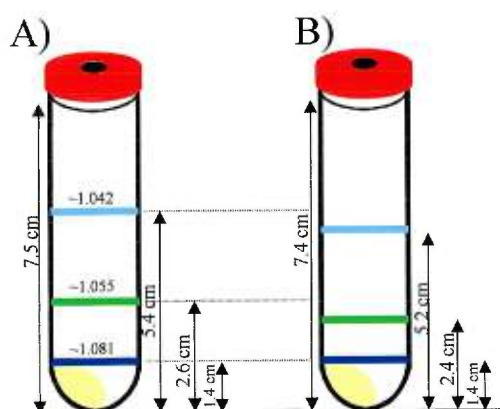


Figure 10: Distribution de billes de densité dans un gradient de Percoll 30%. Des billes de densités différentes ($\sim 1.042\text{g/ml}$, $\sim 1.055\text{g/ml}$ & $\sim 1.081\text{g/ml}$) ont été déposées sur un gradient de Percoll 30% et centrifugées à 29 000rpm pendant 30 minutes avec **A)** les solutions et le rotor Beckman 70Ti du Dr Smart et **B)** nos solutions et notre rotor Beckman 60Ti. Après la centrifugation, la distance de migration est déterminée par rapport au fond du tube. La hauteur du dessous du ménisque est indiquée ainsi que les distances de chaque type de billes par rapport au fond du tube. Le culot (jaune) est le culot de Percoll que l'on distingue routinièrement après la centrifugation. L'incertitude sur chaque mesure est de $\pm 0.05\text{cm}$. Ces résultats proviennent d'une seule expérience ($n=1$).

Cette façon de faire permet normalement d'obtenir $\sim 100\%$ de l'activité lactate déshydrogénase (cytosol) dans les fractions 1-2, $\sim 90\%$ de l'activité phosphatase alcaline (membrane plasmique) dans la fraction 4 à 6, et 100% des activités galactosyltransférase (Golgi) et NADPH cytochrome-c réductase (réticulum endoplasmique) dans les fractions 8 à 25 (Eric J. Smart, communication personnelle). Il est pourtant clair qu'avec notre type

cellulaire, dans un gradient quasiment identique, on n'obtient pas de séparation entre les membranes plasmiques et les membranes internes.

b) Homogénéisation

Dans le but d'obtenir une meilleure séparation entre la membrane plasmique et les membranes internes, une autre étape critique a été étudiée. Il a été noté au microscope que les fibroblastes cutanés humains récoltés dans le tampon A 1X subissaient une certaine lyse. En comparaison, cette lyse n'est pas observée lorsque les cellules sont récoltées dans du tampon PBS ordinaire (données non présentées). Or si le tampon peut causer la lyse, alors l'homogénéisation devient peut-être trop forte ou même superflue.

Dans le but de déterminer l'importance de l'homogénéisation sur la capacité du gradient de Percoll à séparer les membranes les unes des autres, l'expérience suivante a été réalisée. Vingt pétris (150mm) de fibroblastes cutanés humains, marqués à mi-confluence avec du ^3H -cholestérol et de la ^3H -choline, sont rincés à confluence et les cellules sont récoltées dans le tampon A 1X. Elles sont ensuite regroupées, le volume est ajusté à 4ml avec du tampon A 1X et le tout est séparé en quatre parties égales. Chaque millilitre est homogénéisé dans un Potter avec 0, 5, 20 et 40 coups de piston respectivement. La suspension est transférée dans un tube pour microcentrifugeuse et un premier surnageant post-nucléaire est recueilli et conservé sur glace. Le culot de chaque tube est resuspendu dans 1ml de tampon A et réhomogénéisé avec le même nombre de coups de piston que précédemment. De cet homogénat est recueilli un deuxième surnageant post-nucléaire qui est regroupé au premier conservé sur glace. À la fin de ce procédé, quatre surnageants post-nucléaires résultants de deux fois 0, 5, 20 ou 40 coups de piston sont obtenus. Chacun des surnageants est déposé sur 23ml de Percoll 30% préparé iso-osmotiquement. Après une centrifugation de 30 minutes à 29 000rpm, le premier millilitre est recueilli et considéré comme la fraction cytosolique (Cyto), tandis que la fraction de membrane plasmique (PM) et de membranes internes (IM) sont récoltées selon les indications données dans la section méthodes . De la fraction PM et IM, le Percoll est retiré et sur toutes les fractions sont extraits les lipides qui, après

séparation sur CCM, sont comptés et présentés sous la forme d'un pourcentage de radioactivité par microgramme de protéines.

La **figure 11** montre que c'est lorsqu'il n'y a aucune homogénéisation qu'est obtenue la meilleure séparation (quoique très imparfaite) entre la membrane plasmique et les membranes internes. En effet, quand 5, 20 ou 40 coups de piston sont utilisés pour homogénéiser, la calnexine co-migre toujours avec la cavéoline dans la fraction théoriquement membranaire (PM). Lorsque aucune homogénéisation n'est utilisée, la calnexine apparaît dans la fraction de membranes internes (IM). La clathrine est toujours retrouvée uniquement dans la fraction cytosolique (Cyto), indépendamment de la condition d'homogénéisation. La distribution des lipides est aussi influencée par l'homogénéisation. Sans homogénéisation, les lipides se retrouvent à ~50% dans la fraction PM et ~50% dans la fraction IM. Ces proportions changent avec 5 coups de piston avec 75% des lipides dans la fraction PM et 25% dans la fraction IM. Finalement, l'homogénéisation avec 20 ou 40 coups de piston donne une distribution de lipides de ~65% dans la fraction PM contre 35% dans la fraction IM. La quantité de protéines de chaque fraction a servi de dénominateur comm un pour permettre la comparaison entre les différentes fractions et les différentes conditions. Toutefois, dans une expérience similaire où **des volumes équivalents** furent séparés sur gel, l'immunodétection a permis de démontrer que la meilleure séparation PM/IM était aussi obtenue sans homogénéisation (données non présentées).

L'homogénéisation est donc d'une importance capitale dans l'obtention des membranes dans les fibroblastes cutanés humains. Ce problème de contamination des membranes plasmiques au moins avec du réticulum endoplasmique dans les conditions normales d'homogénéisation (2X 20 coups de piston) a été confirmé: les mêmes fibroblastes cutanés humains ont été envoyés au laboratoire du Dr Smart où il a été déterminé que la calnexine co-migrerait dans la fraction PM (A.Uittenbogaard, laboratoire du Dr Smart, communication personnelle).

La lyse par le tampon A et l'absence d'homogénéisation requise pour une meilleure séparation indique qu'un traitement plus doux est requis pour ce type cellulaire.

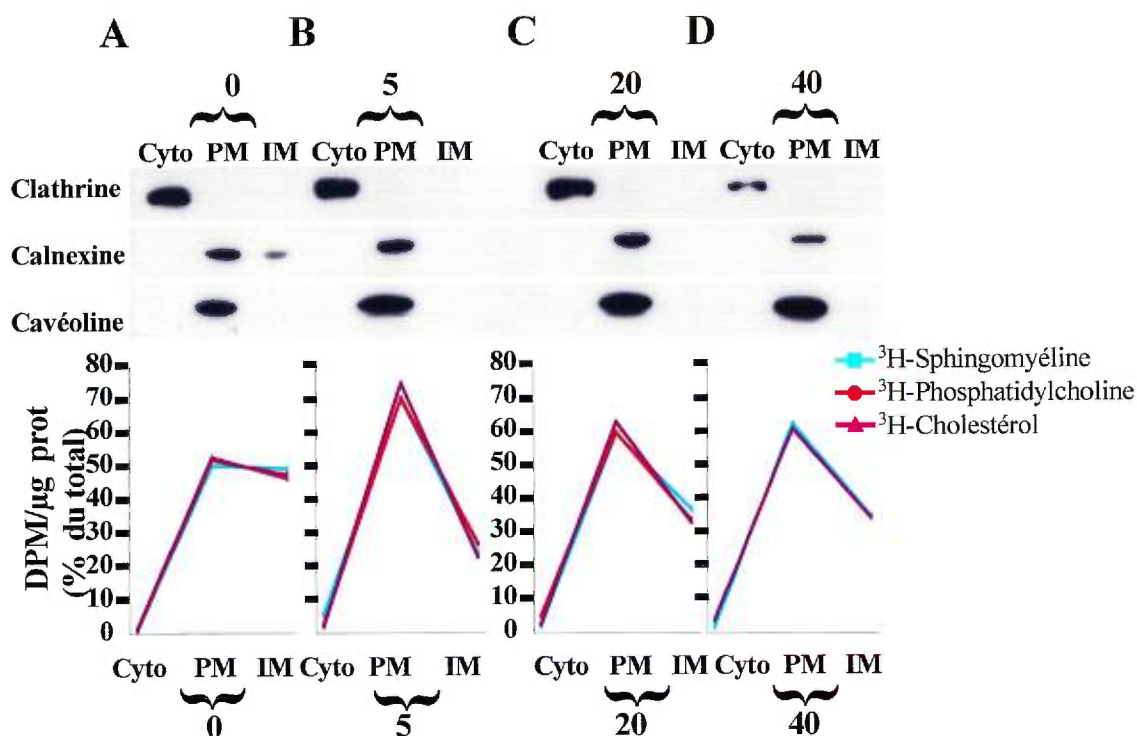


Figure 11: Effet de l'homogénéisation sur la séparation des compartiments cellulaires dans un gradient de Percoll. Les surnageants post-nucléaires (PNS) sont obtenus de vingt pétris (150mm) de fibroblastes cutanés humains en utilisant deux fois 0 (A), 5 (B), 20 (C) et 40 (D) coups de piston d'un homogénéisateur manuel. Les PNS sont déposés sur 23ml de Percoll 30% v/v iso-osmotique et centrifugés pendant 30 minutes à 29 000rpm dans un rotor Beckman 60Ti. Une fraction cytosolique (Cyto), membranaire (PM) et de membranes internes (IM) est récoltée de chaque gradient selon ce qui est décrit dans la section méthodes. Les lipides sont extraits sur un aliquot de chaque fraction, séparés sur CCM, comptés et présentés sous forme normalisée par rapport à la quantité de protéines dans chaque fraction. Un aliquot de chaque fraction contenant 6μg de protéines est chauffé dans des conditions réductrices et migré sur un gel dénaturant à gradient de 4 à 12.5% de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur PVDF et on procède à une immunodétection anti-cavéoline (**cavéoline**), anti-calnexine (**calnexine**) et anti-clathrine (**clathrine**) sur trois parties de la membrane. Aucune détection de l'oligomère de cavéoline ni aucune détection de la Hsp 70 n'a été réalisée. Ces résultats proviennent d'une seule expérience (n=1), mais l'immunodétection est représentative de deux expérience (n=2).

c) Type cellulaire

Au laboratoire du Dr Smart, le protocole habituel fonctionnant bien comporte une homogénéisation de 2 X 20 coups de piston. Pour expliquer le fait que ces conditions sont incompatibles avec nos cellules, il a fallu soulever l'hypothèse que le protocole n'était pas nécessairement applicable à nos fibroblastes. Pour vérifier cette hypothèse, le protocole a été testé sur un autre type cellulaire: les cellules endothéliales HUVEC.

Cinq pétris (150mm) de cellules HUVEC à 90% confluence ont été rincés avec le tampon A 1X et les cellules récoltées dans le tampon A 1X. Pendant l'homogénéisation, les cellules ont été observées au microscope. Contrairement aux fibroblastes utilisés précédemment, **le tampon A 1X ne cause pas la lyse des cellules HUVEC** avant toute homogénéisation. En plus, même après 20 coups de piston, certaines cellules sont encore intactes. Le PNS résultant de 2X 20 coups de piston (protocole régulier) est ensuite déposé sur 23ml de Percoll 30% préparé de façon iso-osmotique. Après une centrifugation de 30 minutes à 29 000rpm, le premier millilitre est récolté comme la fraction cytosolique (Cyto). Le matériel au-dessus de la bande blanche est rejeté. La bande blanche observée à 5.7cm du fond du tube est très rapprochée d'une autre bande blanche à 5.4cm du fond du tube. Les deux bandes blanches sont traitées séparément comme les fractions membranaires No 1 (PM1) et No 2 (PM2). Les fractions inférieures sont centrifugées tel que décrit dans la section méthodes et considérées comme membranes internes (IM). Le Percoll est retiré de chaque fraction pour permettre le dosage des protéines. Les protéines (6µg/puits) sont chargées et séparées sur gel puis révélées par immunodétection sur membrane de PVDF. Sur un aliquot de chaque fraction est déterminée l'activité enzymatique de la galactosyltransférase (marqueur du Golgi), normalisée ensuite par rapport à la quantité de protéines.

La **figure 12** montre que la séparation cytosol/membrane plasmique/membranes internes de cellules HUVEC est possible sur un gradient de Percoll 30%, avec 2 X 20 coups de piston. La fraction cytosolique contient toute la clathrine et près de 0% d'activité galactosyltransférase. La fraction PM1 (bande blanche à 5.7cm du fond du tube) contient presque toute la cavéoline, mais est contaminée avec du Golgi (~20% de l'activité

galactosyltransférase) et du réticulum endoplasmique (calnexine). La contamination est peut-être due à la difficulté de récolter cette bande blanche à 0.3cm de distance de celle à 5.4cm du fond du tube (PM2) qui devrait être considérée avec les fractions IM. En effet, cette fraction et la fraction IM contiennent ensemble ~75% de l'activité galactosyltransférase, une bonne partie de la calnexine, et sont presque dépourvues de cavéoline.

Ces résultats indiquent que la séparation de la membrane plasmique des autres compartiments cellulaires est possible sur un gradient de Percoll 30%, mais que l'efficacité de cette séparation est variable en fonction du type cellulaire.

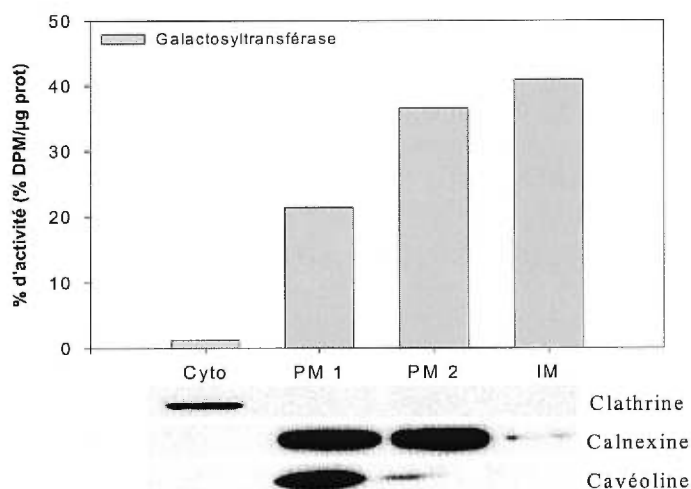


Figure 12: Séparation des compartiments cellulaires de cellules HUVEC sur un gradient de Percoll 30%, avec le protocole original. Cinq pétris (150mm) à 90% de confluence de cellules HUVEC sont récoltées dans le tampon A 1X et homogénéisées avec 2X 20 coups de piston. Le PNS est déposé sur 23ml de Percoll 30% et le tout est centrifugé à 29 000rpm pour 30 minutes dans un rotor Beckman 60Ti. Le premier millilitre est récolté et considéré comme contenant le cytosol (Cyto). Une première bande visible à 5.7cm du fond du tube (PM1) ainsi qu'une seconde à 5.4cm du fond du tube (PM2) sont récoltées et traitées séparément. Le reste du matériel est concentré par centrifugation et on recueille la fraction contenant les membranes internes (IM). Le Percoll est retiré de chaque fraction, les protéines sont dosées, l'activité galactosyltransférase est déterminée et normalisée par rapport à la quantité de protéines. Un aliquot de chaque fraction contenant 6µg de protéines est séparé sur gel réducteur de SDS-PAGGE 4-12.5% et une immunodétection est réalisée contre la clathrine, contre la calnexine et contre la cavéoline sur membrane de PVDF coupée en trois sections. Ces résultats proviennent d'une seule expérience (n=1)

d) Préparation du gradient d'Optiprep

Il a été mentionné dans la section méthodes que la préparation des solutions est un processus déterminant dans la réalisation de ce protocole. La préparation de la solution d'Optiprep 50% n'échappe pas à cette règle. L'Optiprep est en fait composé d'Iodixanol à 60%. Dire que l'on prépare de l'Optiprep 50% est un abus de langage dans lequel on veut dire que l'on prépare de l'Iodixanol 50%. Donc, de l'Optiprep 50% (Iodixanol 50%) se prépare en diluant avec un cinquième de volume du tampon de son choix. Pour l'isolement des caveolae, le tampon B contenant donc 6 fois plus d'EDTA et 6 fois plus de tricine que le tampon A est utilisé. Il en résulte que la solution finale contient autant d'EDTA et de tricine que les autres solutions (tampon A et Percoll 30%).

L'autre façon erronée de préparer «l'Optiprep 50%» serait de diluer la bouteille originale du fabricant avec un volume équivalent de tampon. Il en résulte que l'iodixanol est alors rendu à 30% v/v. L'Optiprep étant déjà iso-osmotique, une préparation erronée conduit plutôt à une solution de densité bien moindre que requise. Ainsi, un gradient d'Optiprep préparé de façon erronée donne un gradient de 6%-12%, 13.8% au lieu de 10%-20%, 23%. Ceci a pour effet d'étaler la cavéoline sur tout le gradient (données non-présentées).

e) Sonification

Comme pour la technique au carbonate de sodium, la sonification est une étape critique. La réussite de cette étape réside dans l'obtention de la cavéoline majoritairement dans les fractions de 10-20% Optiprep, tandis que la clathrine doit demeurer avec le matériel de départ (fractions à 23% d'Optiprep) (voir réf. 72, Fig. 1). Par ailleurs, les fractions qui seront utilisées comme cavéolaires (les 5 premiers millilitres) doivent contenir moins de 10% des protéines membranaires et plus de 90% de la cavéoline (Eric J Smart, communication personnelle).

Tout en sachant que la fraction membranaire obtenue du Percoll était contaminée avec du réticulum endoplasmique, l'effet de la sonification a été testée sur cette fraction. Il était possible en fait que la calnexine, après sonification, demeure, avec la clathrine membranaire, dans le matériel de départ.

Afin de déterminer si une condition de sonification permettrait de séparer les caveolae des membranes non-cavéolaires et même des membranes internes, l'expérience suivante a été tentée. De vingt pétris (150mm) de fibroblastes cutanés humains à confluence, homogénéisés avec 2 X 20 coups de piston, sont recueillies les bandes blanches visibles à 5.7cm de quatre gradients de Percoll. Ces membranes (contaminées) sont regroupées afin d'éviter toutes variations entre les préparations de membrane. Le volume est ajusté à 8ml et le tout est redivisé en quatre volumes égaux. Chacun des volumes est sonifié 3 X 10s en utilisant 0% (aucune sonification), 13%, 25% ou 40% de la puissance de l'appareil (0Js, 52Js, 100Js et 160Js respectivement). La concentration de l'homogénat en Optiprep est ensuite ajustée à 23% v/v (23% d'Iodixanol) avec une solution d'Optiprep 50% et du tampon A 1X. Un gradient linéaire de 20% à 10% d'Optiprep (20-10% d'Iodixanol) est formé au dessus (3ml de 20% + 3ml de 10%) et le tout est centrifugé à 17 500rpm pendant 90minutes dans un rotor Beckman SW41. Treize ou quatorze fractions de ~700µl sont récoltées à la pipette automatique en commençant par le haut. L'interface 20%-23% correspond habituellement à la fraction 9. Les protéines sont dosées sur un aliquot de 100µl de chaque fraction. Le reste du matériel est concentré par précipitation au TCA, resuspendu dans le tampon Laemmli 5X réducteur et séparé sur gel 4-12.5% SDS-PAGGE.

La révélation immunologique sur PVDF montrée à la **figure 13** présente l'effet de la sonification sur la distribution des marqueurs dans le gradient. Sans sonification, tout le matériel est retrouvé dans les fractions supérieures, à en juger par la distribution des

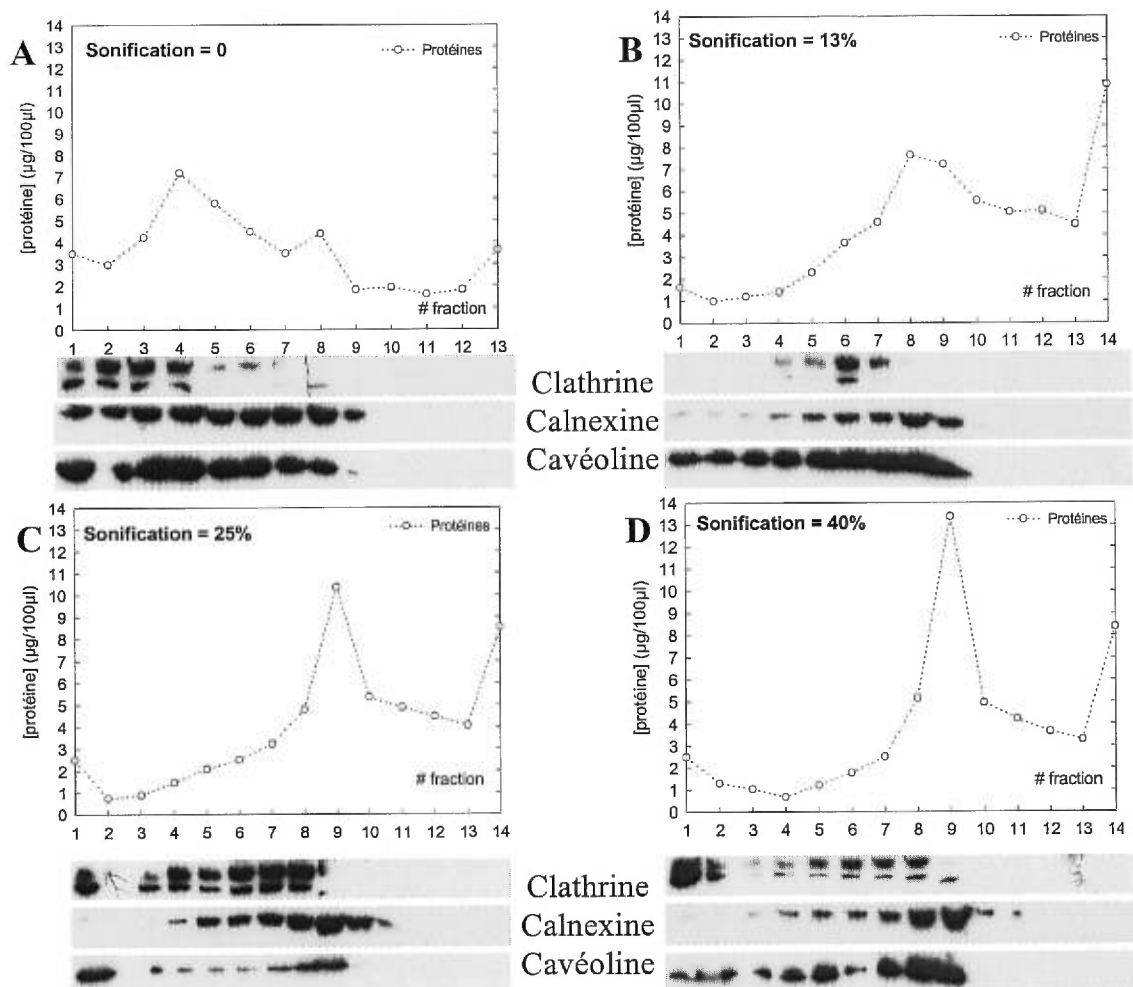


Figure 13 : Effet de la sonification sur la distribution des marqueurs et des protéines dans un gradient d'Optiprep. Les PNS résultant de l'homogénéisation 2X 20 coups de piston de fibroblastes confluents de vingt pétris (150mm) sont déposés sur un gradient de Percoll 30%. Les bandes blanches correspondantes aux fractions membranaires sont récoltées, regroupées, puis reséparées en quatre parties égales. Ces aliquots membranaires sont ensuite traités par aucune sonification (A), 13% (B), 25% (C) ou 40% (D) de la puissance du sonificateur. Après centrifugation sous un gradient de 10-20% d'Optiprep pendant 90minutes à 17 500rpm dans un rotor Beckman SW41, des fractions de ~700µl sont récoltées à la pipette automatique. Un aliquot de chaque fraction de 100µl est utilisé pour le dosage des protéines, tandis que le reste du matériel est concentré par précipitation au TCA. Les échantillons sont ensuite resuspendus dans le tampon réducteur de chargement "Laemmli 5X" et séparés sur gel 4-12.5% SDS-PAGGE. Après transfert sur PVDF, la membrane est coupée en trois parties et les révélations immunologiques permettent de détecter la clathrine, la calnexine et la cavéoline. Aucune détection n'a été réalisée afin de révéler l'oligomère de cavéoline. Les résultats sont les meilleurs qu'il fut possible d'obtenir dans deux expériences différentes (n=2).

protéines et des marqueurs comme la clathrine, la calnexine et la cavéoline (voir **figure 13 A**). Une sonification à 13% cause une redistribution des protéines totales dans les fractions inférieures (**figure 13B**). De même, la clathrine et la calnexine sont moins présentes dans les fractions supérieures.

Rien n'apparaît de la révélation immunologique des fractions 10-14. Cette absence est un artéfact causé par la précipitation au TCA. Lors de la resuspension des culots dans le tampon de chargement, si l'indicateur de pH tourne au jaune, c'est que la solution est trop acide; on rajoute alors quelques microlitres de NaOH afin de rétablir le pH. Cependant, ce NaOH interfère avec la migration en plus de dégrader les protéines. Or, les fractions 10-14 tournent souvent au jaune, à cause de la difficulté de retirer le TCA lors des lavages à l'acétone. Néanmoins, il est clair que la clathrine et la calnexine tendent à se retirer des fractions supérieures à 13% de sonification.

Les sonifications plus fortes à 25% et à 40% (maximum) (**figure 13C et D**) de la puissance de l'appareil font graduellement réapparaître la calnexine et la clathrine dans les fractions supérieures. La sonification adéquate se situe donc autour de 13% de la puissance de l'appareil. Il a été confirmé par Eric J. Smart (Eric J. Smart, communication personnelle), que des sonifications insuffisantes ou trop fortes ont pour effet de faire flotter le matériel dans les fractions supérieures.

Comme pour la technique au carbonate de sodium, des résultats préliminaires (données non présentées) ont révélé que les courbes de distribution du ^3H -cholestérol et de la ^3H -sphingomyéline se superposent parfaitement dans le gradient d'Optiprep. Par contre, la ^3H -phosphatidylcholine suit une distribution complètement différente.

CINQUIÈME PARTIE: DISCUSSION

1. La technique au Triton (Sargiacomo/Lisanti)

De la technique au Triton, il ressort que les caveolae peuvent être isolées de fibroblastes cutanés humains. Les conditions d'homogénéisations y sont beaucoup moins critiques que dans les autres techniques. Dans notre type cellulaire, vingt coups de piston permettent d'obtenir une fraction «cavéolaire» contenant 52-55% de la ^3H -sphingomyéline et 26-27% du ^3H -cholestérol cellulaires. Il semble, dans ce type cellulaire, qu'il faille considérer que ce domaine contient aussi 12-14% de la ^3H -phosphatidylcholine. Toute la cavéoline-1 y est présente, la fraction exclut toute trace des autres marqueurs des différents compartiments cellulaires et exclut la majorité des protéines (tel qu'observé après coloration de la membrane de PVDF au rouge Ponceau (données non-présentées)).

Cette dernière constatation constitue pour Sargiacomo/Lisanti un facteur déterminant pour conclure à l'isolement correcte des caveolae: la présence de la cavéoline dans la fraction cavéolaire parallèlement à l'exclusion de la majorité des protéines (tel que vu par coloration de leur membrane au rouge Ponceau) (voir réf 112, fig.1).

La comparaison des distributions lipidiques avec la littérature est plus difficile. En effet, la composition lipidique des caveolae n'a pas été déterminée par Sargiacomo/Lisanti sur des fibroblastes cutanés humains. Toutefois, par une autre technique basée aussi sur l'utilisation du Triton, Brown et Rose décrivent que la fraction contenant les *DRMs* contient 96% de la sphingomyéline, 26% du cholestérol et 5% de la phosphatidylcholine cellulaires (voir réf. 42, Table 2) dans des cellules MDCK. Bien que dans notre cas et dans le leur, le domaine est enrichi en sphingomyéline et en cholestérol, il est impossible de comparer les deux résultats pour trois raisons.

La première est que la composition lipidique est déterminée sur un type cellulaire différent (eux sur des cellules épithéliales MDCK, nous sur des fibroblastes cutanés humains). Bien que la structure générale d'une caveola devrait être similaire d'un type cellulaire à l'autre, l'exacte composition biochimique doit nécessairement varier, puisque chaque type cellulaire a un rôle différent dans l'homéostasie.

La deuxième est que la technique utilisée est différente. Il est possible que les deux techniques isolent les mêmes structures. Toutefois, l'analyse de Brown et Rose est réalisée sur une fraction insoluble au Triton, sans toutefois s'assurer que cette fraction contienne exclusivement les caveolae.

La troisième raison est que ce que nous mesurons, dans ce cas-ci, est la distribution des lipides *radio-marqués* et non leur *masse*. Le fait d'utiliser de la choline tritiée pour marquer la phosphatidylcholine et la sphingomyéline ne permet pas de conclure à la compartimentalisation de ces lipides. En effet, la choline tritiée peut-être utilisée pour la biosynthèse de ces lipides au niveau du réticulum endoplasmique. Cependant, elle peut aussi être utilisée par le recyclage de l'acide phosphatidique en phosphatidylcholine ou par le recyclage d'une céramide-1-phosphate en sphingomyéline. Ce dernier mécanisme est effectué au niveau de la membrane plasmique et y est peut-être même compartimentalisé (120). La mesure des lipides tritiés ne reflète donc pas nécessairement leur distribution réelle. La mesure de leur masse aurait donc été plus appropriée.

L'immunodétection de l'oligomère de cavéoline est inexplicable. Sargiacomo a montré que la cavéoline demeurait oligomérisée même en présence de SDS dans des conditions réductrices sur un gel SDS-PAGE de 5-12%. Cependant, lorsque l'échantillon était chauffé à 100°C pendant deux minutes avant d'être séparé sur gel, la forme oligomérisée disparaissait, au profit de la forme monomérique (54) Ces résultats ont été confirmés par Scherer (51). Pourtant, dans notre cas, la forme oligomérisée est détectée même si tous les échantillons sont chauffés à 95°C pendant trois minutes, en

présence de SDS + β -mercaptoéthanol. Il est possible que le temps que l'échantillon passe à la température ambiante après avoir été chauffé et dans l'attente d'être chargé sur gel permette la réassociation lente des monomères incomplètement dissociés. À noter que l'existence d'oligomères résistants au SDS est un phénomène bien documenté dans la littérature (121, 122). Enfin, il est normal que la plupart des auteurs travaillant sur les caveolae n'aperçoivent pas la forme oligomérisée de cavéoline puisqu'ils font généralement des SDS-PAGE de 12%. À cette concentration d'acrylamide, la forme oligomérisée n'entre pas dans le gel de séparation et demeure dans le gel de concentration (données non-présentées).

2. La technique au carbonate de sodium (Song)

Il a été démontré ici que des conditions d'homogénéisation et de sonification adaptées aux fibroblastes cutanés humains permettait d'isoler les caveolae par la technique au carbonate de sodium. Ce type cellulaire semble plus fragile que les cellules MDCK originalement utilisées par Song (74). En effet, une homogénéisation avec 20 coups de piston est suffisante pour briser la totalité des cellules. Le recours au broyeur Polytron est superflu. Par ailleurs, une sonification à 10% de la puissance de l'appareil est suffisante pour permettre la résolution par le gradient de sucrose entre les domaines cavéolaires et le reste de la cellule. Malheureusement, aucune sonification plus douce n'a été testée, mais il est possible qu'une sonification encore plus douce (entre 0 et 10%) permette d'éviter de faire apparaître des lipides libres flottant sur le gradient. Afin de s'assurer que les lipides retrouvés dans les fractions 1 sont bien libres, il aurait fallu déposer chacun des lipides dans un gradient vide afin de déterminer s'ils flottent bel et bien sur le gradient.

La détermination des conditions expérimentales appropriées est rendue possible grâce à l'utilisation de marqueurs d'autres organelles. Beaucoup d'auteurs qui tentent la technique pour la première fois omettent de faire ces contrôles et s'exposent à la

possibilité que leur fraction «enrichie en cavéoline» contienne aussi le reste de la cellule, comme c'est notre cas en absence de sonification (voir **figure 8 A**, fraction 4).

Les résultats obtenus avec cette technique montrent que les caveolae de fibroblastes cutanés humains contiennent ~46% de ³H-sphingomyéline, ~46% de ³H-cholestérol et ~18% de ³H-phosphatidylcholine et la cavéoline-1 s'y retrouve presque exclusivement. Encore une fois, ces proportions ne reflètent pas nécessairement la masse réelle de chaque lipide. Toutefois, il est possible de comparer les résultats de cette technique-ci avec celle au Triton présentée plus haut, le type cellulaire étant identique dans les deux cas. On remarque ainsi qu'en absence de détergent, les distributions de cholestérol et de sphingomyéline sont identiques alors que la présence de Triton dissocie les deux courbes de distribution. Ceci soutient les observations de Demel, Lange et Slotte qui, indépendamment, ont montré que le cholestérol a une très forte affinité pour la sphingomyéline, mais non pour la phosphatidylcholine (123 - 125) Ceci corrobore aussi les résultats de Lange qui trouve que la courbe de distribution du cholestérol et de la sphingomyéline sont parfaitement superposées dans un gradient de sucrose en absence de détergent (126). Cependant, c'est la première évidence directe que cette affinité cholestérol/sphingomyéline puisse résulter en une co-migration avec la cavéoline.

Par ailleurs, cette technique sans détergent a originalement été mise au point parce que le Triton empêchait de retrouver dans les caveolae certaines protéines ancrées à la membrane par une modification lipidique ($G_{\beta\gamma}$, Ras) (74). Nous sommes ici en droit d'émettre l'hypothèse que ces protéines s'ancrent aux caveolae à cause de l'équilibre molaire cholestérol/sphingomyéline qui y est présent. En effet, nos résultats montrent que le Triton détruit ce ratio et il est probable que des agents liant (filipine) ou modifiant (cholestérol oxydase) le cholestérol aient le même effet. Cette hypothèse pourrait aussi être vérifiée par l'utilisation de d'agents détruisant la sphingomyéline comme la sphingomyélinase.

Les résultats de la **figure 8B** montrent que le gradient permet la résolution de deux domaines majeurs (outre les lipides libres): l'un cavéolaire (fractions 3-4), l'autre non-cavéolaire (fractions 7-10). Ceci est similaire à ce qui a été décrit par Song (voir réf. 74, fig. 3) qui trouve aussi deux domaines dans son gradient. Il fait noter que sa technique permet de séparer les caveolae des domaines riches en protéines ancrées par GPI, suggérant la possibilité que cette technique explore aussi les *rafts* proposés par Simons (96). Malheureusement, aucune localisation de protéines ancrées par GPI n'a été testée ici.

3. La technique sur gradient d'Optiprep (Smart)

L'utilisation de marqueurs des différents compartiments cellulaires a permis de constater que cette technique permet une bonne séparation du cytosol et des membranes sur gradient de Percoll seulement s'il est préparé de façon iso-osmotique. Ceci est conforme à la théorie de l'osmolarité énoncée plus haut. Toutefois, l'osmolarité n'est pas le seul facteur en cause, car l'utilisation d'un gradient hyper-osmotique aurait alors permis la séparation entre les membranes plasmiques et les membranes internes. Comme ce ne fut pas le cas (données non-présentées), il a fallu contrôler la préparation du gradient qui se révéla appropriée. L'examen des conditions d'homogénéisations a permis de constater que les conditions d'homogénéisations proposées par Smart étaient trop fortes.

La technique de Smart est sans doute la plus appropriée pour une étude du transport du cholestérol. Cependant, elle comporte quelques difficultés liées au type cellulaire. L'application de la technique proposée par Smart fonctionne bien sur des cellules de type HUVEC, mais ne fonctionne pas du tout sur des fibroblastes cutanés humains. Ces résultats confirment ceux trouvés avec la technique au carbonate de sodium à savoir que les fibroblastes cutanés humains sont des cellules fragiles qui requièrent des conditions d'homogénéisation douces.

Par ailleurs, il a été mentionné que les fibroblastes cutanés humains subissaient une lyse avant toute homogénéisation mécanique en présence de tampon A 1X. Il serait donc approprié de modifier le protocole en récoltant les cellules dans du PBS (ne lyse pas les cellules) pour ensuite les homogénéiser dans du tampon A 1X et procéder à l'isolement.

Il est possible que la co-migration des membranes internes avec les membranes plasmiques soit lié au fait que les fibroblastes sont des cellules responsables de la production de matrice extracellulaire composée entre-autre de collagène. En effet, cette protéine d'attachement pourrait causer l'agrégation entre les différents compartiments membranaires.

D'autre part, le fait que tous les lipides suivent une distribution identique dans le gradient de Percoll (**Figure 11**) ne permet pas de conclure que ce dernier n'effectue pas la résolution des membranes. En effet, même si la distribution théorique des lipides est bien différente d'un compartiment cellulaire à l'autre (127), le site d'utilisation de la choline tritiée dans la synthèse des deux phospholipides n'est pas très compartimentalisée : l'enzyme régulatrice CTP :phosphocholine-cytidyltransférase impliquée dans la synthèse des phospholipides est localisée dans le cytosol et à la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Aussi, d'autres composantes du système sont localisées à la membrane plasmique (128).

La préparation de l'Optiprep est une autre étape critique de cette technique. Les résultats préliminaires (données non-présentées) indiquent que la cavéoline est retrouvée étalée sur tout le gradient si l'Optiprep est mal préparé. C'est probablement ce qui est arrivé à P. Cameron (129) pour laquelle il fut impossible de concentrer la protéine dans les fractions supérieures.

Cependant, la sonification est, comme dans la technique au carbonate de sodium, un paramètre important à déterminer. Une sonification insuffisante ne brise pas les

membranes qui flottent alors dans les fractions supérieures. Une sonification trop forte détruit toutes les structures et ces dernières flottent alors aussi. Il semble qu'une sonification autour de 13% permette de séparer les compartiments. Toutefois, on tentera de définir le meilleur paramètre au jour où le gradient de Percoll procurera des membranes dépourvues de membranes internes. Le fait que la sonification soit une étape critique pour une bonne séparation des compartiments de la membrane plasmique a d'ailleurs été confirmé par Eric Smart (E.J. Smart, communication personnelle).

Si aucune clathrine n'est présente dans la fraction membranaire du gradient de Percoll iso-osmotique (**figure 9B**), comment se fait-il que la clathrine soit retrouvée dans le gradient d'Optiprep (**figure 13**)? Pour faire le gel testant le gradient de Percoll, on utilise un aliquot de chaque fraction. Par contre, avant de faire le gel testant l'Optiprep, on concentre les protéines par précipitation. La fraction membranaire du gradient de Percoll contient de la clathrine, mais en faible quantité, la majorité étant dans les fractions cytosoliques. La concentration par précipitation permet de la détecter. Ceci montre que la majeure partie de la clathrine est cytosolique dans les fibroblastes cutanés humains.

4. Comparaison des techniques

D'une façon générale, on retient que le protocole d'isolement des caveolae doit être adapté au type cellulaire. Par exemple, les fibroblastes cutanés humains sont des cellules fragiles requérant des conditions d'homogénéisation douces par les techniques au carbonate de sodium et sur gradient d'Optiprep.

En présence de détergent, l'influence de l'homogénéisation est moindre. Cette technique est d'ailleurs celle qui est la moins sujette aux variations expérimentales puisqu'elle ne comporte aucune sonification. Cette technique a toutefois ses limites. Elle cause une dissociation des courbes de distribution du cholestérol et de la sphingomyéline. De plus, elle isole des domaines insolubles au Triton dans une fraction du gradient, mais

aucune évidence n'a été apportée que seules les caveolae flottaient à cette position. Si l'hypothèse de Simons est vraie, alors la probabilité est forte que les *rafts* et le TGN co-ségrègent avec la fraction dite «cavéolaire», leurs compositions lipidiques étant similaires à celle des caveolae (97).

La technique au carbonate de sodium a l'avantage d'éviter l'utilisation de détergent. Ceci permet de conserver l'association du cholestérol et de la sphingomyéline. En contre partie, elle est sujette à des variations reliées aux paramètres expérimentaux comme l'homogénéisation et la sonification. Il en résulte que la définition biochimique des caveolae est subjective; c'est-à-dire que l'on choisira la bonne condition de sonification en fonction de ce qu'on connaît de ce domaine. De plus, elle ne permet pas de séparer les différents compartiments cellulaires les uns des autres.

La technique sur gradient d'Optiprep, même si elle ne fonctionne pas pour le moment sur des fibroblastes cutanés humains, est celle des trois qui est la plus appropriée pour étudier les caveolae. En plus de ne pas faire usage de détergent, elle permet l'isolement sélectif des caveolae de la surface membranaire par l'utilisation préalable d'un gradient de Percoll. Ceci évite d'avoir la contamination du TGN ou des *rafts* cytosolique potentiels. Par contre, elle comporte aussi une étape de sonification pouvant faire varier les résultats. Aussi, les *rafts* membranaires ne sont probablement pas exclus de la fraction cavéolaire puisque le récepteur au folate (une protéine ancrée par GPI) s'y retrouve (72). En effet, si l'on se fie à l'hypothèse de Simons, les protéines à GPI sont ancrées aux *rafts* (97).

Il existe bien d'autres techniques qui n'ont pas été explorées ici. Selon Fujimoto (130), la meilleure technique pour l'isolement des caveolae est celle immunologique (voir «méthodes», technique de Stan (108)) qui a l'avantage de conserver la compartimentalisation membranaire par l'utilisation de silice cationisée. Il est vrai que cette technique extrait elle aussi les caveolae des membranes plasmique exclusivement. Néanmoins, si le domaine cavéolaire se retrouve dépourvu de cavéoline pour quelque

raison que ce soit, la technique ne fonctionne plus. De plus, à partir des constatations faites ici, on peut émettre l'hypothèse que la fonctionnalité de la technique sera dépendante des conditions d'homogénéisation et de sonification utilisées.

SIXIÈME PARTIE : CONCLUSION

Trois techniques d'isolement des caveolae ont été explorées. On constate que ces techniques doivent être adaptées au type cellulaire. De plus, chaque technique comporte des étapes critiques allant de la préparation des solutions à l'homogénéisation et la sonification. De bons contrôles permettent d'éviter une fausse définition des caveolae. Cette dernière varie selon le type cellulaire et la technique employée.

La définition des caveolae étant sujette à des variations dues aux conditions expérimentales, il n'est pas étonnant que les expérimentateurs ne s'entendent pas sur une définition. L'omission de faire des contrôles de l'absence des autres compartiments cellulaires complexifie le débat. En effet, en plus de varier d'un type cellulaire à l'autre, il existe un éventail de notions de domaines de *DRMs*, de *DIGs*, de *GEMs*, de *LDMs*, de *LDTIs* et de *rafts* qui contiennent les mêmes domaines ou qui sont en constantes interactions entre eux.

Que sont les caveolae? Elles sont probablement des agrégats de rafts insolubles au Triton, maintenus ensembles par la cavéoline dans certains types cellulaires, ayant une faible densité dans un gradient de sucrose ou d'Optiprep et dérivant du TGN. Mais une chose est sûre: leur composition biochimique est différente selon le type cellulaire et la technique employée pour les étudier.

RÉFÉRENCES

1. Murray C.J.L. & Lopez A.D. (1997), Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **349**(9061):1269-1276
2. Marcil M., Boucher B., Krimbou L., Solymoss B.C., Davignon J., Frohlich J. & Genest J. Jr (1995), Severe familial HDL deficiency in French-Canadian kindreds. Clinical, biochemical, and molecular characterization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**(8):1015-24
3. Marcil M., Yu L., Krimbou L., Boucher B., Oram J.F., Cohn J.S. & Genest J. Jr (1999), Cellular cholesterol transport and efflux in fibroblasts are abnormal in subjects with familial HDL deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**(1):159-69
4. Smart E.J., Ying Y.S., Donzell W.C. & Anderson R.G.W., (1996), A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **271**(46) :29427-29435
5. Fielding P.E. & Fielding C.J. (1995), Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* **34**(44):14288-92
6. Yamada E. (1955), The fine structure of the gall bladder epithelium in the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**:445-458
7. Nazih F. & Delbart C. (1998), Transmission du signal intracellulaire par les protéines ancrées par un glycosyl-phosphatidylinositol. *Médecine Sciences* **3**:275-282.
8. Rothberg K.G., Ying Y-S., Kamen B.A. & Anderson R. G. W. (1990), Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell Biol.* **111**:2931-2938
9. Grundy S.M. (1990), *Cholesterol and Atherosclerosis: Diagnosis and Treatment* J.P. Lippincott Company, Philadelphia & Gower Medical Publishing, NY, London. pp.1.2-4.43
10. Kwiterovich P.O. Jr (1998), State-of-the-art update and review: clinical trials of lipid-lowering agents. *Am. J. of Cardiol.* **82**(9A):13Q-21Q,
11. Genest J. Jr, Marcil M., Denis M., & Yu L. (1999), High density lipoproteins in health and in disease. *J. Investig Med.* **47**(1) :31-42

12. Walter M., Gerdes U., Seedorf U. & Assmann G. (1994), The high density lipoprotein- and apolipoprotein A-I-induced mobilization of cellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**(1):850-856
13. Francis G.A., Knopp R.H. & Oram J.F. (1995), Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J. Clin. Invest.* **96**(1):78-87
14. Walter M., Reinecke H., Gerdes U., Nofer J-R., Höbbel G., Seedorf U., & Assmann G. (1996), Defective regulation of phosphatidylcholine-specific phospholipases C and D in a kindred with Tangier disease. Evidence for the involvement of phosphatidylcholine breakdown in HDL-mediated cholesterol efflux mechanisms. *J. Clin. Invest.* **10** :2315-2323
15. Batal R., Tremblay M., Krimbou L., Mamer O., Davignon J., Genest J. Jr & Cohn J.S. (1998), Familial HDL deficiency characterized by hypercatabolism of mature apoA-I but not proapoA-I. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* **18** :655-664
16. Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson R.G.W., Russel D.W. & Schneider W.J. (1985), Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev Cell Biol.* **1**:1-39
17. Spillane D.M., Reagan J.W. Jr, Kennedy N.J., Schneider D.L. & Chang T-Y, (1995), Translocation of both lysosomal LDL-derived cholesterol and plasma membrane cholesterol to the endoplasmic reticulum for esterification may require common cellular factors involved in cholesterol egress from the acidic compartments (lysosomes/endosomes). *Biochim. Biophys. Acta* **1254**: 283-294
18. Brasaemle D.L. & Attie A.D. (1990), Rapid intracellular transport of LDL-derived cholesterol to the plasma membrane in cultured fibroblasts. *J.Lipid Res.* **31**:103-112
19. Fielding P.E. & Fielding C.J. (1996), Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry* **35**: 14932-14938
20. Phillips M.C., Gillotte K.L., Haynes M.P., Johnson W.J., Lund-Katz S., Rothblat G.H. (1998) Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes. (Review) *Atherosclerosis* **137** Suppl:S13-7
21. Gillotte K.L., Davidson W.S., Lund-Katz S., Rothblat G.H. & Phillips M.C. (1998), Removal of cellular cholesterol by pre-beta-HDL involves plasma membrane.microsolubilization. *J. Lipid Res.* **39**(10):1918-28

22. Mendez A.J., Oram J.F. & Bierman E.L. (1991), Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* **266**(16) :10104-10111
23. Kurata H., Matsumoto A., Fujiwara Y., Kondo K., Itakura H., Mitchell A. & Fidge N. (1998), A candidate high density lipoprotein (HDL) receptor, HB2, with possible multiple functions shows sequence homology with adhesion molecules. *J. Atheroscler. Thromb.* **4**(3):112-7
24. Fidge N. (1999), High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J. Lipid Res.* **40**(2):187-201
25. Sviridov D. (1999), Intracellular cholesterol trafficking. *Histol. Histopathol.* **14** :305-319
26. van Helvoort A., Smith A.J., Sprong H., Fritzsche I., Schinkel A.H., Borst P. & van Meer G., (1996), MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **87**(3) :507-517
27. Lucker G.D., Nilsson K.R., Covey D.F. & Piwnica-Worms D. (1999), Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.* **274**(11) :6979-6991
28. Uittenbogaard A., Ying Y-S., & Smart E.J. (1998), Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem* **273**(11) :6525-6532
29. Murata M.J., Peränen R., Schreiner R., Wieland F., Kurzchalia T.V. & Simons K. (1995), VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **92** :10339-10343
30. Bist A., Fielding P.E. & Fielding C.J. (1997), Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** :10693-10698
31. Fielding C.J., Bist A. & Fielding P.E., (1997), Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** :3753-3758
32. Babitt J., Trigatti B., Rigotti A., Smart E.J., Anderson R.G.W., Xu S. & Krieger M. (1997), Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* **272**(20) :13242-13249

33. Webb N.R., Connell P.M., Graf G.A., Smart E.J., Villiers W.J.S., de Beer F.C. & van der Westhuyzen D.R. (1998), SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J. Biol. Chem.* **273**(24) :15241-15248
34. Nion S., Briand O., Lestavel S., Torpier G., Nazih F., Delbart C., Fruchart J-C. & Clavey V. (1997), High-density-lipoprotein subfraction 3 interaction with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochem. J.* **328** :415-423
35. Dorahy D.J. Lincz L.F., Meldrum C.J. & Burns G. (1996), Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochem. J.* **319** :67-72
36. Graf G. A., Connel P.M., van der Westhuyzen D.R. & Smart E.J. (1999), The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol ethers into caveolae. *J. Biol. Chem.* **274**(17):12043-12048
37. Field F.J., Born E., Murthy S. & Mathur S.N. (1998), Caveolin is present in intestinal cells: role in cholesterol trafficking? *J. Lipid Res.* **39** : 1938-1950
38. Palade G. (1968), Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J. Cell Biol.* **37** : 633-649
39. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J.D. Molecular Biology of the Cell, third edition., Garland Publishing, Inc. New York & London 1994 :635-647
40. Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y-S., Glenney J.R. & Anderson R.G.W. (1992), Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68** :673-682
41. Simionescu N., Lupu F. & Simionescu M. (1983), Rings of membrane sterols surround the openings of vesicles and fenestrae, in capillary endothelium. *J. Cell Biol.* **97** :1592-1608
42. Brown D. A. & Rose J.K. (1992), Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**: 533-544
43. Kurzchalia T.V. & Parton R.G. (1996), And still they are moving.... dynamic properties of caveolae. *FEBS Letters* **389** :52-54

44. Tran D., Carpentier J-L., Sawano F., Gorden P., & Orci L. (1987), Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** :7957-7961
45. Hansen S.H., Sandvig K. & van Deurs B. (1991), The preendosomal compartment comprises distinct coated and noncoated endocytic vesicle populations. *J. Cell Biol.* **113** :731-741
46. Anderson R.G.W., Kamen B.A. Rothberg K.G. & Lacey S. W. (1992), Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255** :410-411
47. Chang Y-J., Rothberg K. G., Kamen B.A. & Anderson R.G.W. (1992), Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J. Cell Biol.* **118**(1):63-69
48. Smart E.J., Ying Y-S., Conrad P.A. & Anderson R.G.W. (1994), Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell Biol.* **127**(4) :1185-1197
49. Scherer P.E., Tang Z-L., Chun M., Sargiacomo M., Lodish H.F. & Lisanti M.P. (1995), Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* **270** (27) : 16395-16401
50. Glenney J. R. Jr (1992), The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Letters* **314** :45-48
51. Scherer P.E., Okamoto T., Chun M., Nishimoto I., Lodish H.F. & Lisanti M.P. (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93** :131-135
52. Tang Z.L., Scherer P.E., Okamoto T., Song K., Chu C., Kohtz D.S., Nishimoto I., Lodish H.F. & Lisanti M.P. (1996), Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* **271**(4) :2255-2261
53. Monier S., Parton R.G., Vogel F., Behlke J., Henske A. & Kurzchalia T.V. (1995), VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* **6** :911-927
54. Sargiacomo M., Scherer P.E., Tang Z.L., Kübler E., Song K. S., Candlers M.C., & Lisanti M.P. (1995), Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** :9407-9411

55. Song K. S., Tang ZL., Li S. & Lisanti M.P. (1997), Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homotypic caveolin-caveolin interactions. *J. Biol.Chem.*, **272**(7) :4398-4403
56. Dietzen D.J., Hastings W.R. & Lublin D.M. (1995), Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* **270**(12) :6838-6842
57. Monier S., Dietzen D.J., Hastings W.R., Lublin D.M. & Kurzchalia T.V. (1996), Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Letters* **388** :143-149
58. Glenney J.R. Jr (1989), Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.*, **264**(34) :20163-20166
59. Sargiacomo M., Scherer P.E., Tang ZL., Casanova J.E., & Lisanti M.P. (1994), In vitro phosphorylation of caveolin-rich membrane domains: identification of an associated serine kinase activity as a casein kinase II-like enzyme. *Oncogene* **9** :2589-2595
60. Li S., Okamoto T., Chun M., Sargiacomo M., Casanova J.E., Hansen S.H., Nishimoto I. & Lisanti M.P. (1995), Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol Chem.* **270** (26):15693-15701
61. Oka N., Yamamoto M., Schwencke C., Kawabe J., Ebina T., Ohno S., Couet J., Lisanti M.P. & Ishikawa Y. (1997), Caveolin interaction with protein kinase C Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J. Biol. Chem.* **272**(52):33416-21
62. Schlegel A., Schwab R.B., Scherer P.E. & Lisanti M.P. (1999), A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. *J. Biol. Chem.* **274**(32) :22660-22667
63. Scheiffele P., Verkade P., Fra A.M., Virta H., Simons K. & Ikonen E. (1998), Caveolin-1 and -2 in the Exocytic Pathway of MDCK Cells *J. Cell Biol.* **140**(4) :795-806
64. Ghitescu L. & Bendayan M. (1992), Transendothelial transport of serum albumin: a quantitative immunocytochemical study. *J. Cell Biol.* **117** :745-755
65. Bendayan M. & Rasio E. A. (1996), Transport of insulin and albumin by the microvascular endothelium of the rete mirabile. *J. Cell Sciences* **109** : 1857-1864

66. Simionescu N., Simionescu M. & Palade G.E. (1975), Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J. Cell Biol.* **64**: 586-607
67. Ghitescu L., Fixman A., Simionescu M. & Simionescu N. (1986), Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J. Cell Biol.* **102** :1304-1311
68. Dehouck B., Fenart L., Dehouck M-P., Pierce A., Torpier G. & Cecchelli R. (1997), A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* **138**(4) :877-889
69. Goldberg R.I., Smith R.M. & Jarett L. (1987), Insulin and alpha 2-macroglobulin-methylamine undergo endocytosis by different mechanisms in rat adipocytes: I. Comparison of cell surface events. *J. Cell Physiology*, **133** :203-212
70. Tran D., Carpentier J.L., Sawano F., Gorden P. & Orci L. (1987), Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**(22):7957-61.
71. Rothberg K.G., Ying Y-S., Kolhouse J.F., Kamen B.A. & Anderson R.G.W. (1990), The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J. Cell Biol.* **110**(3):637-649
72. Smart E.J., Mineo C. & Anderson R.G.W. (1996), Clustered folate receptors deliver 5-methyltetrahydrofolate to cytoplasm of MA104 cells. *J. Cell Biol.* **134** : 1169-1177
73. Mineo C., James G.L., Smart E.J. & Anderson R.G.W. (1996), Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J. Biol. Chem.* **271**(20) :11930-11935
74. Song K.S., Shengwen L., Okamoto T., Quilliam L.A., Sargiacomo M., Lisanti M.P. (1996), Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains *J. Biol. Chem.* **271**(16) :9690-9697
75. Avruch J., Zhang X-F., & Kyriakis J.M. (1994), Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends in Biochem. Sci.* **19**:279-283
76. Galbiati F., Volonté D., Engelman J.A., Watanabe G., Burk R., Pestell R.G. & Lisanti M.P. (1998), Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO Journal* **17**(22) :6633-6648

77. Yang C.P., Galbiati F., Volonté D., Horwitz S.B. & Lisanti M.P. (1998), Upregulation of caveolin-1 and caveolae organelles in Taxol-resistant A549 cells *FEBS Letters* **439**(3) :368-372
78. Wu C., Butz S., Ying Y-S., & Anderson R.G.W. (1997), Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **272**(6) :3554-3559
79. Galbiati F., Volonté D., Meani D., Graeme M., Lublin D.M., Lisanti M.P. & Parenti M. (1999), The dually acylated NH₂-terminal domain of G_{i1} α is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated G-protein alpha subunits in vivo. *J Biol Chem.* **274** (9) :5843-5850
80. Smart E.J., Ying Y-S., Mineo C. & Anderson R.G.W. (1995), A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**:10104-10108
81. Toya Y., Schwencke C., Couet J., Lisanti M.P. & Ishikawa Y. (1998), Inhibition of adenylyl cyclase by caveolin peptides. *Endocrinology* **139**(4):2025-31
82. Pike L.J. & Miller J.M. (1998), Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **273**(35):22298–22304
83. Smart E.J., Ying Y-S. & Anderson R.G.W. (1995), Hormonal regulation of caveolae internalization *J. Cell Biol.* **131**(4):929-938
84. Tang Z.L., Scherer P.E. & Lisanti M.P. (1994), The primary sequence of murine caveolin reveals a conserved consensus site for phosphorylation by protein kinase C *Gene* **147**(2):299-300.
85. Czarny M., Lavie Y., Fiucci., Liscovitch M. (1999), Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101. *J. Biol. Chem.* **274**(5) :2717-2724
86. Mineo C., Ying Y-S., Chapline C., Jaken S. & Anderson R.G.W. (1998), Targeting of protein kinase C α to caveolae. *J. Cell. Biol.* **141**(3) : 601-610.
87. Rybin V.O., Xu X. Steinberg S.F. (1999), Activated protein kinase C isoforms target to cardiomyocyte caveolae: stimulation of local protein phosphorylation. *Circulation Research.* **84**(9):980-988

88. Schnitzer J.E., McIntosh D.P., Dvorak A.M., Liu J. & Oh P. (1995), Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science* **269**:1435-1439
89. Okamoto T., Schlegel A., Scherer P.E. & Lisanti M.P. (1998), Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**(10):5419-5422
90. Ju H., Zou R., Venema V.J. & Venema R.C. (1997), Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* **272**(30) : 18522-18525
91. Shaul P.W., Smart E.J., Robinson L.J., German Z., Yuhanna I.S., Ying Y-S., Anderson R.G.W. & Michel T. (1996), Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* **271**(11) :6518-6522
92. Brown M.S. & Goldstein J.L. (1986), A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**:34-47
93. Brown D.A. & London E. (1997), Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **240** (1):1-7
94. Schroeder R.J., Ahmed S.N., Zhu Y., London E. & Brown D.A. (1998), Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J. Biol. Chem.* **273**(2) :1150-1157
95. Orci L., Montesano R., Meda P., Malaisse-Lagae F., Brown D., Perrelet A., & Vassalli P. (1981), Heterogeneous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** :293-297
96. Simons K. & Ikonen E. (1997), Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387** : 569-572
97. Harder T. & Simons K. (1997), Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9** :534-542
98. Hodgkin M.N., Clark J.M., Rose S., Saqib K. & Wakelam M.J. (1999), Characterization of the regulation of phospholipase D activity in the detergent-insoluble fraction of HL60 cells by protein kinase C and small G-proteins. *Biochem J.* **339**(Pt 1):87-93.
99. Parolini I., Sargiacomo M., Lisanti M.P. & Peschle C. (1996), Signal transduction and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and

- CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood* **87**(9) : 3783-3794
100. Dorahy D.J., Lincz L., Meldrum C.J. & Burns G.F. (1996), Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochem. J.* **319** :67-72
101. Kübler E., Dolhman H.G. & Lisanti M.P. (1996), Identification of Triton X-100 insoluble membrane domains in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lipid requirements for targeting of heterotrimeric G-protein subunits. *J. Biol. Chem.* **271**(51) :32975-32980
102. Smart E.J., Ying Y-S., Conrad P.A. & Anderson R.G.W. (1994), Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell Biol.* **127**(5) : 1185-1197
103. Fra A.M., Williamson E., Simons K. & Parton R.G. (1995), De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** :8655-8659
104. Mayor S., Rothberg K.G. & Maxfield F.R. (1994), Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* **264** :1948-1951
105. Fielding C.J. & Fielding P.E. (1997), Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **38** :1503-1521
106. Sargiacomo M., Sudol M., Tang Z. & Lisanti M.P. (1993), Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **122** :789-808
107. Lisanti M.P., Tang Z.L., Scherer P.E. & Sargiacomo M. (1995), Caveolae purification and glycosylphosphatidylinositol-linked protein sorting in polarized epithelia. *Methods Enzymol.* **250**:655-668
108. Stan R-V., Roberts G.W., Predescu D., Ihida K., Saucan L., Ghitescu L. & Palade G.E. (1997), Immun isolation and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae). *Mol. Biol. Cell* **8** :595-605.
109. Chang W.J., Ying Y-S., Rothberg K., Hooper N., Turner A., Gambliel H., De Gunzburg J., Mumby S., Gilman A., & Anderson R.G.W. (1994), Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell Biol.* **126**(1):127-138
110. Pike L.J. & Miller J. (1998), Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol biphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J. Biol Chem.* **273**(35) :22298-22304

111. Oh P. & Schnitzer J.E. (1999), Immunoisolation of caveolae with high affinity antibody binding to the oligomeric caveolin cage. Toward understanding the basis of purification *J. Biol. Chem.* **274**(33):23144-23154
112. Lisanti M.P., Scherer P. E., Vidugiriene J., Tang Z.L., Hermanoski-Vosatka A., Tu Y-H., Cook R.F. & Sargiacomo M. (1994), Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell Biol.*, **126**:111-126
113. Olson E.N. & Spizz G. (1986), Fatty acylation of cellular proteins. *J. Biol. Chem.* **261**(5):2458-2466
114. Sayers L.G., Miyawaki A., Muto A., Takeshita H., Yamamoto A., Michikawa T., Furuichi T. & Mikhoshiba K. (1997), Intracellular targeting and homotetramer formation of a truncated inositol 1,4,5-triphosphate receptor-green fluorescent protein chimera in *Xenopus laevis* oocytes: evidence for the involvement of the transmembrane spanning domain in endoplasmic reticulum targeting an homotetramer complex formation. *Biochem. J.* **323**:273-280
115. Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S. & Lazarow P.B. (1982), Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **93**:97-102
116. Graham J. (1984), dans *Centrifugation, A Practical Approach*, ed Rickwood D (IRL Washington, DC) :161-182
117. De la compagnie *Pharmacia: Percoll, Methodology and Applications; Density Markers Beads for calibration of gradients of Percoll*:1-63
118. Mendez A.J. & Uint L. (1996), Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol and phospholipid efflux depend on a functional Golgi apparatus *J. Lipid Res.* **37**:2510-2524
119. Graham J. (1984), dans *Centrifugation, A Practical Approach*, ed Rickwood D (IRL Washington, DC) :311-316
120. Liu P. & Anderson R.G.W. (1995), Compartmentalized Production of Ceramide at the Cell Surface *J. Biol. Chem.* **270**:27179-27185
121. Lemmon M. A., Flanagan J.M., Hunt J.F., Adair B.D., Bormann B-J., Dempsey C.E. & Engelman D.M. (1992), Glycophorin A Dimerization Is Driven by Specific Interactions between Transmembrane α -Helices *J. Biol. Chem.* **267**(11):7683-7689

122. Hébert T.E., Moffet S., Morello J-P., Loisel T.P., Bichet D.G., Barret C. & Bouvier M. (1996), A Peptide Derived from a β_2 -Adrenergic Receptor Transmembrane Domain Inhibits Both Receptor Dimerization and Activation *J. Biol. Chem.* **271**(27):16384-16392
123. Demel R.A., Jansen J.W.C.M., van Dijck P.W.M. & Deenen L.L.M. (1977), The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids *Biochim. Biophys. Acta* **465**:1-10
124. Lange Y., D'Alessandro J.S. & Small D.M. (1979), The affinity of cholesterol for phosphatidylcholine and sphingomyelin *Biochim. Biophys. Acta* **556**(3):388-398
125. Slote P.J., Hedström G., Rannström S. & Ekman S. (1989), Effects of sphingomyelin degradation on cell cholesterol oxidizability and steady-state distribution between the cell surface and the cell interior. *Biochim Biophys Acta* **985**:90-96
126. Lange Y., Swaisgood M.H., Ramos B.V. & Steck T.L. (1989), Plasma membrane contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **264**(7):3786-93
127. van Meer G. (1989), Lipid traffic in animal cells *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5** :247-275
128. Zlatkine P., Leroy C., Moll G. & Le Grimellec C. (1996), Thight connection between choline transport and phosphatidylcholine synthesis in MDCK cells. *Biochemical J.* **315** (Pt 3):983-7
129. Cameron P.L., Ruffin J.W., Bollag R., Rasmussen H. & Cameron R.S. (1997), Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci.* **17**(24):9520-35
130. Fujimoto T., Hagiwara H., Aoki T., Kogo H. & Nomura R. (1998), Caveolae : from a morphological point of veiw (review) *J. Electron Microscopy* **5** :451-460