

## La clusterine : une nouvelle glycoprotéine protectrice de l'intégrité cellulaire ?

La clusterine, une glycoprotéine hétérodimérique de 80 kDa, a une très large distribution chez les animaux supérieurs. La clusterine a été associée à des phénomènes physiologiques tels que les interactions cellule-cellule, la sécrétion, la régulation du complément et le transport des lipides. Une forte induction de son taux d'expression est observée pendant la neurodégénérescence et lors de diverses maladies rénales. De ce fait, elle pourrait être utilisée comme un marqueur clinique de la présence de lésions tissulaires. Sa propriété anti-lytique vis-à-vis du complément et sa capacité de se lier à des lipides ou à des molécules hydrophobes lui confèrent un rôle de protection de la membrane cellulaire. En outre, elle pourrait préserver la cellule de la suractivation du complément et maintenir l'intégrité de la membrane cellulaire ou des peptides biologiques dans les vésicules de sécrétion dans des situations normales et pathologiques.

Chantal Rabenandrasana  
Paméla Ramsohoye

**A**u cours des dix dernières années, plusieurs équipes de recherche en biologie de la reproduction, biologie du développement, immunologie, neurobiologie et oncologie ont caractérisé et isolé la clusterine. C'est ainsi que plus d'une dizaine de noms et synonymes ont été donnés à cette molécule suivant le système d'étude et les conditions expérimentales utilisées (Tableau I).

En 1983, la clusterine a été purifiée pour la première fois à partir du fluide testiculaire de bélier [1]. Cette molécule représente la glycoprotéine majoritaire du fluide testiculaire. Elle a été caractérisée alors comme un inducteur d'agrégation *in vitro*

de divers types cellulaires. SGP-2 ou *sulfated glycoprotein-2* est la molécule équivalente de la clusterine chez le rat. Elle est également le produit majoritaire de sécrétion des cellules de Sertoli de rat en culture [2]. SP40,40 et CLI (*complement lysis inhibitor*) sont les protéines homologues purifiées à partir du sérum humain et caractérisées comme inhibitrices de la lyse provoquée par le complément [3, 4]. Apo J et NA1/NA2 ont été identifiées comme apolipoprotéines du sérum humain impliquées dans le transport des lipides [5, 6]. La molécule gp80 a été mise en évidence au niveau du pôle apical des cellules épithéliales de rein de chien [7] et GpIII et HISL-19 sont des composants des granules de

### ADRESSES

C. Rabenandrasana : *maître de conférences*, département de Biochimie des glycoconjugués et lectines endogènes, centre de biophysique moléculaire, Cnrs et université d'Orléans, 1, rue Haute, 45071 Orléans Cedex 02, France.

P. Ramsohoye : *chercheur post-doctoral*, Institute of animal physiology and genetic research-Cambridge Research Station, Babraham, Cambridge CB2, 4AT, Royaume-Uni.

sécrétion de cellules chromaffines et neuroendocriniennes [8-10]. Ce n'est qu'à partir du moment où la séquence partielle de la protéine purifiée et/ou la séquence des ADNc correspondants ont été connues que ces équipes se sont aperçues qu'elles avaient, en fait, caractérisé des protéines et des transcrits analogues.

A côté de ces différentes protéines homologues de la clusterine, les nouvelles techniques de biologie moléculaire ont permis l'isolement de transcrits dont l'expression se trouve augmentée en réponse à certaines conditions pathologiques. TRPM-2 (*testosterone repressed prostate messenger-2*) a son expression augmentée après castration hormonale ou chirurgicale chez le rat [11]; T64 est surexprimé par les cellules de la neurorétine de la caille après transformation cellulaire par une infection rétrovirale [12]. Dans des conditions pathologiques du système nerveux, deux autres transcrits ont été isolés: pADHC-9 dont l'expression est augmentée dans la maladie d'Alzheimer [13] et pTB16 surexprimé dans les gliomes humains et les foyers épileptiques [14].

On peut, aujourd'hui, faire la synthèse des connaissances concernant la structure, l'expression et les fonctions potentielles de la cluste-

rine dans l'organisme. Pour simplifier, nous avons décidé d'utiliser le terme « clusterine » pour désigner la protéine, quelle que soit l'espèce moléculaire analogue considérée dans la suite de notre exposé.

## Structure et synthèse

### Structure du gène

Le gène de la clusterine, d'une longueur de 20 kb environ, est présent en une seule copie par génome [15, 16]. Il est localisé sur la région p12-21 du chromosome 8 chez l'homme [17] et sur le chromosome 14 chez la souris [16]. Généralement, le gène est constitué de 9 exons. L'exon II fournit la partie correspondant au peptide signal. Les exons III à VIII codent pour la protéine précurseur (*figure 1A*). Des ADNc correspondant au gène de la clusterine du rat [2], de l'homme [5], de la souris [16] et de la caille [12] ont été isolés. La comparaison des séquences d'acides aminés déterminées à partir de ces ADNc a révélé, même entre espèces éloignées, des domaines de séquences fortement conservés.

Les études de l'organisation génomique de TRPM-2 [18] et de T64 [19] ont démontré la présence d'un seul point d'initiation transcriptionnel et

de domaines de fixation d'éléments régulateurs conventionnels (sites de liaison à des complexes AP-1 et AP-2, une séquence PUR et une CCATT *box* et des éléments Hsp). Ce gène de la clusterine est transcrit en un ARNm de 2 kb qui code en tandem pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  non clivées formant la protéine précurseur.

### Caractéristiques biochimiques et structurales

La forme précurseur de la clusterine est composée de 427 à 449 résidus d'acides aminés. Son peptide signal comporte une vingtaine de résidus d'acides aminés. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  non glycosylées ont une masse moléculaire moyenne de 25 à 28 kDa. Avant modifications post-traductionnelles, la masse moléculaire moyenne de la protéine est de 50 kDa. La maturation de cette protéine comporte un clivage protéolytique et des glycosylations. Le site interne de clivage est variable selon les espèces. Les sites de N-glycosylation sont en nombre variable selon l'espèce étudiée [2, 6, 7, 16]. Environ 25 % à 30 % du poids moléculaire de la protéine mûre (75 à 80 kDa) représentent les motifs sucrés fortement sulfatés.

Le pourcentage d'analogie de séquence pour les différentes espè-

Tableau I

### NOMS ET CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTES ESPÈCES MOLÉCULAIRES HOMOLOGUES DE LA CLUSTERINE

Sources	Espèces	Synonymes	Caractéristiques
Tractus génital	Bélier	clusterine	Agrégation cellulaire [1] Produit de sécrétion majeur des cellules de Sertoli [2]
	Souris	SGP-2	
Sérum	Rat	TRPM-2	Induction de l'expression associée à une apoptose des cellules [11] Régulation du complément [3, 4] Transport des lipides [5, 6]
	Homme	SP40, 40-CLI NA1/NA2-ApoJ	
Glandes endocrines	Bœuf	GpIII	Composant des granules chromaffines [8, 9] Marqueur de cellules neuroendocriniennes [10]
	Homme	HISL-19	
Système urinaire	Chien	gp80	Marqueur apical des cellules MDCK [7]
Système nerveux	Homme	pADHC-9 pTB6	Surexpression dans la maladie d'Alzheimer [13] Surexpression dans les gliomes malins [14] Expression induite suite à une infection rétrovirale des cellules [12]
	Oiseau	T64	

## RÉFÉRENCES

- Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* 1983; 12: 7714-20.
- Collard MW, Griswold MD. Biosynthesis of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochemistry* 1987; 26: 3297-303.
- Murphy BF, Kirsbaum L, Walker ID, d'Apice AJF. SP40,40 a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *J Clin Invest* 1988; 81: 1858-64.
- Jenne DE, Tschopp J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxic inhibitor found in plasma and seminal fluid: identity to sulfated glycoprotein-2, a constituent of rat testis fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7123-7.
- De Silva HV, Harmony JAK, Murphy B, D'Apice AJF, Classon B, Hudson P, Walker ID. Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry* 1990; 29: 5380-9.
- James RW, Hochstrasser AC, Borghini I, Martin B, Pomette D, Hochstrasser D. Characterization of a human high density lipoprotein-associated protein, NA1/NA2. Identity with SP40,40, an inhibitor of complement mediated cytotoxicity. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 645-52.
- Hartmann K, Rauch J, Urban J, Panczyk F, Diel P, Pilarsky C *et al.* Molecular cloning of the gp80, a glycoprotein complex secreted by kidney cells *in vitro* and *in vivo*. A link to the reproductive system and to the complement cascade. *J Biol Chem* 1991; 266: 9924-31.
- Fischer-Colbric R, Zangerle R, Freschen Schlager I, Weber A, Winkler H. Isolation and immunological characterization of a glycoprotein from adrenal chromaffin granules. *J Neurocytochem* 1984; 42: 1008-16.
- Palmer DJ, Christie DL. The primary structure of glycoprotein III from bovine adrenal medullary chromaffin. Sequence similarity with human serum protein 40,40 and rat Sertoli cell glycoprotein 2. *J Biol Chem* 1990; 265: 6617-23.
- Jenne DE, Tschopp J. Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 154-9.
- Leger CG, Montpetit ML, Tenniswood MP. Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 147: 196-203.

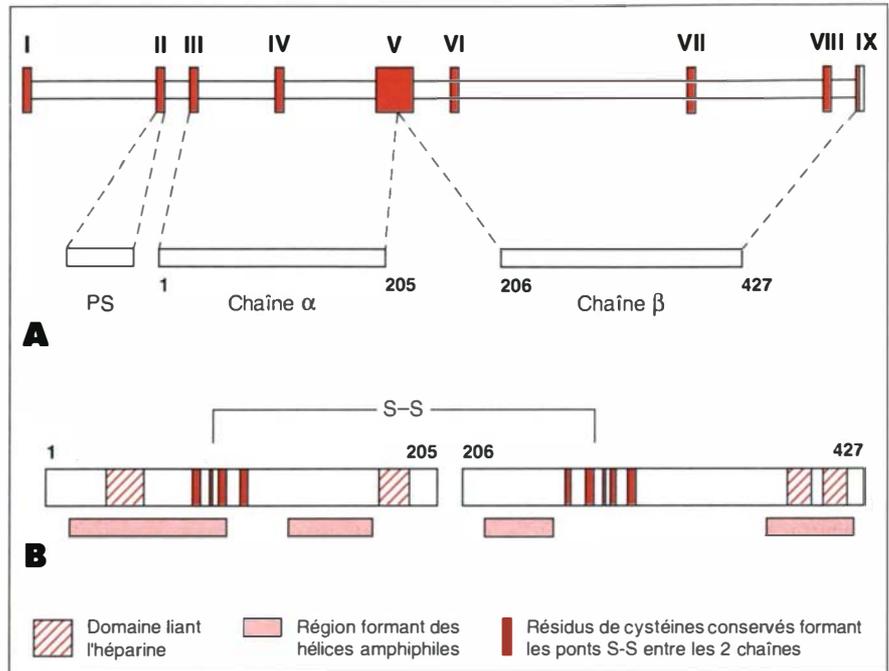


Figure 1. (Modifiée d'après [22]). **A. Représentation schématique de l'organisation génomique du gène de la clusterine.** Le gène de la clusterine humaine est composé de 9 exons. L'exon I correspond à la partie 5' non traduite. L'exon II fournit le peptide signal (PS). Les exons III à VIII codent, en tandem, les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Le codon stop TGA est placé 2 codons après le commencement de l'exon IX. **B. Structure schématique de la clusterine mûre.** Les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la clusterine sont reliées par des ponts disulfures formés par les résidus cystéines (-S-S-). La position des domaines fonctionnels, correspondant aux régions liant l'héparine et à celles susceptibles de former des hélices amphiphiles, est indiquée sur chaque chaîne.

ces moléculaires connues est présenté sur le *Tableau II*, en prenant comme référence la clusterine humaine. Le plus fort degré de conservation se trouve dans la région comprise entre les résidus 105-135 pour laquelle 98 % d'analogie est observée. Des régions présentant des fonctions potentielles sont fortement conservées: les régions riches en cystéines, des domaines capables de lier l'héparine, et les régions pouvant former des hélices amphiphiles (*figure 1B*).

Une séquence contenant cinq résidus de cystéine, tous impliqués dans la formation de ponts disulfures reliant les deux chaînes, est fortement conservée dans les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . La région située entre les résidus 75-98 possède des analogies avec le motif thrombospondine de type I, riche en cystéine des protéines C7, C8, C9, composants du complexe lytique terminal du com-

plément [10]. Quatre autres régions composées de résidus d'acides aminés chargés positivement possèdent des séquences similaires à la séquence consensus du domaine liant l'héparine [16]. Bien que le rôle de ces séquences ne soit pas défini dans le cas de la clusterine, leur importance dans la fonction d'autres molécules est maintenant bien établie. Notamment, leur implication dans les interactions avec les composants de la matrice extracellulaire tels que les protéoglycans. La structure secondaire, déduite de la séquence linéaire de résidus d'acides aminés, montre la possibilité de former des hélices  $\alpha$  qui peuvent donner des hélices amphiphiles. En effet, des analogies de séquence avec des apolipoprotéines possédant des domaines en hélices  $\alpha$  ont été rapportées. Pour l'apolipoprotéine J, analogue de la clusterine caractérisée dans le plasma humain, des

Tableau II

POURCENTAGE D'ANALOGIE DE SÉQUENCE DES DIVERSES ESPÈCES MOLÉCULAIRES DE LA CLUSTERINE COMPARÉES A LA CLUSTERINE HUMAINE (D'après [36])

	Chien	Rat	Souris	Bœuf	Caille
Homme	78	77	77	72	49

hélices amphiphiles ont été identifiées au niveau de la région 150-167 dans la chaîne  $\alpha$  et au niveau de la région 221-237 et 401-418 dans la chaîne  $\beta$  [5]. Ces motifs sont retrouvés dans toutes les apolipoprotéines et sont responsables de l'interaction de ces molécules avec les phospholipides [16]. Le motif localisé à l'extrémité N-terminale de la chaîne  $\alpha$  pourrait être responsable de la dimérisation par interaction *coiled-coil* ou de la capacité de la clusterine à s'agréger [10].

### Implications fonctionnelles de la clusterine

#### Sécrétion endocrine

Dans les cellules à forte activité sécrétoire telles que les cellules chromaffines ou les cellules neuroendocriniennes, la clusterine a été identifiée dans les vésicules de sécrétion. Le groupe de Fischer-Colbrie [8] a caractérisé la glycoprotéine GpIII dans les granules des cellules chromaffines, dans les vésicules de sécrétion des cellules hypophysaires et des cellules thyroïdiennes. Par l'étude de la séquence primaire à partir du clone d'ADNc, on s'est aperçu que cette GpIII est en fait l'analogue de la clusterine pour l'espèce bovine [9]. Cette glycoprotéine est présente sous une forme majoritairement soluble, mais elle est également associée à la membrane des vésicules. Elle est relarguée dans le milieu après stimulation des cellules par l'acétylcholine. A l'aide d'un anticorps dirigé contre GpIII, on a pu suivre, après exocytose, le recyclage des membranes des granules de chromaffines qui retournent vers l'appareil de Golgi et seront réutilisées dans la formation de nouveaux granules [9]. GpIII pourrait contribuer à la structure interne de ces granules et au

fonctionnement et/ou au déroulement du cycle d'exocytose-endocytose. Comparée aux autres espèces moléculaires analogues, la GpIII a une glycosylation particulière et complexe avec des motifs poly-N-acétyllactosaminyl [20]. Actuellement, il est bien établi que de tels motifs sont impliqués dans des mécanismes régulateurs mis en jeu durant le développement [21]. Quel rôle pourraient-ils jouer dans le phénomène de l'exocytose ?

Un marqueur immunocytochimique de cellules neuroendocriniennes HISL-19 ou sécrétogranine IV a été également décrit comme un analogue de la clusterine [10]. La sécrétogranine IV fait partie de la famille des granines. Les chromogranines ou sécrétogranines sont des protéines acides intervenant dans la sécrétion et utilisées comme marqueurs de cellules endocrines d'origine nerveuse. Ces sécrétogranines sont généralement impliquées dans la stabilisation des hormones peptidiques ou encore dans la facilitation de leur sécrétion.

La sécrétion de la clusterine a été étudiée en détail sur les cellules de la lignée épithéliale rénale de chien MDCK. Ces cellules peuvent se différencier en culture en formant une monocouche polarisée et étanche. Elles expriment l'analogue gp80 de la clusterine. Cette molécule est triée et sécrétée d'une façon vectorielle vers leur pôle apical [7]. Contrairement au cas des cellules MDCK, la sécrétion vectorielle de la clusterine est orientée vers le domaine basolatéral des cellules HepG2 d'hépatome humain [16]. Cette différence de tri pourrait être expliquée, soit par la différence de machinerie de sécrétion des deux types cellulaires, soit par les rôles différents joués par la clusterine dans ces deux systèmes, compte tenu des fonctions spécifiques de ces cellules.

#### Régulation du complément

La clusterine partage avec d'autres protéines plasmatiques, telles que la vitronectine et les apolipoprotéines A-1 et A-2, la capacité d'inhiber la lyse provoquée par le complément. Le complément est un système de défense contre les agents bactériens ou les processus inflammatoires, composé d'une vingtaine de protéines plasmatiques qui agissent en cascade. La phase terminale de la cascade aboutit à la formation d'un complexe macromoléculaire : le complexe d'attaque membranaire (MAC : *membrane attack complex*) qui, inséré dans la membrane plasmique, forme des pores entraînant la lyse de la cellule cible (pour revue voir [22]).

Purifiées à partir du plasma humain, CLI et SP40,40 ont été caractérisées pour leur capacité à inhiber *in vitro* la lyse des érythrocytes provoquée par le complément [3, 4]. La clusterine, comme la vitronectine, peut, en se liant au complexe C5b-7, l'empêcher de se fixer à la membrane plasmique et entraîner la formation d'un nouveau complexe clusterine-C5b-7 soluble. L'addition séquentielle des composants ultérieurs (C8 et C9) n'est pas affectée par la liaison de la clusterine. Comme pour le complexe formé avec la vitronectine, le complexe macromoléculaire final C5b-9-clusterine n'est pas cytolytique. Des résultats récents montrent que la clusterine est capable d'intervenir sur la phase tardive de la lyse enclenchée par C5b-7. Elle peut inhiber la lyse en interagissant avec les complexes C5b-8 et C5b-9.

L'inhibition de la lyse par le complément peut être inversée par la présence de dérivés synthétiques de la carnitine, une molécule plasmatique impliquée dans le transfert des acides gras (Rabenandrasana *et al.*, manuscrit en préparation).

## RÉFÉRENCES

12. Michel D, Gillet G, Volovitch M, Pescas B, Calothy G, Brun G. Expression of a novel gene encoding a 51.5 kD precursor protein is induced by different retroviral oncogenes in quail neuroretinal cells. *Oncogene Res* 1989; 4: 127-36.
  13. May PC, Lampert-Etchells M, Johnson SA, Poirier J, Masters JN, Finch CE. Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron* 1990; 5: 831-9.
  14. Danik M, Chabot JG, Mercier C, et al. Human gliomas and epileptic foci express high levels of a mRNA related to rat testicular sulfated glycoprotein 2, a proposed marker of cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88; 8577-81.
  15. Slawin K., Sawczuck IS, Olsson CA, Buttyan R. Chromosomal assignment of the human homologue encoding SGP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 160-4.
  16. Purello M, Betuzzi S., Dipietro C. The gene for SP40,40, human homolog of rat SGP-2, rat clusterin and rat TRPM-2 maps to chromosome 8. *Genomics* 1991; 10: 151-6.
  17. Fink TM, Zimmer M, Tschopp J, Étienne J, Jenne DE, Lichter P. Human clusterin (CL) maps to 8p21 in proximity to the lipoprotein lipase (LPL) gene. *Genomics* 1993; 16: 526.
  18. Wong P, Pineault J, Lakins J, Taillefer D, Leger J, Wang C, Tenniswood M. Genomic organization and expression of rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis. *J Biol Chem* 1993; 268: 5021-31.
  19. Herault Y, Chatelain G, Brun G, Michel D. V-src induced transcription of the avian clusterin gene. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 6377-83.
  20. Margolis RU, Fischer-Colbrie R, Margolis R. Poly(N-acetyllactosaminyl) oligosaccharides of chromaffin granule membrane glycoprotein. *J Neurocytochem* 1988; 51: 1819-23.
  21. Kobota A. Structures and functions of sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem* 1992; 209: 483-501.
  22. Muller-Eberhard HJ. Molecular organization and function of the complement system. *Ann Rev Biochem* 1988; 57: 321-47.
  23. Fritz IB, Murphy B. Clusterin: insight into a multifunctional protein. *Trends Endocrin Metab* 1993; 4: 41-5.
  24. Fritz IB. What is clusterin? *Clin Exp Immunol* 1992; 88: 375.
  25. Golstein P. Mort programmée et terrain cellulaire. *médecine/sciences* 1991; 7: 681-7.
- La clusterine est, à côté de la vitronectine et du complexe C5b-9, un des composants des complexes solubles du sérum. Dans les glomérulonephrites, ces complexes forment les dépôts localisés au niveau des glomérules membranaires. La clusterine s'associe préférentiellement avec les dépôts contenant des immunoglobulines, et se fixe aussi bien au fragment Fc qu'au fragment Fab des immunoglobulines [23]. L'ensemble de ces résultats suggère que la clusterine pourrait jouer un rôle de compensation contre les actions dommageables des immunoglobulines et du complément produits en quantité excessive en réponse à certaines conditions pathologiques.
- ### Lésions cellulaires
- Les transcrits TRPM-2, pADH-19, PTB16 ont été isolés grâce à l'augmentation de leur expression dans des situations particulières. Cette modulation de l'expression de la clusterine a été observée principalement dans le cas d'apoptose ou mort cellulaire programmée. Les agents susceptibles de déclencher cette mort cellulaire peuvent être variés. Des modèles *in vitro* ont été établis pour étudier ce processus complexe (pour revue, voir [24, 25]). La castration chirurgicale ou hormonale est largement utilisée pour l'étude des gènes dont l'expression est spécifiquement réprimée en présence des androgènes. La prostate est un exemple typique d'organe dont le fonctionnement et le maintien de l'intégrité dépendent de la présence d'androgène circulant. La castration entraîne une involution de la partie ventrale de la prostate par rapport à la quantité observée chez le rat non castré, accompagnée de la mort des cellules de l'épithélium. Dans ces conditions, l'expression de plusieurs gènes se trouve anormalement élevée. Parmi ceux-ci, TRPM-2, analogue de la clusterine, voit son expression multipliée par dix-sept dans la région ventrale de la prostate [11]. Cette augmentation est progressive et s'observe durant les quatre jours qui suivent la castration. Un traitement par la dihydrotestostérone l'abolit, confirmant ainsi le contrôle hormonal de l'expression de ce gène [26]. Chez le rat non castré, la protéine correspondant à TRPM-2 est exprimée uniquement dans les cellules du segment proximal de la prostate. La privation d'androgène entraîne une dégénérescence des cellules de la portion distale qui, normalement, prolifèrent chez le rat non castré. De façon concomitante, ces cellules se mettent à synthétiser la clusterine [27]. Comme la prostate, l'utérus est un organe dont le fonctionnement est sous contrôle hormonal. Son fonctionnement est strictement lié à la présence des hormones œstrogènes produites par les ovaires. L'ovariectomie entraîne, elle aussi, une forte induction de l'expression de la clusterine dans l'utérus [26]. L'apoptose des splénocytes ou des thymocytes peut être déclenchée par un traitement de la rate ou du thymus par des glucocorticoïdes. Chez le rat, une surexpression de la clusterine par ces cellules survient dans les trente minutes suivant un traitement *in vivo* à la dexaméthasone [28]. Cette augmentation du taux d'expression de la clusterine précède la fragmentation de l'ADN, événement précoce de la mort cellulaire programmée. Une accumulation d'ARNm de la clusterine a été observée en association avec des lésions rénales. Des modèles de lésion hydrostatique rénale produite par obstruction urétérale unilatérale ont été établis chez le rat et le lapin [29]. Une forte accumulation du messager suivie d'une augmentation de la quantité de clusterine correspondante ont été observées dans les tubules, les canaux et les urines excrétées. La dégradation rénale, manifestée par la perte de la fonction de concentration, est temporellement associée à l'accumulation de la clusterine. Le taux d'ARNm pourrait donc être utilisé comme marqueur fiable d'un traumatisme hydrostatique rénal. Dans les lésions néphrotoxiques ou ischémiques, l'expression de la clusterine est principalement le fait des zones présentant des cellules en apoptose ou extrêmement endommagées [29]. Les diverses situations rapportées dans ce paragraphe suggèrent fortement que