

Clonage d'un lipolysis stimulated receptor exprimé dans le foie

L'identification du récepteur des LDL réalisée en 1974 par J.L. Goldstein et M.S. Brown a marqué une avancée définitive dans le domaine de la lipidologie et de la biologie cellulaire mais aussi le début d'une controverse scientifique d'une grande intensité [1]. En effet, le récepteur des LDL fixe l'apolipoprotéine (apo)B principal constituant des LDL et l'apo E présente sur les résidus de chylomicrons – la fraction lipoprotéique qui assure le transport des triglycérides absorbés par l'intestin après le repas. Les sujets porteurs de mutations du gène du LDL récepteur présentent un défaut d'épuration des LDL, transporteur du cholestérol plasmatique, et par conséquent une hypercholestérolémie [1]. En revanche, et paradoxalement chez ces mêmes individus la clairance des chylomicrons se poursuit à vitesse normale. Dès lors, bien que le LDL récepteur fixe et dégrade les LDL et les résidus de chylomicrons [2], il ne peut être tenu comme seul responsable de l'épuration des deux types de particules. La présence d'un second récepteur devait être envisagée.

Dans un premier temps, la caractérisation de ce second récepteur s'est engagée sur la base de sa capacité de fixer sélectivement l'apo E. Cette démarche se justifiait par le fait que certains sujets homozygotes pour une isoforme particulière de l'apo E – l'apo E2 – présentent un défaut d'épuration des chylomicrons et une forme particulière d'hyperlipidémie mixte : l'hyperlipidémie de type III [3]. La recherche du récepteur de l'apo E a abouti à la caractérisation d'une protéine de 59 kDa [4]. Toutefois, les propriétés de sélectivité de

l'apo E n'ont pas permis de séparer cette fraction de son principal contaminant une F1-ATPase mitochondriale [5]. Cette impasse mettait un terme à 10 années de recherches intensives.

Low density lipoprotein receptor related protein

La seconde approche expérimentale s'est révélée d'emblée plus fructueuse sur le plan moléculaire. En effet, le clonage de gènes homologues aux LDL récepteur réalisé par J. Herz, mettait en évidence la *low density lipoprotein receptor related protein* (LRP) et ouvrait la voie de la découverte d'une famille de gènes [6]. Certains de ses membres sont capables de fixer les lipoprotéines ; toutefois à l'exception de LRP aucun de ces homologues n'est exprimé au niveau du foie, site principal d'épuration des chylomicrons. Le dossier de LRP s'est progressivement révélé plus complexe. En effet ce récepteur fixe avec une haute affinité plus d'une dizaine de ligands dont l' $\alpha 2$ macroglobuline [7] et réalise l'endocytose de certaines classes de lipoprotéines – les β -VLDL – enrichies en apoprotéine E recombinante [8]. Cette propriété suggère que LRP est impliquée dans l'épuration des chylomicrons. Toutefois une série d'arguments réfute cette hypothèse. Tout d'abord LRP est exprimée non seulement dans les hépatocytes mais aussi dans les cellules de Kupffer [9]; seuls les hépatocytes jouent un rôle majeur dans l'épuration des chylomicrons. Ensuite la fixation des lipoprotéines à la LRP n'est pas modifiée par la lactoferrine [10]. Cette protéine du lait induit un blocage de l'épuration des chylomicrons

et une hypertriglycéridémie postprandiale massive lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse [16].

La démonstration définitive du rôle physiologique de LRP revient à l'équipe de Herz qui a obtenu par la technique du CRE-lox l'extinction sélective de l'expression de LRP au niveau du foie [11]. Les souris ainsi rendues déficientes ne présentent pas d'hyperlipémie spontanée. Toutefois lorsqu'elles sont croisées avec des animaux déficients pour le LDL récepteur, on observe l'accumulation d'apo B48, une forme tronquée d'apo B présente sur les chylomicrons, ainsi qu'une hypercholestérolémie sans hypertriglycéridémie. LRP est donc responsable d'une partie de l'épuration des lipoparticules d'origine intestinale mais son rôle est limité. En absence de LDL récepteur, LRP fixe et élimine les résidus de chylomicrons qui après un séjour prolongé dans le plasma ont perdu l'essentiel de leur charge en triglycérides et accumulé du cholestérol et de l'apo E. Dans le même temps l'analyse du phénotype des animaux déficients en LRP établi qu'en plus du LDL récepteur et de LRP une troisième voie d'épuration fonctionne au niveau des cellules hépatiques. En effet, aucune élévation des triglycérides n'est détectée chez ces animaux. Cela contraste avec l'induction d'une hypertriglycéridémie massive qui survient lorsque les souris surexpriment la 39 kDa *receptor associated protein* (RAP) [12] ou reçoivent une injection de lactoferrine [10].

Lipolysis stimulated receptor

Une observation fortuite a permis la mise en évidence de l'activité d'un

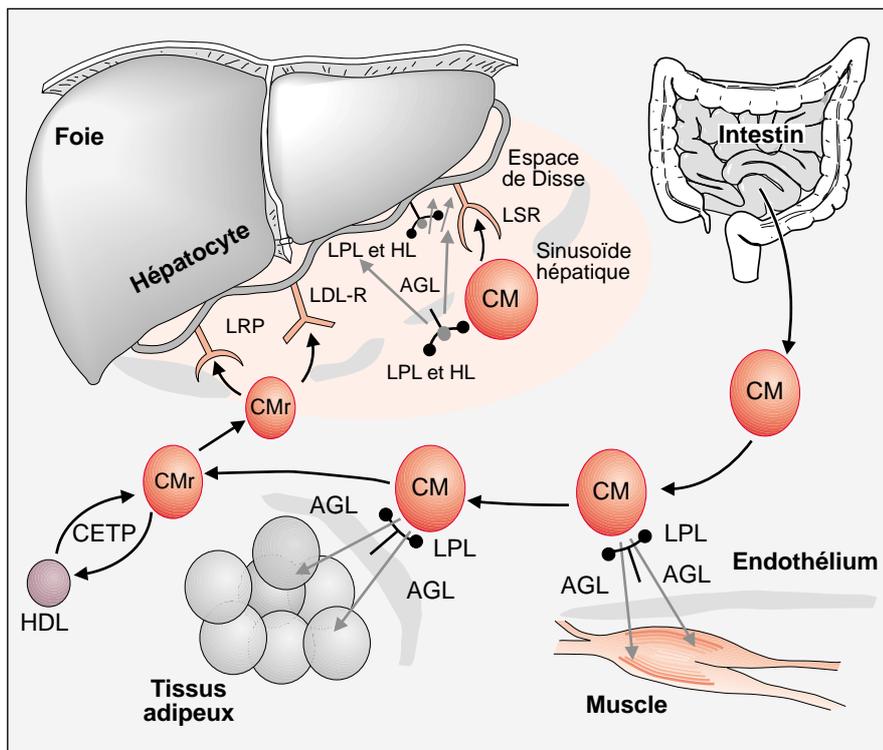


Figure 1. **La voie exogène du métabolisme lipoprotéique.** AGL: acides gras libres; CETP: cholesteryl ester transfer protein; CM: chylomicrons; CMr: remnants de chylomicron; HDL: high density lipoprotein; HL: lipase hépatique; LDL-r: récepteur de low density lipoprotein; LPL: lipase lipoprotéique; LRP: LDL-receptor related protein; LSR: lipolysis stimulated receptor.

récepteur lipoprotéique distinct du LDL récepteur et de la LRP [13]. Ce récepteur activé par les acides gras libres fixe l'apo B et l'apo E et son affinité est optimale pour les fractions lipoprotéiques les plus riches en triglycérides – chylomicrons et VLDL – [14]. Sur la base de ces observations, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle les enzymes lipolytiques-lipase hépatique (HL) et lipoprotéine lipase (LPL) – présents aux niveaux des sinusoides du foie et dans l'espace de Disse – produisent un flux d'acides gras libres (AGL) qui induit un changement de conformation du LSR et démasque le site de fixation des lipoprotéines. Notre approche expérimentale s'est ensuite focalisée sur deux objectifs. Le premier consistait à vérifier la validité du modèle en déterminant l'effet de différents modulateurs du métabolisme des triglycérides sur l'activité LSR. Le second visait à définir les propriétés

biochimiques du LSR avec suffisamment de précision pour réaliser la purification et le clonage de ce gène. Une série d'arguments circonstanciels indiquent que le LSR représente une étape limitante de la clairance des *triglyceride rich lipoprotein* (TGRL).
 1. L'activité LSR est inhibée par la lactoferrine [14] et par la 39 kDa RAP [15]. Ces effets sont dépendants de la dose et sont observés aux concentrations qui induisent un retard de clairance *in vivo* [12].
 2. L'apo CIII, une apolipoprotéine qui induit une hypertriglycéridémie massive lorsqu'elle est surexprimée *in vivo*, empêche sélectivement la fixation des TGRL au LSR [16, 17].
 3. Le nombre apparent de LSR exprimés au niveau des membranes plasmiques de foie de rat est inversement corrélé à la triglycéridémie mesurée durant la phase postprandiale [18]. Dans le même temps la caractérisation biochimique du récepteur se heurtait à plusieurs obstacles tech-

niques: le principal résidant dans l'instabilité du complexe. Une méthode de *ligand blotting* identifiait dans des extraits de protéines d'origine humaine deux bandes de 85 et 115 kDa [14]. Les extraits de foie de rat mettaient en évidence 3 bandes de poids moléculaires 90, 115 et 240 kDa [18]. L'optimisation de la technique d'électrotransfert et l'amélioration des conditions de solubilisation et de stockage dans le but de minimiser la dégradation du complexe suggéraient que l'élément de 240 kDa était responsable de l'essentiel de l'activité LSR. Toutefois, l'instabilité du complexe interdisait la mise en place d'une procédure classique de purification. Une purification partielle du récepteur a néanmoins permis de préparer des anticorps polyclonaux qui établissent un lien entre les différents complexes protéiques (90, 115 et 240 kDa) ainsi qu'entre ces complexes et l'activité LSR [19]. Ces mêmes anticorps ont ensuite montré que le LSR était constitué de 2 principales sous-unités assemblées par des ponts disulfures et dont les poids moléculaires en conditions réduites et dénaturantes sont de 68 et 56 kDa.

Le criblage d'une librairie d'expression a mis en évidence un clone correspondant à un ADNc de 2,1 kb exprimé sélectivement au niveau hépatique. Le poids moléculaire du produit de traduction de ce clone est de 65,8 kDa (α). Sa séquence primaire contient une série de motifs compatibles avec une fonction de récepteur membranaire. L'analyse systématique par RT-PCR des ARN messagers hépatiques révélait trois composants dont la séquence est compatible avec un mécanisme d'épissage alternatif. Les poids moléculaires des produits de traduction de ces deux autres ARN-m sont 63,8 (α') et 58,3 (β). Les éléments α et α' correspondent à la plus large des sous-unités LSR qui dans certaines conditions apparaît comme un doublet tandis que le produit du clone β correspond au second élément du LSR. L'analyse stœchiométrique des produits d'immunoprécipitation prenant en compte les différences de poids moléculaire et de composition en acides aminés soufrés indiquent

que les complexes LSR existent sous 2 formes principales : $\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_1\beta_3$, dont les poids moléculaires sont de 180 et 236 kDa. Le lien entre ces complexes et l'activité LSR fut établi par deux approches expérimentales. D'une part, des anticorps dirigés contre un peptide synthétique dérivés de la séquence primaire et positionnés au niveau du site présomptif de fixation des lipoprotéines inhibent significativement l'activité du récepteur. Ensuite, il a été possible de reconstituer par transfection transitoire, dans des cellules de *chinese hamster ovary*, l'activité d'un récepteur qui dépend de la présence d'acides gras libres et dont la spécificité de ligand est superposable à celle décrite pour le LSR. La transfection du clone α induit une augmentation de la fixation et de l'internalisation des lipoprotéines en présence d'oléate; toutefois seule la co-transfection du clone α et du clone β permet d'obtenir une augmentation de la dégradation des lipoprotéines en présence d'oléate. Cette dernière observation est cependant inconsistante et une analyse détaillée de la biologie du récepteur, et particulièrement du ou des chaperons moléculaires qui permettent l'assemblage du complexe, se révèle indispensable. Dans cette perspective nous avons identifié par séquençage de l'extrémité NH2 terminale un élément de 33 kDa qui co-précipite avec le complexe LSR et reconnaît un motif protéique spécifique proche du site actif presumé du LSR. Le rôle biologique de ce chaperon moléculaire est en cours d'évaluation.

Le modèle LSR élément de consensus

Deux controverses continuent à animer le débat sur les mécanismes de clairance des lipoprotéines. Tout d'abord s'il est admis que le LDL récepteur est impliqué dans l'épuration des LDL, il reste à expliquer comment les individus déficients pour le LDL récepteur éliminent chaque jour 2 à 3 fois plus de LDL que les sujets normaux. De plus les hépatocytes sont directement responsables de cette voie de dégradation indépendante du LDL récepteur [20]. Hoeg *et al.* ont mis en évidence

deux sites de fixation hépatique des LDL distincts du LDL récepteur et dont les poids moléculaires apparents sont du même ordre que ceux des complexes LSR [21]. Si l'on admet l'existence d'un second récepteur hépatique des LDL, il est difficile d'expliquer l'augmentation des concentrations plasmatiques de LDL qui survient chez les sujets déficients pour le récepteur des LDL [1]. Le modèle LSR offre une solution à ce paradoxe. En effet, les LDL ne contiennent pas de triglycérides en quantité suffisante pour produire les AGL nécessaires à l'activation du LSR. De plus, même si LSR fixe sélectivement les LDL, leur affinité est plus faible que celle des particules riches en triglycérides. Un phénomène de compétition expliquerait l'élévation massive des LDL qui survient lorsque le LDL récepteur est déficient. Dans ces conditions la clairance des LDL serait assurée par le LSR au prix d'une augmentation des taux de cholestérol circulant.

Le second débat porte sur l'existence postulée d'un récepteur spécifique de l'apoE. Il est clair que LRP fixe les lipoprotéines enrichies en apoE et, en l'absence de LDL récepteur, contribue à l'épuration des chylomicrons qui ont perdu leur charge en triglycérides et se sont enrichis en cholestérol. Toutefois, LRP reconnaît indifféremment les différentes isoformes d'apo E dont l'apo E2 responsable chez certains sujets d'une hyperlipidémie de type III [4]. Les lipoprotéines qui s'accumulent dans le plasma de ces individus ne peuvent se fixer au LSR [14]. Par ailleurs l'hyperlipidémie de type III ne se développe que chez moins de 10 % des sujets présentant un phénotype E2/2 [3]. Les facteurs déclenchants de cette forme d'hyperlipidémie sont l'excès de poids, le diabète, la consommation d'alcool et l'hypothyroïdie. Enfin l'hyperlipidémie de type III rétrocede souvent rapidement après un régime hypocalorique. Dans cette perspective il est particulièrement important d'analyser l'impact de la suralimentation, du diabète, de la consommation d'alcool et des hormones thyroïdiennes sur l'expression et l'activité du LSR.

LSR à l'origine d'une hypothèse subversive ?

La caractérisation des propriétés du LSR et le clonage de son gène nous amènent à remettre en question le paradigme qui prévaut quant aux mécanismes et aux sites d'épuration de triglycérides absorbés par l'intestin après le repas. Il est admis que la plus grande part de quelque 100 g de lipides alimentaires absorbés chaque jour par les sujets normaux subissent une hydrolyse par la LPL [22, 32]. Cette enzyme est localisée principalement au niveau des muscles et du tissu adipeux. Les produits de cette lipolyse sont ciblés vers ces tissus où ils sont utilisés ou mis en réserve. Le rôle du foie dans le processus d'épuration des graisses alimentaires était considéré comme accessoire. En effet, seul les résidus de chylomicrons qui ont perdu une partie importante de leur charge en triglycérides se fixent au LDL récepteur ou à la LRP. La découverte du LSR et la caractérisation de son affinité optimale pour les particules riches en triglycérides impose une révision de ce modèle. En effet, le processus d'endocytose hépatique des chylomicrons représente une étape quantitativement importante de l'épuration de ces particules et donc des triglycérides alimentaires.

C'est dans cette perspective que nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle un défaut d'épuration des lipides par le foie devait être compensé par une augmentation de la contribution relative des tissus périphériques. La part réservée aux muscles est déterminée par leurs besoins énergétiques. Cet énoncé n'est satisfaisant que si l'individu est entraîné et fourni régulièrement un effort physique prolongé. Il n'en va pas de même pour le tissu adipeux qui est capable d'accumuler des quantités importantes de lipides. Outre l'inconvénient esthétique que cela entraîne, l'augmentation de la masse grasse n'est pas sans conséquences au niveau métabolique. Cela résulte du fait que les adipocytes représente plus que de simples cellules de stockage [23]. Ils produisent en effet une série de protéines qui jouent des rôles régulateurs essen-

tiels de nombreux systèmes. Parmi celles-ci, on retiendra particulièrement la leptine impliquée dans la régulation de l'appétit [24] et le *tumor necrosis factor* dont dans le rôle dans la pathogénie du diabète de type II est de mieux en mieux établi [25].

Un déséquilibre de la répartition des lipides alimentaires entre le foie et le tissu adipeux est donc susceptible d'entraîner une surcharge pondérale. Chez la souris, la leptine s'est révélée un puissant activateur de l'activité LSR augmentant la contribution du foie au processus d'épuration et diminuant de façon importante l'amplitude de la réponse lipémique postprandiale [26]. Cet effet de la leptine survient indépendamment de son récepteur déficient dans les souris db/db. Les mécanismes précis de cet effet régulateur de la leptine sur l'activité LSR sont en cours d'évaluation.

La démonstration définitive du rôle physiologique du LSR ne peut être attendue que des études génétiques réalisées chez l'homme et la souris [27]. Il est important de définir si une anomalie du gène de LSR induit l'hypertriglycéridémie, signe cardinal du syndrome plurimétabolique qui affecte de nombreux sujets obèses ■

Bernard E. Bihain
Frances T. Yen

Genset Corporation, 875 Prospect Street, Suite 206, La Jolla, CA 92037, États-Unis.
E-mail: bihainb@gensy.com

Remerciements

Ce travail a été en partie réalisé dans l'Unité Inserm U.391, grâce au soutien de l'Inserm, du Conseil régional de Bretagne et de la société Genset.

RÉFÉRENCES

- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. « The Molecular Basis of Inherited Disease ». 1995, p. 1981-2030, McGraw-Hill, New York.
- Nagata Y, Chen J, Cooper AD. Role of low density lipoprotein receptor-dependent and -independent sites in binding and uptake of chylomicron remnants in rat liver. *J Biol Chem* 1988; 263: 15151-8.
- Mahley RW, Rall Jr SC. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. « The Molecular Basis of Inherited Disease ». 1995, p. 1953-1980, McGraw-Hill, New York.
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 1989; 341: 162-4.
- Beisiegel U, Weber W, Havinga JR, Ihrke G, Hui DY, Wernette-Hammond ME, Turck CW, Innerarity TL, Mahley RW. Apolipoprotein E-binding proteins isolated from dog and human liver. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 288-97.
- Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Ann Rev Biochem*. 1994; 63: 601-37.
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 1990; 265: 17401-4.
- Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5810-4.
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res* 1992; 269: 375-82.
- van Dijk MC, Ziere GJ, Boers W, Linthorst C, Bijsterbosch MK, van Berkel TJ. Recognition of chylomicron remnants and beta-migrating very-low-density lipoproteins by the remnant receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver alpha2-macroglobulin-recognition site. *Biochem J* 1991; 279: 863-70.
- Rohlfmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest* 1998; 101: 689-95.
- Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* 1994; 264: 1471-4.
- Bihain BE, Yen FT. Free fatty acids activate a high-affinity saturable pathway for degradation of low-density lipoproteins in fibroblasts from a subject homozygous for familial hypercholesterolemia. *Biochemistry*. 1992; 31: 4628-36.
- Yen FT, Mann CJ, Guermani LM, et al. Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *Biochemistry* 1994; 33: 1172-80.
- Troussard AA, Khallou J, Mann CJ, et al. Inhibitory effect on the lipolysis-stimulated receptor of the 39-kDa receptor-associated protein. *J Biol Chem* 1995; 270: 17068-71.
- Mann CJ, Troussard AA, Yen FT, et al. Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 31348-54.
- Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 472-84.
- Mann CJ, Khallou J, Chevreuril O, et al. Mechanism of activation and functional significance of the lipolysis-stimulated receptor. Evidence for a role as chylomicron remnant receptor. *Biochemistry* 1995; 34: 10421-31.
- Yen FT, Masson M, Clossais-Besnard N, et al. Molecular cloning of a lipolysis stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J Biol Chem* 1999 (sous presse).
- Attie AD, Pittman RC, Steinberg D. Hepatic catabolism of low density lipoprotein: mechanisms and metabolic consequences. *Hepatology* 1982; 2: 269-81.
- Hoeg JM, Demosky SJ Jr, Lackner KJ, Osborne JC Jr, Oliver C, Brewer HB Jr. The expressed human hepatic receptor for low-density lipoproteins differs from the fibroblast low-density lipoprotein receptor. *Biochim Biophys Acta* 1986; 876: 13-21.
- Vilaro S, Ramirez I, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T, Llobera M. Lipoprotein lipase in liver. Release by heparin and immunocytochemical localization. *Biochim Biophys Acta* 1988; 959: 106-17.
- Ailhaud G. Secretory function of the adipocyte. *Journ Annu Diabetol Hôtel Dieu*. 1997; 125-9.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-70.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Hotamisligil GS. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 1998; 139: 4832-8.
- Khallou J, Troussard AA, Yen FT, et al. Correction of delayed postprandial plasma lipid response in genetically obese mice by injection of recombinant leptin. *Circulation* 1994; 1-37 (abstract).
- Bihain BE, Yen FT. The lipolysis stimulated receptor: a gene at last. *Curr Opin Lipid* 1998; 9: 221-4.

TIRÉS À PART

B.E. Bihain.