



HAL
open science

Protéines du choc thermique (HSP70, HSP27) et tumeurs

Mélanie Pommier

► **To cite this version:**

Mélanie Pommier. Protéines du choc thermique (HSP70, HSP27) et tumeurs. Sciences pharmaceutiques. 2000. dumas-01261342

HAL Id: dumas-01261342

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01261342>

Submitted on 25 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

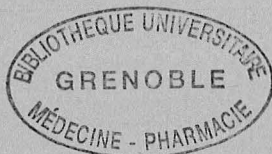


1^{er} exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

ANNEE : 2000

N° D'ORDRE : 7006



**PROTEINES DU CHOC THERMIQUE
(HSP70, HSP27) ET TUMEURS**

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE

DIPLOME D'ETAT

POMMIER Mélanie

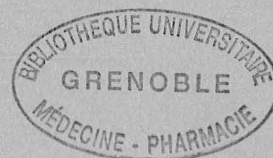
Née le 28 janvier 1975

A Saint-Martin d'Hères

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 31 JANVIER 2000, à 11 heures,

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Mademoiselle le Docteur GUIRAUD P., Maître de Conférence des
Universités (H.D.R.) Président du jury,
Madame le Docteur RICHARD M.-J., Praticien Hospitalier,
Monsieur le Docteur DROUET C., MCU-PH Immunologie,
Monsieur le Docteur BROQUET D., Pharmacien d'Officine.

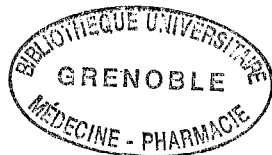


La réponse au choc thermique est une réponse cellulaire physiologique, consécutive à une élévation de la température mais aussi à de nombreux autres types de stress cellulaires. Elle se traduit par la transcription de gènes spécifiques permettant la synthèse de protéines *heat shock* ou HSP. Ces protéines exercent des fonctions essentielles à la vie cellulaire et plus encore à la survie lors de stress. Cette étude présente les connaissances actuelles se rapportant aux protéines HSP70 et HSP27, sur le plan de leur structure, leur synthèse, leurs fonctions, les relations existant entre ces protéines et la maladie cancéreuse, ainsi que l'intérêt et les limites qu'elles représentent en matière de thérapie anticancéreuse. La découverte d'une présence HSP70 à la surface des cellules tumorales, laisse envisager une intervention de la protéine sur un plan immunologique. Elle semble également intervenir dans le processus même de prolifération des cellules cancéreuses, par sa capacité d'interaction avec les produits de l'oncogène *c-myc* ou du gène suppresseur de tumeur *p53*. Enfin, les taux d'expression d'HSP70 et d'HSP27 pourraient représenter des facteurs pronostiques du devenir de certains cancers. En matière de thérapie anticancéreuse, l'utilisation de certaines protéines HSP a été proposée. Qu'il s'agisse de cellules tumorales transfectées par un gène *HSP* étranger, ou d'une utilisation de complexes HSP/peptides tumoraux, l'intérêt de la technique repose sur une stimulation de l'immunité naturelle de l'hôte, dans le but de permettre le développement d'une réponse antitumorale spécifique. Enfin, les HSP sont capables de limiter la portée de certains traitements anticancéreux. L'hyperthermie peut être limitée par une synthèse HSP et le développement d'une thermotolérance. De même, des taux intracellulaires élevés d'HSP favorisent le développement d'une résistance des cellules vis-à-vis des effets cytotoxiques de certaines molécules anticancéreuses.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

ANNEE : 2000

N° D'ORDRE :



**PROTEINES DU CHOC THERMIQUE
(HSP70, HSP27) ET TUMEURS**

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE

DIPLOME D'ETAT

POMMIER Mélanie

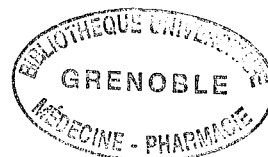
Née le 28 janvier 1975

A Saint-Martin d'Hères

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 31 JANVIER 2000, à 11 heures,

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Mademoiselle le Docteur GUIRAUD P., Maître de Conférence des
Universités (H.D.R.) Président du jury,
Madame le Docteur RICHARD M.-J., Praticien Hospitalier,
Monsieur le Docteur DROUET C., MCU-PH Immunologie,
Monsieur le Docteur BROQUET D., Pharmacien d'Officine.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

<i>ALARY</i>	<i>Josette</i>	<i>Chimie Analytique</i>
<i>BAKRI</i>	<i>Abdelaziz</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>
<i>BENOIT-GUYOD</i>	<i>Jean-Louis</i>	<i>Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie</i>
<i>CALOP</i>	<i>Jean</i>	<i>Pharmacie Clinique et Bio-technique</i>
<i>CUSSAC</i>	<i>Max</i>	<i>Chimie Thérapeutique</i>
<i>DECOUT</i>	<i>Jean-Luc</i>	<i>Chimie Générale</i>
<i>DEMENGE</i>	<i>Pierre</i>	<i>Physiologie/Pharmacologie</i>
<i>DROUET</i>	<i>Emmanuel</i>	<i>Microbiologie-Immunologie</i>
<i>FAVIER</i>	<i>Alain</i>	<i>Biochimie</i>
<i>GOULON</i>	<i>Chantal</i>	<i>Physique-Pharmacie</i>
<i>GRILLOT</i>	<i>Renée</i>	<i>Parasitologie</i>
<i>LECLERC</i>	<i>Gérard</i>	<i>Chimie Organique</i>
<i>MARIOTTE</i>	<i>Anne-Marie</i>	<i>Pharmacognosie</i>
<i>RIBUOT</i>	<i>Christophe</i>	<i>Physiologie-Pharmacologie</i>
<i>ROUSSEL</i>	<i>Anne-Marie</i>	<i>Biochimie</i>
<i>SEIGLE-MURANDI</i>	<i>Françoise</i>	<i>Botanique et Cryptogamie</i>
<i>STEIMAN</i>	<i>Régine</i>	<i>Biologie Cellulaire</i>
<i>WOUESSIDJEW</i>	<i>Denis</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Madame RICHARD M.-J., Praticien Hospitalier, pour sa contribution à l'élaboration de cette thèse et pour ses conseils.

Je remercie également les membres du jury :

Mme Mlle GUIRAUD P., Maître de conférence des Universités (H.D.R.),

M. DROUET C., MCU-PH Immunologie,

M. QUET D., Pharmacien d'Officine,

et je les remercie également pour leur présence lors de la soutenance de cette thèse.

Je tiens également à remercier toute ma gratitude à mes parents qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mon parcours, à leur aide dans la réalisation matérielle de mon étude, à Thomas et à Aurélie pour leur patiente lecture et leurs conseils, à Stéphane pour son soutien moral et ses encouragements.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
CHAPITRE 1	12
1re PARTIE : L'HSP70	13
I - Structure des HSP70	14
I.1 Les différentes HSP70 procaryotes et eucaryotes	14
I.2 Structure primaire des HSP70	14
I.3 Structure tertiaire	15
I.4 L'activité ATPase	16
I.5 Changements conformationnels et oligomérisation	17
II - Synthèse des HSP70	18
II.1 Structure des HSF	18
II.2 Les éléments du choc thermique (HSE)	21
II.3 Interaction entre HSF et HSE	21
II.4 Les gènes du choc thermique, non induits hors des conditions de stress, font l'objet d'une «préparation» particulière, permettant l'obtention d'une réponse rapide, lors de la survenue d'une situation de stress	22
II.4.1 En l'absence de stress	23
II.4.2 En situation de stress (par exemple un choc thermique)	24
III - Régulation de la synthèse des HSP70	25
III.1 Représentation schématique des différentes conditions environnementales et physiologiques capables d'induire une expression des gènes du choc thermique	25
III.2 Notion d'activation des différents facteurs de transcription du choc thermique, en réponse à des phénomènes physiologiques distincts	26
III.3 Les différents HSF peuvent être simultanément activés au sein de la cellule	28
III.4 Les protéines du choc thermique semblent elles-mêmes intervenir dans un processus d'autorégulation des HSF	29
III.5 Les HSF font l'objet d'une régulation rédox	31
III.6 Vieillesse et réponse transcriptionnelle au choc thermique	34
IV - Rôles des HSP70, en tant que chaperons moléculaires, dans le repliement des protéines	36
IV.1 Problème d'un repliement correct des polypeptides nouvellement synthétisés au sein du milieu cellulaire	36
IV.2 Importance du rôle de l'ATP	37
IV.3 L'interaction HSP70/protéine substrat fait intervenir, chez les deux partenaires, des séquences d'acides aminés hydrophobes	38
IV.4 Les facteurs dits de «coopération»	38

IV.5 Hypothèse de mécanisme du repliement protéique faisant intervenir une coopération DnaK, DnaJ, GrpE .	40
V - Rôle des HSP70, en tant que chaperons moléculaires, dans la translocation des protéines à travers les membranes subcellulaires	41
V.1 La mitochondrie .	42
V.1.1 La plupart des protéines mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol	42
V.1.2 Les protéines mitochondriales présentent une conformation particulière au cours de la translocation membranaire	42
V.1.3 Une chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée et destinée à la mitochondrie peut être «préparée» à la translocation de différentes manières .	43
V.1.4 Rôle de facteurs cytoplasmiques de ciblage ?	44
V.1.5 Mécanisme de la translocation	45
V.2 Le reticulum endoplasmique .	46
V.2.1 Notion de translocation co et post-traductionnelle ; rôle d'une HSC70	47
V.2.2 Les facteurs impliqués dans la translocation protéique post-traductionnelle à travers les membranes du RE (chez la levure)	47
V.2.3 Hypothèse de mécanisme pour cette translocation intraréticulaire, toujours chez la levure	49
VI - Rôle des HSP70 dans la protection des cellules soumises à un choc thermique	51
VI.1 Prise en charge des protéines altérées	51
VI.2 Prévention de l'apoptose	51
VI.2.1 Présentation du processus apoptotique et d'un rôle probable des HSP70 dans la prévention de certains phénomènes protéolytiques .	51
VI.2.2 HSP70, apoptose et mitochondrie	54
VII - Rôle des HSP70 dans la dégradation protéique intracellulaire (Sherman et al 1996).	56
VII.1 La dégradation des protéines au sein des procaryotes et des mitochondries	57
VII.1.1 Au sein des procaryotes	57
VII.1.2 Au sein de la mitochondrie	59
VII.2 Le rôle des chaperons dans la dégradation des protéines chez les eucaryotes	59
VII.3 Rôle de la protéine Bip dans la protéolyse au sein du réticulum endoplasmique, chez les mammifères	61
VIII - Rôle des HSP70 dans la protéolyse lysosomale .	62
2e PARTIE : L'HSP27	64
I - Les sHSP : approche génique et structurale	65
I.1 Localisation et structure du gène HSP27 .	65
I.2 Structure de la protéine HSP27 .	66
II - Expression des sHSP .	66
II.1 Expression des sHSP lors d'un stress	66
II.2 Expression des sHSP au sein de cellules non stressées	67
III - Localisation cellulaire et propriétés biochimiques des sHSP	68
III.1 Au sein de cellules non stressées .	68
III.2 Au sein de cellules stressées .	68
III.3 Notion de phosphorylation .	69
III.4 Régulation de la phosphorylation .	70

III.5 Acylation (Benndorf <i>et al.</i> 1997)	71
III.6 Dimérisation d'HSP27 à la suite d'un stress oxydatif	71
IV - Rôles des sHSP	72
IV.1 Au sein de cellules non stressées	72
IV.1.1 Modulation du processus apoptotique cellulaire .	72
IV.1.2 Interaction avec les microfilaments d'actine .	73
IV.2 Au sein de cellules soumises à un stress	75
IV.2.1 Recouvrement des fonctions de transcription et de synthèse protéique, suite à un choc thermique, et notion de thermotolérance .	75
IV.2.2 Prévention de l'accumulation et de l'agrégation de protéines non natives, suite à un choc thermique .	76
IV.2.3 Préservation de l'intégrité du réseau de microfilaments d'actine	77
IV.2.4 HSP27 et mort cellulaire programmée .	80
CHAPITRE 2	84
1re PARTIE : EXPRESSION DES HSP DANS LES CELLULES TUMORALES	85
I – Mise en évidence d'une expression et d'une localisation inhabituelles des protéines du choc thermique, au sein des cellules tumorales	86
II – HSP et antigénicité tumorale	87
II.1 Notion d'antigénicité tumorale	87
II.2 Les HSP, en tant qu'antigènes tumoraux, s'expriment à la surface des cellules tumorales : mécanismes pour une expression membranaire des HSP	87
II.4 HSP et immunité antitumorale	90
II.5 Les HSP dans le processing et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T Helper .	92
III – HSP et prolifération tumorale	93
III.1 Une surexpression d'HSP70 protège les cellules tumorales de l'apoptose	93
III.2 Les deux protéines du choc thermique HSP70 et HSP27 jouent un rôle essentiel dans les toutes premières étapes de la tumorigénèse, en permettant aux cellules tumorales d'échapper à la surveillance immunologique	93
III.2.1 Une surexpression d'HSP70 protège les cellules tumorales des effets cytotoxiques des TNF α et β .	93
III.2.2 Les protéines HSP70 et HSP27 protègent les cellules tumorales des effets cytotoxiques de certaines cellules immunitaires effectrices (monocytes) et du stress oxydatif .	94
III.3 HSP70, proto-oncogènes et p53 .	95
III.3.1 HSP et produits des proto-oncogènes	95
III.3.2 HSP et p53	96
IV – HSP70 et HSP27 : facteurs pronostiques ?	99
IV.1 L'HSP70 comme facteur pronostique dans le cancer du sein : cas d'un cancer du sein sans ganglions lymphatiques axillaires .	100
IV.2 L'HSP27 comme facteur pronostique	100
IV.2.1 HSP27 et cancer du sein	100
IV.2.2 HSP27 et leucémie lymphoblastique aiguë	102
IV.2.3 HSP27 et histiocytome fibreux malin .	102

2e PARTIE : EXPRESSION DES HSP ET THERAPIE ANTICANCEREUSE	104
ET THERAPIE ANTICANCEREUSE	104
I – Hyperthermie cytotoxique et HSP	105
II – Les HSP peuvent être utilisées dans le traitement en cancérologie	106
II.1 Vaccination–thérapie génique	106
II.1.1 L'utilisation de cellules tumorales exprimant un antigène «de rappel», de type HSP65 mycobactérien, comme cible pour le système immunitaire chez la souris, constitue une première illustration des possibilités de stimulation d'une réponse immunitaire antitumorale .	106
II.1.2 Des cellules tumorales, transfectées avec le gène <i>HSP65</i> mycobactérien, perdent leur tumorigénicité et induisent le développement d'une immunité dirigée contre les cellules tumorales d'origine.	107
II.1.3 Applications possibles du transfert de gène <i>HSP65</i> dans le traitement de tumeurs	109
II.2 Des complexes HSP/peptides antigéniques tumoraux offrent une nouvelle approche de l'immunothérapie antitumorale .	111
III – Les HSP, présentes au sein des cellules tumorales, limitent la portée de certains traitements anticancéreux	112
III.1 Hyperthermie anticancéreuse et thermotolérance	113
III.2 Notion de «multi-drug resistance» et de résistance vis-à-vis de certaines molécules de chimiothérapie anticancéreuse	115
CONCLUSION	120
BIBLIOGRAPHIE	125

Mémoire de Thèse de Mélanie POMMIER
Sujet : Protéines du choc thermique (HSP70, HSP27) et tumeurs.

INTRODUCTION

La réponse au choc thermique est une réponse cellulaire physiologique, immédiate mais transitoire, apparemment universelle, puisque observée dans toutes les cellules et tissus jusqu'ici étudiés. Elle est consécutive à une élévation de la température, mais aussi à de nombreux autres types de stress cellulaires. Cette réponse se traduit par l'induction de la transcription d'une famille de gènes spécifiques, qui mène à la synthèse des protéines dites du choc thermique ou heat shock proteins (HSP) (ou encore protéines de stress), une inhibition post-transcriptionnelle de la synthèse des protéines normales, et la thermotolérance. La thermotolérance traduit la capacité de cellules, préalablement exposées à une température non létale et ayant de ce fait synthétisé des HSP, à résister à une exposition ultérieure à une température plus élevée et habituellement létale pour ces cellules.

Les protéines de stress forment une famille de protéines remarquablement conservée au long de l'évolution. Elles sont regroupées en fonction de leur poids moléculaire et réparties en 6 familles principales : les HSP de haut poids moléculaire (100-110 KDa), la famille HSP90 (83-90 KDa), la famille HSP70 (66-78 KDa), la famille HSP60, la famille HSP40, les HSP de bas poids moléculaire ou sHSP (15-30 KDa) (voir tableau I).

Protéines	Localisation subcellulaire	Principales fonctions
HSP100 (ClpB chez <i>E. Coli</i>)	Nucléole	. Protection lors d'un stress . Thermotolérance
HSP90 (HtpG chez <i>E. Coli</i>)	Cytoplasme	. Repliement et transport des protéines . Interaction avec des récepteurs stéroïdiens (récepteurs des glucocorticoïdes) et certaines protéines kinases (pp60 ^{src})
HSP70 (DnaK chez <i>E. Coli</i>) - HSP70/HSC70 - Grp78/BiP - p75/mt-HSP75	Cytoplasme/noyau Réticulum endoplasmique Mitochondrie	. Repliement et transport des protéines . Assemblage de complexes oligomériques . Dissociation des agrégats protéiques . Intervention dans la dégradation de protéines anormales . Activité protectrice dans le cadre de la réponse au choc thermique
HSP60 (GroEL chez <i>E. Coli</i>)	Cytoplasme	. Repliement des protéines
HSP40 (DnaJ chez <i>E. Coli</i>)	Cytoplasme	. Repliement des protéines . Modulation des fonctions d'HSP70
sHSP	Cytoplasme	. Prévention de l'agrégation des protéines . Interaction avec le cytosquelette . Thermotolérance

Tableau I : Les différentes familles de protéines du choc thermique et leurs principales fonctions (Leppä *et al.* 1997)

Les HSP exercent des fonctions essentielles à la vie cellulaire et plus encore à la survie lors de stress, qu'ils soient physiques, chimiques, ou métaboliques. Ces protéines représentent environ 5 à 10 % de la masse protéique totale, au sein de cellules en croissance dans des conditions physiologiques normales. Malgré cette relative abondance, les gènes codant pour les HSP sont rapidement induits en réponse à des conditions de stress. Cette mobilisation génétique, qui survient en réponse à une perturbation de l'état physiologique de la cellule, se traduit à la fois par une augmentation de l'expression des protéines du choc thermique normalement présentes au sein de la cellule (= HSP constitutives) et par l'induction des principaux gènes *du choc thermique* exprimés en réponse à un stress (= production de HSP induites). Ainsi, les HSP favorisent la survie des cellules dans des conditions de stress responsables de dommages cellulaires irréversibles et d'une mort cellulaire prématurée.

Les HSP agissent comme des chaperons moléculaires, liant les peptides ou protéines en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation. Elles permettent un maintien de ces peptides et protéines sous une forme stable, ce qui favorise leur repliement correct ainsi que leur translocation éventuelle à travers les membranes subcellulaires. Les différentes HSP exercent ces fonctions de chaperons dans des compartiments subcellulaires spécifiques, au niveau desquels elles assurent, en coopération les unes avec les autres, un «contrôle de qualité» et la protection cellulaire.

Cette étude a pour objectif de présenter, d'une part, les connaissances actuelles se rapportant à deux de ces protéines du choc thermique, l'HSP70 et l'HSP27, et d'autre part, les relations existant entre ces protéines et la maladie cancéreuse, ainsi que l'intérêt et les limites qu'elles représentent en matière de thérapie anticancéreuse.

La présentation de ces protéines débute par l'apport de quelques précisions concernant leur structure, leur synthèse au sein de la cellule, les différents mécanismes de régulation de leur synthèse. Puis, les principaux rôles de ces protéines feront l'objet d'une attention toute particulière :

- Les protéines de la famille HSP70 possèdent une activité de type chaperon moléculaire, qui repose sur une capacité d'interaction avec d'autres protéines se présentant sous une conformation non native. Ainsi, les HSP70 sont capables de prévenir l'agrégation de polypeptides nouvellement synthétisés et de favoriser leur repliement correct. Elles interviennent dans la translocation de certaines protéines à travers les membranes de la mitochondrie et du reticulum endoplasmique. Elles permettent, à la suite d'un choc thermique, une prise en charge des protéines altérées et une protection contre le processus d'apoptose. Enfin, elles facilitent la dégradation de protéines anormales par les mécanismes de protéolyse cellulaires, et interviennent dans le phénomène de protéolyse lysosomale. Toutes ces fonctions font intervenir une fixation spécifique des peptides au niveau des protéines HSP70, qui repose sur la capacité qu'ont ces protéines d'hydrolyser l'ATP ou activité ATPase.

- Les petites protéines du choc thermique (HSP27) influencent, au sein des cellules non stressées, les phénomènes de division et de différenciation cellulaires, par modulation du processus apoptotique et par interaction avec les éléments du cytosquelette cellulaire. Au sein de cellules soumises à un stress, elles favorisent un redémarrage des phénomènes de transcription et de synthèse protéiques, interrompus par le choc thermique, elles interviennent, en tant que chaperons moléculaires, dans la prévention de l'agrégation des protéines

dénaturées, elles préservent l'intégrité du réseau de microfilaments et participent à la prévention du processus apoptotique.

En ce qui concerne une implication des protéines du choc thermique dans le processus du cancer, la découverte d'une présence HSP70 à la surface des cellules tumorales, alors que celle des cellules normales en est dépourvue, laisse envisager la possibilité d'une intervention de la protéine sur un plan immunologique. Qu'elle porte elle-même le caractère antigénique de la tumeur ou qu'elle serve de transporteur à d'autres entités immunogènes, l'HSP70 représente une cible pour certains groupes de lymphocytes T de l'immunité. D'autre part, elle semble intervenir au niveau même du processus de prolifération des cellules cancéreuses, par sa capacité d'interaction avec des protéines cellulaires normales et mutantes impliquées dans le développement tumoral, telles que les produits de l'oncogène humain *c-myc* ou du gène suppresseur de tumeur *p53*. Enfin, les taux d'expression d'HSP70, et surtout d'HSP27, pourraient présenter un certain intérêt en tant que facteurs pronostiques du devenir de certains cancers.

En matière de thérapie anticancéreuse, l'utilisation de certaines protéines HSP a récemment été proposée dans le cadre d'une nouvelle approche de la technique thérapeutique antitumorale. Qu'il s'agisse de cellules tumorales transfectées par un gène *HSP* étranger de type *HSP65* mycobactérien, dans le but de rendre la tumeur hautement immunogène pour l'organisme hôte, ou d'une «vaccination» des patients à l'aide de complexes HSP/peptides tumoraux, issus de leur propre tumeur ou de lignées cellulaires dérivées, l'intérêt de la technique consiste en une stimulation de l'immunité naturelle de l'hôte, dans le but de permettre le développement d'une réponse antitumorale spécifique.

Enfin, les HSP sont capables de limiter la portée de certains traitements anticancéreux. L'efficacité de l'hyperthermie peut être réduite par une synthèse HSP et le développement d'une thermotolérance. De même, des taux intracellulaires élevés de HSP favorisent le développement d'une résistance des cellules vis à vis des effets cytotoxiques de certaines molécules anticancéreuses.

CHAPITRE 1

CONNAISSANCES ACTUELLES

SUR L'HSP70 ET L'HSP27

Ire PARTIE

L'HSP70

I - Structure des HSP70 (McKay *et al.* 1994)

I.1 Les différentes HSP70 procaryotes et eucaryotes

Les procaryotes ne renferment qu'une protéine de la famille HSP70 : il s'agit, chez *E. Coli*, de la protéine DnaK. Elle représente environ 1 % de la concentration protéique totale de la cellule en croissance dans des conditions physiologiques normales et son taux de synthèse augmente en réponse à un choc thermique.

Les eucaryotes expriment dans leur cytoplasme des représentants «constitutifs» (HSCs) et «induits par le stress» (HSPs) de ces protéines du choc thermique, qui font partie d'une classe phylogénétique distincte de celle de la DnaK bactérienne.

Il existe également chez les eucaryotes une HSP70 particulière, la protéine BiP, que l'on rencontre dans le réticulum endoplasmique de cellules de mammifères. Elle appartient à une classe encore différente de celles de DnaK et des HSP70 cytosoliques. Cette BiP partage 60 à 70 % d'analogie avec ses homologues cytoplasmiques, tandis que la DnaK bactérienne présente 45 à 50 % de séquences identiques avec les HSP70, HSC70 et BiP des cellules eucaryotes.

Les HSP70 mitochondriales et chloroplastiques semblent former des groupes encore distincts, plus étroitement apparentés aux DnaK procaryotes qu'aux autres protéines eucaryotes.

Une autre HSP70, identifiée comme ayant un rôle dans la présentation de l'antigène a été localisée à l'intérieur de vésicules ou à la surface des cellules. Elle semble plus proche des HSP70 mitochondriales, présentant environ 60 % d'identité avec elles.

Les DnaK bactériennes, les HSP70 mitochondriales, chloroplastiques et présentatrices de l'antigène présentent plusieurs petites différences structurales à type de délétion, par rapport à leurs homologues eucaryotes du cytoplasme et du réticulum.

I.2 Structure primaire des HSP70

D'une façon générale, la structure primaire des HSP70 peut être divisée en 3 régions :

- à partir de l'extrémité N-terminale, les 530 premiers acides aminés correspondent à un domaine hautement conservé,
- la portion comprise entre les acides aminés 530 et 600 environ présente un degré de conservation légèrement moins important,
- enfin, on note la présence de séquences hautement variables, correspondant aux 30 à 50 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la structure.

Les HSP70 et HSC70 cytoplasmiques possèdent au niveau de cette extrémité C-terminale, une séquence d'environ 10 à 30 acides aminés non chargés, riche en glycine, alanine, proline et

résidus hydrophobes : il s'agit généralement d'un motif précis répété 5 à 10 fois, de type (GGMP)_n, dont le rôle n'est pas encore véritablement connu.

Les protéines BiP présentent une séquence de 10 à 15 acides aminés, riche en glycine, alanine, sérine, proline, suivie d'une petite région à caractère acide et de la portion signal, permettant un maintien dans le compartiment réticulaire.

La DnaK bactérienne renferme un segment de 10 à 20 résidus de type glycine, alanine, proline, conduisant à une terminaison hautement chargée et à caractère principalement acide. Là encore, aucune fonction n'a pu être identifiée comme dépendant de ces motifs carboxy-terminaux.

Les activités de fixation et d'hydrolyse de l'ATP ont été mises en évidence au niveau de la région amino-terminale de la molécule. La fixation du peptide semble, quant à elle, dépendre en grande partie de la portion carboxy-terminale. Ainsi, l'activité ATPase des HSP70 pourrait être contenue dans les 380 à 390 premiers résidus acides aminés de la structure primaire, le reste de la molécule pouvant alors être entièrement consacré à la fixation du peptide. Mais là encore, une région semble avoir été identifiée : il s'agirait des acides aminés 385 à 540.

I.3 Structure tertiaire

Jusqu'à présent, aucune HSP70 n'a pu être soumise, dans son intégralité, à une détermination structurale tridimensionnelle par le processus de cristallisation. Seul le fragment ATPase semble avoir aujourd'hui livré l'ensemble des secrets inhérents à sa structure dans l'espace et il semble plus que probable, étant donné le haut degré de conservation existant au sein de la famille des protéines HSP70, que les fragments ATPase de tous les membres de la famille présentent le même type de configuration spatiale.

Le fragment ATPase est constitué de quatre domaines structuraux formant deux lobes, séparés par une fissure. Le nucléotide, de type ATP ou ADP (+ Pi), est fixé à la base de cette fissure, dans une sorte de poche, elle-même formée par les deux domaines inférieurs (voir figure 1).

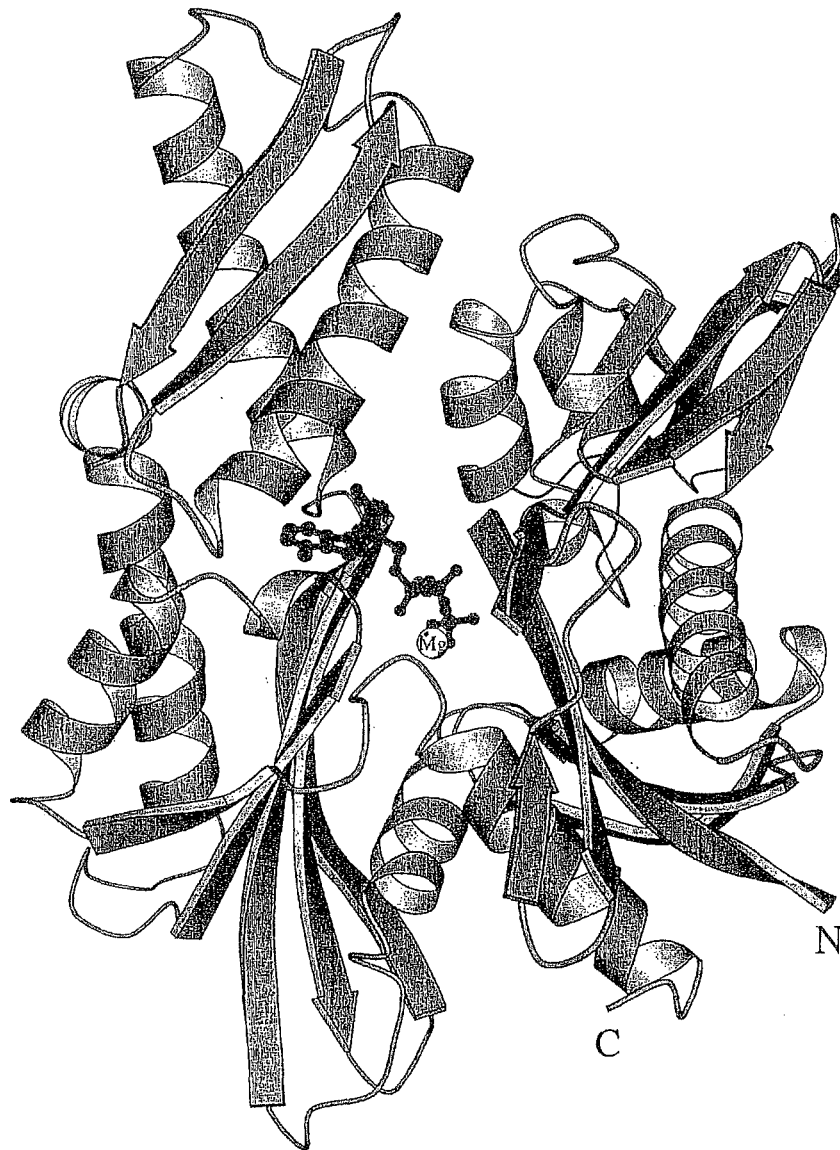


Figure 1 : Structure tridimensionnelle du fragment ATPase d'HSP70, représenté avec une molécule d'ADP + Pi et un ion Mg^{++} . Les flèches représentent des structures de type feuillets β , les spirales des structures de type hélices α (McKay *et al.* 1994)

I.4 L'activité ATPase

Les protéines HSP70 fixent des protéines dénaturées et de courts peptides, en réponse à une hydrolyse d'ATP. Réciproquement, la fixation de peptides ou de protéines dénaturées au niveau des HSP70 augmente leur activité ATPase.

En fait, cette activité ATPase dépend de plusieurs facteurs :

1. La conformation de la protéine HSP70

Il a été démontré, pour la protéine BiP, une différence d'activité ATPase entre une forme recombinante monomérique et la protéine naturelle partiellement multimérique, en faveur de la protéine recombinante. Un apport de substrat peptidique permet une dissociation des formes multimériques et l'acquisition, par les monomères nouvellement formés et fixant le peptide, d'une activité ATPase semblable à celle de la protéine recombinante, fixant elle aussi le substrat.

Ainsi, les formes agrégées de la protéine BiP ne présentent que peu, voire pas, d'activité ATPase et, au final, la différence observée entre l'activité de la protéine libre et celle de la protéine stimulée par le peptide correspond donc à une différence entre activité basale et activité maximale d'une protéine sous forme monomérique, entièrement active.

2. La température

L'activité ATPase des HSP70 semble être modulée par la température. Il a été mis en évidence que l'activité ATPase basale de DnaK augmentait rapidement, alors que la température passait progressivement de 20 à 53 °C. A l'inverse, au-delà de 53 °C, cette activité diminuait précipitamment. Ces différents comportements semblent être en relation avec une modification conformationnelle de la molécule, par ailleurs observée pour ces protéines, aux environs de cette température.

3. Les protéines accessoires

L'activité des HSP70 est également influencée par des protéines dites accessoires. Le taux d'activité de DnaK augmente jusqu'à 50 fois son niveau basal, à la suite de l'effet coopératif de 2 protéines, GrpE et DnaJ, alors que ni l'une ni l'autre de ces protéines prise individuellement ne permet un tel effet.

Ces protéines semblent agir de deux manières distinctes et à des niveaux différents du cycle de l'ATP :

- DnaJ, en accélérant l'hydrolyse de l'ATP,
- GrpE, en favorisant les échanges nucléotidiques au niveau de DnaK.

Pour conclure, la raison d'être de cette activité ATPasique, et plus généralement du cycle de l'ATP, au niveau des HSP70, semble être la régulation de la fixation des peptides substrats, au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine.

1.5 Changements conformationnels et oligomérisation

Les HSP70 existent sous deux formes distinctes : l'une possède une haute affinité pour les peptides ou les protéines dénaturées, l'autre ne présente qu'une faible affinité pour ces mêmes substrats. Le passage d'une conformation à l'autre repose sur le phénomène d'hydrolyse de l'ATP, bien que le peptide fixé semble également intervenir dans le processus.

En l'absence de peptides ou de protéines dénaturées, les HSP70 s'associent entre elles pour former des oligomères et plus fréquemment des dimères ou des trimères. Une incubation de ces oligomères avec de l'ATP ou en présence de substrats peptidiques permet, dans les deux cas, une dissociation des structures initiales en unités monomériques.

Un modèle d'interaction des HSP70 entre elles a été proposé : en l'absence de peptides cibles, les HSP70 libres sont capables d'interagir au niveau de «self peptides», qui sont des segments polypeptidiques relativement peu structurés et localisés à l'intérieur même de ces protéines. Des liaisons extrêmement stables se forment entre les domaines de fixation du substrat et les «self peptides» de différentes molécules HSP70. Ces associations peuvent être rompues, soit par un passage ATP dépendant des protéines sous leur forme de faible affinité pour le substrat, soit par un apport de peptides substrats qui sont alors en compétition avec les «self peptides».

Ces interactions inter-protéines pourraient être à l'origine d'une modulation des concentrations en HSP70 actives (c'est-à-dire capables de fixer des polypeptides), au sein d'un milieu cellulaire pauvre en substrat.

II - Synthèse des HSP70

Les HSP sont codées par des gènes dits «*du choc thermique*», dont la transcription est rapidement induite en réponse à des conditions de stress. Cette mobilisation génétique, qui fait suite à une perturbation de l'état physiologique de la cellule, se traduit par une augmentation de l'expression des HSP normalement synthétisées au sein de la cellule (= HSP constitutives) et par l'induction *de novo* des principaux gènes *du choc thermique* exprimés en réponse à un stress (= production de HSP induites).

Chez les eucaryotes, les gènes *du choc thermique* sont sous le contrôle de régulateurs protéiques spécifiques, hautement conservés, appelés facteurs de transcription du choc thermique ou HSF. Ces HSF sont initialement localisés dans le cytoplasme des cellules. Ils sont capables de gagner le noyau et d'agir directement au niveau de l'ADN, par l'intermédiaire d'éléments particuliers dits éléments de réponse au choc thermique ou HSE. Ces HSE font partie de la région promotrice du gène, c'est-à-dire de la portion d'ADN située immédiatement en amont du gène.

II.1 Structure des HSF

Des facteurs de transcription du choc thermique ont été repérés chez de nombreuses espèces eucaryotes. La levure et la drosophile ne renferment qu'un seul facteur de type HSF, tandis que la plupart des eucaryotes supérieurs en possèdent de multiples représentants : 3 pour la tomate et le poulet, 2 chez la souris et les humains (Fernandes *et al.* 1994).

Les différents HSF présentent des variations de taille, révélées par des quantités différentes de résidus acides aminés, et une homologie limitée, avec seulement 40 % d'identité au niveau de leurs séquences d'acides aminés (Morimoto *et al.* 1994).

Tous ces HSF ont en commun deux caractères hautement conservés et localisés côté amino-terminal de la structure (voir figure 2) :

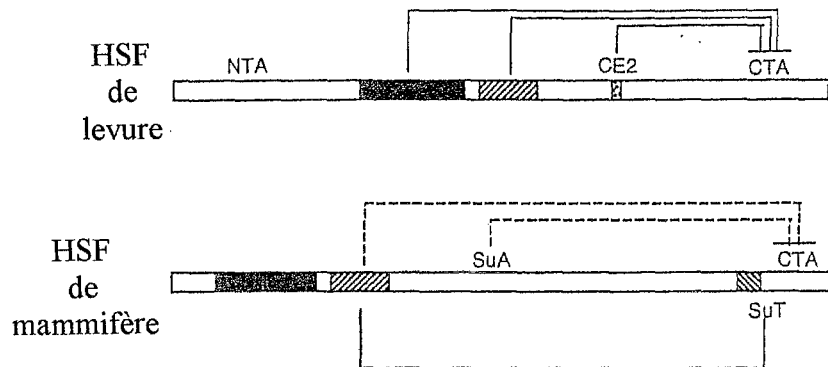


Figure 2 : Organisation du HSF : (noir) domaine de fixation à l'ADN ; (hachuré) domaine de trimérisation ; NTA, activateur N-terminal ; CTA, activateur C-terminal ; SuT, suppresseur du domaine de trimérisation ; SuA, suppresseur du domaine activateur (Wu 1995).

- le domaine de fixation à l'ADN

Le domaine qui permet au HSF de se fixer au niveau de l'ADN a été défini comme étant une région d'environ 118 résidus, organisée en 3 hélices α et 4 feuillets β . Ces motifs forment une structure globulaire compacte, à l'exception d'une boucle flexible localisée entre les feuillets 3 et 4 (voir figure 3).

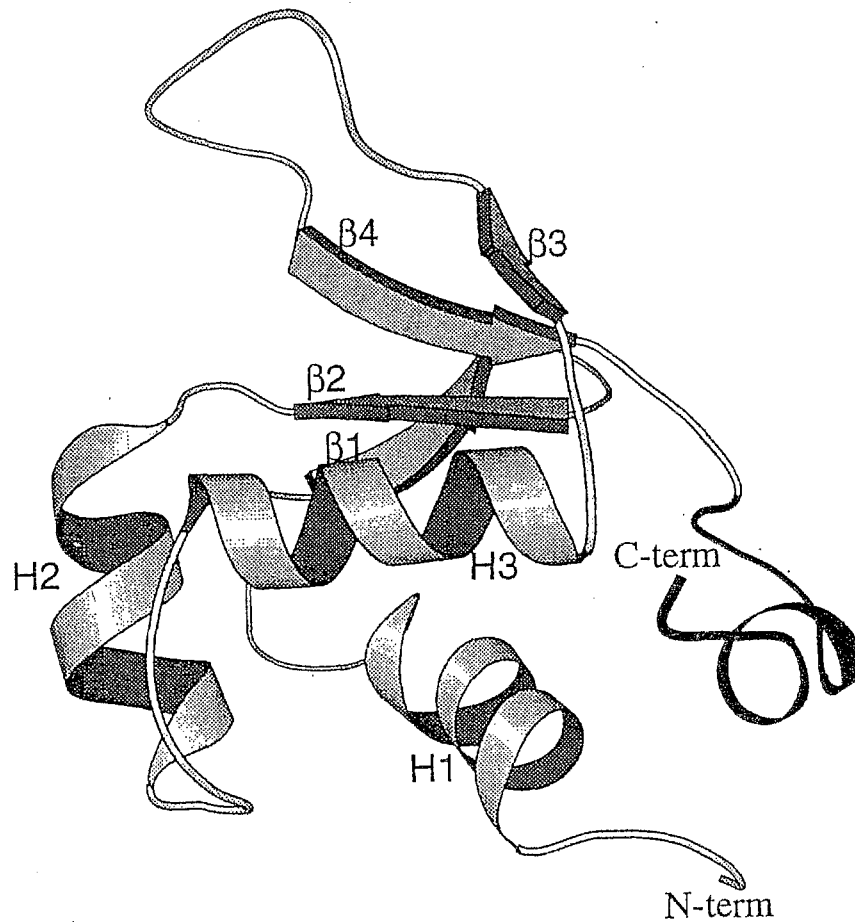


Figure 3 : Structure tridimensionnelle du domaine de fixation à l'ADN du HSF, montrant les trois hélices α (H1, H2, H3) et les quatre feuillets β (β 1, β 2, β 3, β 4) (Wu 1995).

- le domaine de trimérisation

Ce domaine fait le lien entre la portion C-terminale de la molécule et le domaine de fixation à l'ADN. C'est sur lui que repose la capacité qu'ont les HSF de s'associer entre eux pour former des structures de type oligomérique. Il est composé d'une centaine d'acides aminés formant un motif particulier, constitué de séquences répétées de 7 résidus hydrophobes. Les domaines de trimérisation de 3 HSF identiques peuvent s'associer en une structure enroulée à 3 brins, de type hélice α , permettant ainsi la naissance d'un homotrimer capable de se fixer à l'ADN.

D'autres domaines, plus ou moins conservés, ont été identifiés au sein des différents HSF :

- un domaine suppresseur du domaine de trimérisation, ou SuT, a été mis en évidence dans la région C-terminale. D'une structure proche de celle du domaine de trimérisation, il serait responsable de la formation d'un HSF inactif, ou de la suppression du phénomène d'assemblage des HSF entre eux, lorsque la cellule n'est pas soumise à des conditions de stress. Le phénomène de suppression de la trimérisation permet un maintien des HSF sous forme monomérique et pourrait impliquer des interactions intra-moléculaires entre les domaines amino et carboxy-terminaux.

- l'analyse de la structure des HSF a également permis de caractériser des domaines responsables d'une activation de la transcription des gènes *du choc thermique* (CTA). Il s'agit de régions riches en sérine et thréonine, qui pourraient servir de sites de phosphorylation potentiels, lors du processus de transactivation. De tels domaines ont principalement été mis en évidence à l'extrémité C-terminale de la molécule de HSF ; néanmoins, des transactivateurs amino-terminaux ont déjà été observés au sein des HSF de certaines levures (NTA).

- enfin, une petite séquence de 7 acides aminés a été identifiée côté amino-terminal, comme étant responsable d'une suppression de l'activité transcriptionnelle du HSF (SuA).

Ainsi, la modulation de l'activité transcriptionnelle semble reposer d'une part, sur le maintien d'un équilibre entre les fonctions des différents domaines (d'activation et de suppression) et d'autre part, sur un contrôle de la fixation du trimère au niveau de l'ADN (Wu 1995 ; Fernandes *et al.* 1994).

II.2 Les éléments du choc thermique (HSE) (Fernandes *et al.* 1994 ; Morimoto *et al.* 1996).

La fixation d'un HSF trimérique au niveau d'un HSE de la région promotrice d'un gène *du choc thermique* permet une activation spécifique de la transcription de ce gène.

Un élément du choc thermique est constitué d'une succession de plusieurs séquences de 5 paires de bases, de type 5'-nGAAn-3', chaque séquence étant inversée par rapport à celle qui lui est immédiatement accolée. Le nombre d'unités de 5 paires de bases qui constituent un HSE fonctionnel est variable, mais il est habituellement compris entre 3 et 6. Le nombre de HSE associés à un gène du choc thermique peut également varier, de même que la distance entre ces HSE. La localisation des HSE, au niveau de la région promotrice, dépend de la nature du gène : en ce qui concerne le gène codant pour HSP70, les HSE ont été identifiés à partir de la 40^e paire de bases en amont du site de début de la transcription, tandis que pour le gène codant pour HSP27, c'est environ 270 paires de bases en amont, que les HSE ont été localisés.

Enfin, il semblerait que, d'une façon générale, la séquence nucléotidique «type» du HSE (-nGAAn-) ait été bien conservée chez les eucaryotes, tout au long de l'évolution. En effet, des gènes *du choc thermique*, provenant d'organismes aussi différents que les nématodes, les levures, les insectes, les rongeurs ou les humains, présentent tous la même unité de base, au niveau de leurs éléments promoteurs.

II.3 Interaction entre HSF et HSE (Fernandes *et al.* 1994 ; Morimoto *et al.* 1996)

L'HSF sous forme trimérique possède une remarquable flexibilité, qui lui permet d'interagir avec des HSE différents, de par le nombre et l'arrangement des unités de 5 paires de bases.

La séquence «modèle» -nGAAn- est considérée comme l'unité fondamentale de reconnaissance, puisque chaque sous-unité du trimère HSF interagit avec l'une de ces séquences constituant l'HSE. Ainsi, le site de fixation minimal, permettant une interaction complète du trimère HSF, doit être constitué de 3 unités de 5 paires de bases.

Il a été démontré que plus le nombre d'unités de 5 paires de bases constituant l'HSE augmentait, meilleure était l'affinité de fixation des HSF. Il semble donc que les HSF soient capables de se fixer de manière coopérative au niveau des HSE (voir figure 4). La coopération permettant l'interaction la plus étroite est obtenue pour un nombre d'unités de 5 paires de bases supérieur ou égal à 6.

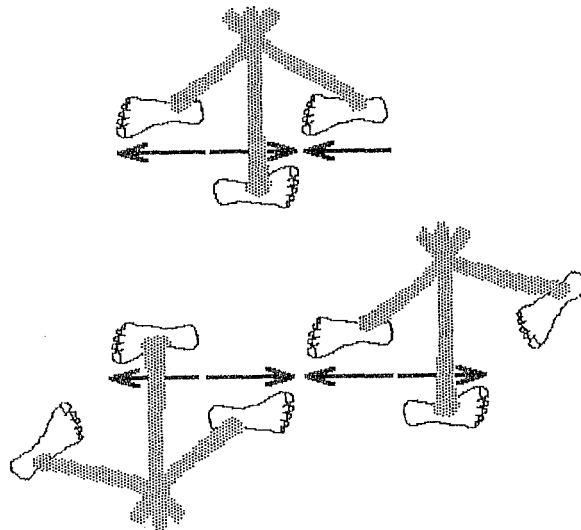


Figure 4 : Modèles d'interaction des trimères HSF avec des HSE différents de par leur nombre d'unités de 5 paires de bases. Les flèches désignent les unités de 5 paires de bases et leur orientation relative. Les pieds représentent les domaines de fixation à l'ADN du trimère HSF. Les jambes représentent les sous-unités du trimère (Fernandes *et al.* 1994).

Enfin, il est important de noter que dans des conditions de température élevée, la coopération entre les différents HSF est encore plus prononcée ; ceci suggère que la capacité des séquences de 5 paires de bases à séquestrer les HSF est elle-même d'autant plus importante que la température est élevée.

Puisque les différents gènes *du choc thermique* possèdent, au niveau de leur région promotrice, des quantités variables d'unités de 5 paires de bases, les HSF présentent donc des affinités différentes pour ces gènes, ce qui peut expliquer leur capacité de réponse variable au choc thermique.

II.4 Les gènes *du choc thermique*, non induits hors des conditions de stress, font l'objet d'une «préparation» particulière, permettant l'obtention d'une réponse rapide, lors de la survenue d'une situation de stress (Fernandes *et al.* 1994 ; Morimoto *et al.* 1996).

Il a été démontré que, chez la drosophile, en l'absence de stress, la transcription des gènes *du choc thermique* était amorcée puis stoppée, jusqu'à ce qu'un stimulus (thermique par exemple) favorise un redémarrage du processus, permettant la réponse rapide requise de la part de la cellule (voir figure 5).

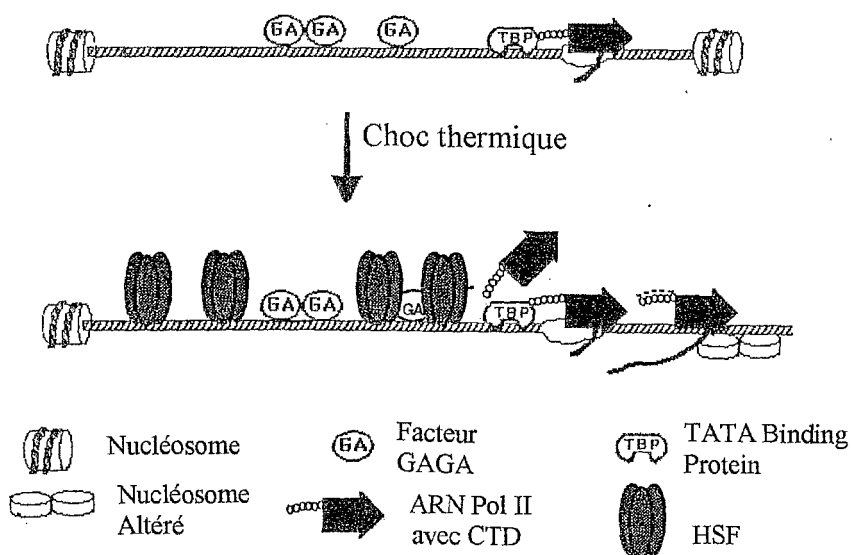


Figure 5 : Architecture du promoteur HSP70 avant et après un choc thermique (Fernandes *et al.* 1994).

II.4.1 En l'absence de stress

Dans des conditions physiologiques normales, les promoteurs des gènes *du choc thermique* présentent une structure chromatique lâche, dite «de configuration ouverte».

Deux facteurs de transcription particuliers leur sont fixés : le facteur GAGA et la protéine TBP pour «TATA-binding protein». Cette dernière fait partie d'une structure beaucoup plus complexe dite «facteur général de transcription» ou TFIID. Elle représente le composant capable d'interagir spécifiquement avec l'ADN, qui se fixe au niveau de la région TATA, située environ 30 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. On note également, au niveau de la région de l'ADN comprise entre les nucléotides + 17 et + 37 (le site de début de transcription correspondant à l'emplacement + 1), la présence d'une ARN polymérase II, transcriptionnellement engagée au niveau du gène, mais qui s'est arrêtée après avoir permis l'assemblage d'environ 25 nucléotides d'ARN.

La région du promoteur située en amont de la «boîte» TATA et comportant les séquences GAGA et les HSE intervient, au même titre que les séquences d'un autre site dit «d'initiation de la transcription», dans la programmation de l'arrêt de la polymérase. Une altération de ce processus s'accompagne d'une diminution de la capacité du promoteur à être induit par la chaleur.

Ainsi, l'arrêt de la polymérase, quelques nucléotides après le début de la transcription, semble être une étape essentielle du processus général d'activation de la transcription des gènes.

La fixation du facteur GAGA au niveau des éléments GAGA de la région promotrice favorise une interruption du processus normal de formation des nucléosomes. Le facteur GAGA est également capable d'agir directement au niveau des nucléosomes préformés, en permettant un déroulement des structures et une libération des portions d'ADN impliquées.

La protéine TBP est incapable de se fixer à la région TATA, si celle-ci fait partie d'un complexe nucléosomique. Ainsi, l'action du facteur GAGA pourrait être une première étape indispensable au phénomène d'ouverture du promoteur, qui à son tour favoriserait la fixation de la protéine TBP d'une part, l'entrée et l'arrêt de l'ARN polymérase II d'autre part.

Cette polymérase est constituée de plusieurs sous-unités. La plus grande d'entre elles possède un domaine C-terminal remarquable, le CTD, qui consiste en un heptapeptide répété de nombreuses fois (42 chez la drosophile), que l'on rencontre soit sous forme phosphorylée, soit sous forme déphosphorylée. La forme non phosphorylée s'observe préférentiellement au sein du complexe enzymatique de préinitiation ; elle est également la seule à pouvoir interagir avec la protéine TBP.

Puisque la polymérase porteuse d'un CTD non phosphorylé est capable de démarrer son activité transcriptionnelle à partir du promoteur, il est possible que la phosphorylation du CTD ne survienne pas immédiatement. Le CTD d'une telle polymérase se retrouve alors à proximité du promoteur et dans une position autorisant une interaction avec la protéine TBP. Il s'agit d'une interaction relativement lâche, puisque chaque heptapeptide constituant le CTD est capable, chacun à son tour, de se fixer au niveau de la protéine ; ceci pourrait justifier le fait que la polymérase s'arrête après avoir transcrit 20 nucléotides environ. Si ce type d'interaction survient, alors le CTD de la polymérase stoppée se trouve toujours sous forme non phosphorylée. Ainsi, puisque la phosphorylation du CTD ne semble pas indispensable au bon déroulement de la transcription jusqu'à la pause, elle pourrait par la suite intervenir dans la stimulation de la polymérase à l'arrêt, permettant de ce fait la transcription complète du gène.

II.4.2 En situation de stress (par exemple un choc thermique)

La présence d'une polymérase stoppée à l'extrémité 5' des gènes *du choc thermique* est le reflet de la capacité de ces gènes à répondre rapidement à un choc thermique. En effet, la polymérase est capable de démarrer son élongation à partir du promoteur dans les 30 à 60 secondes suivant le phénomène thermique ; elle atteindra ensuite l'extrémité 3' du gène en moins de 120 secondes. De leur côté, les HSF acquièrent leur capacité de fixation aux HSE en moins de 30 secondes après le choc thermique. Cette fixation est d'ailleurs facilitée par la présence d'un promoteur «ouvert», c'est-à-dire désengagé de toute structure nucléosomique.

Bien qu'un choc thermique soit capable de modifier l'architecture de la région promotrice, certaines de ses caractéristiques initiales persistent et notamment celles des éléments GAGA et TATA qui demeurent occupés, même après l'induction.

Au final, le choc thermique provoque deux changements majeurs du HSF :

- tout d'abord, au sein du cytoplasme, la formation de la structure trimérique et l'acquisition de la capacité de fixation aux HSE,
- puis, au niveau du noyau et après fixation à l'ADN, la survenue d'une phosphorylation permettant l'activation transcriptionnelle.

Différentes hypothèses ont alors été envisagées concernant les relations du HSF avec l'ARN polymérase II :

- l'HSF activé pourrait interagir directement avec la polymérase à l'arrêt et stimuler l'élongation ;
- il pourrait favoriser une initiation de la transcription par de nouvelles polymérases, dont l'intervention serait alors essentielle à l'obtention d'un relargage de la polymérase arrêtée ;
- il pourrait encore favoriser une rupture des interactions entre la polymérase arrêtée et les facteurs de transcription basaux (entre autres la TBP), et ceci, toujours dans le but de stimuler le phénomène d'élongation. Cette intervention pourrait s'effectuer de manière directe ou indirecte par stimulation de la phosphorylation du CTD de la polymérase à l'arrêt. Il a d'ailleurs été observé que le CTD d'une polymérase en cours d'élongation se présentait sous une forme partiellement ou totalement phosphorylée. Cette phosphorylation pourrait donc avoir un rôle dans la stimulation de la polymérase, permettant la poursuite de l'élongation.
- enfin, l'HSF pourrait faciliter l'élongation en s'occupant des nucléosomes altérés, ou par antagonisme des récepteurs H₁, qui semblent impliqués dans une répression de la transcription.

III - Régulation de la synthèse des HSP70

III.1 Représentation schématique des différentes conditions environnementales et physiologiques capables d'induire une expression des gènes du *choc thermique* (voir figure 6) (Morimoto *et al.* 1994).

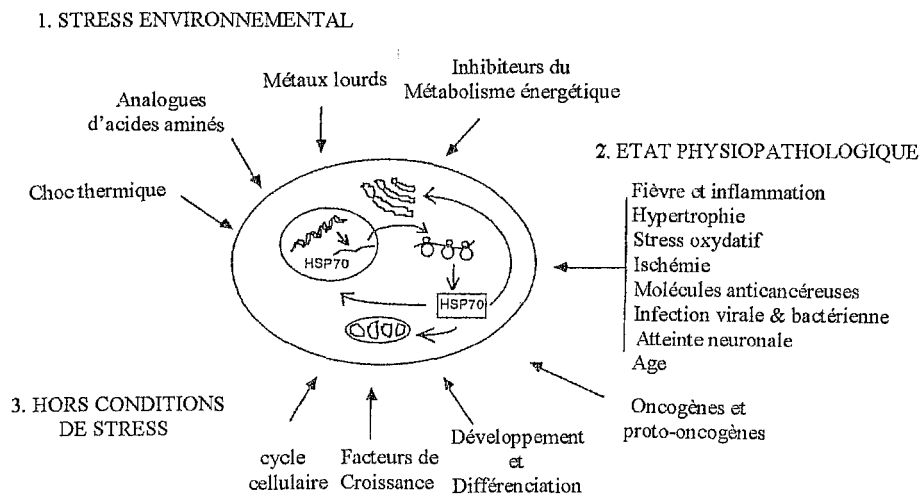


Figure 6 : Conditions permettant une induction de l'expression des gènes du *choc thermique* chez les eucaryotes (Morimoto *et al.* 1994).

Les différents stimuli, connus pour générer une expression accrue des protéines de stress, ont été répartis en trois groupes :

- les stress environnementaux : exposition à un choc thermique, à des analogues d'acides aminés, à des métaux lourds, à des inhibiteurs du métabolisme énergétique...
- les états physiopathologiques et les maladies : le stress oxydatif, la fièvre, l'inflammation, les infections virales et bactériennes, les molécules antinéoplasiques, le vieillissement...
- certaines conditions qui ne sont pas des conditions de stress : le cycle cellulaire, les facteurs de croissance, le développement et la différenciation cellulaires...

Etant donné la diversité des situations susceptibles d'induire une réponse cellulaire protectrice, il semble essentiel de tenter de comprendre par quels mécanismes ces situations de stress sont détectées par la cellule, et comment l'information est transmise aux systèmes transcriptionnels. Une meilleure compréhension de ces phénomènes passe par une meilleure connaissance des mécanismes de régulation des gènes *du choc thermique*, qui font intervenir, entre autres choses et selon le stress inducteur, les différents facteurs de transcription du choc thermique.

III.2 Notion d'activation des différents facteurs de transcription du choc thermique, en réponse à des phénomènes physiologiques distincts (Morimoto *et al.* 1994 ; Wu 1995 ; Leppä *et al.* 1997 ; Morimoto *et al.* 1996).

Chez la plupart des espèces, l'expression des gènes *HSF* s'effectue de manière constitutive et non pas en réponse à une situation de stress.

L'*HSF1*, mis en évidence chez les vertébrés, est l'homologue fonctionnel de l'*HSF* général que l'on rencontre chez les petits eucaryotes. Son activation *in vivo* est induite par une exposition à un choc thermique et par de nombreuses autres formes de stress physiologiques. Il possède les propriétés attendues chez un facteur de transcription responsable de l'induction des gènes *du choc thermique* en réponse à un stress, à savoir la capacité d'oligomérisation, de relocalisation dans le noyau, de fixation à l'ADN et de phosphorylation. L'acquisition de la capacité de fixation à l'ADN est autorisée par le passage de l'*HSF* de sa forme monomérique initiale à une forme trimérique. Ce phénomène est complètement indépendant du phénomène d'activation de l'*HSF* (= acquisition de l'activité transcriptionnelle), qui résulte d'une phosphorylation de la structure. En fait, certains types de stress (chocs thermiques, métaux lourds...) conduisent effectivement à la formation de structures totalement phosphorylées, tandis qu'une exposition à des analogues d'acides aminés aboutit à une activation d'*HSF1* sous une forme non phosphorylée.

Contrairement au caractère induit de la régulation d'*HSF1*, les propriétés d'un autre facteur de transcription du choc thermique, l'*HSF2*, mis en évidence chez la souris et l'homme, ne sont pas affectées par une exposition à un choc thermique. Ainsi, cet *HSF2* ne semble pas tenir un rôle essentiel dans la transcription des gènes *du choc thermique* induite par une situation de stress. Il a été observé qu'*HSF2* était capable d'acquérir une activité de fixation à l'ADN, chez des cellules érythrocytaires leucémiques humaines (K 562) en cours de différenciation à la suite d'un traitement par l'hème, et lors de la différenciation spermatocytaire chez la souris. De plus, une capacité de fixation à l'ADN constitutive a été mise en évidence pour les *HSF2*

de lignées cellulaires embryonnaires carcinomateuses, et au cours de l'étape blastocytaire du développement précoce de la souris.

HSF2 acquiert son activité de fixation à l'ADN beaucoup moins rapidement qu'HSF1, lorsque ce dernier est soumis à un choc thermique. Cette activité obtenue pour HSF2 à la suite d'un traitement par l'hème, peut être maintenue pour une durée de plus de 60 heures, alors qu'HSF1 est rapidement, mais transitoirement, activé par un choc thermique. De plus, HSF1 semble être à l'origine d'une stimulation transcriptionnelle beaucoup plus efficace qu'HSF2, et ceci pourrait provenir d'une occupation différente du promoteur HSP70.

Au final, ces observations renforcent l'hypothèse qu'HSF2 ne semble pas intervenir dans une transcription des gènes *du choc thermique* induite par un stress, mais plutôt comme un activateur, au cours de certaines phases de la différenciation et du développement cellulaires.

Il existerait un troisième représentant de la famille des facteurs de transcription du choc thermique, l'HSF3, mis en évidence chez le poulet. Cet HSF3 est exprimé de manière ubiquitaire et, comme pour les HSF1 et 2, sa capacité de fixer l'ADN est négativement régulée dans des conditions physiologiques normales. Cependant, à la différence d'HSF1 qui est rapidement activé par le stress dans toutes les cellules, HSF3 présente une capacité d'activation retardée et spécifique de certains types de cellules.

En résumé, l'activation des facteurs de transcription du choc thermique, qu'il s'agisse d'HSF1 ou d'HSF2, s'accompagne d'importants changements dans les propriétés biochimiques de ces facteurs et dans leur localisation intracellulaire.

En réponse à un stress, HSF1 est activé selon un processus comportant plusieurs étapes :

- une oligomérisation, d'une forme monomérique régulée négativement à une forme trimérique de fixation à l'ADN,
- une translocation dans le noyau,
- et une hyperphosphorylation des résidus sérines de la structure.

HSF1 et HSF2 ont en commun la capacité d'adopter une configuration trimérique, suite à une stimulation, dans le but d'acquérir leur activité de fixation à l'ADN ; ils diffèrent par contre de par la structure de leur forme native, de non fixation à l'ADN. HSF1 est un monomère, tandis qu'HSF2 se présente sous la forme d'un dimère de type homo ou hétérodimère (bien qu'aucun partenaire potentiel d'hétéromérisation n'ait été identifié jusqu'à présent). De plus, HSF2 semble ne subir aucune modification de type phosphorylation, à la suite de son passage sous forme trimérique (voir figure 7).

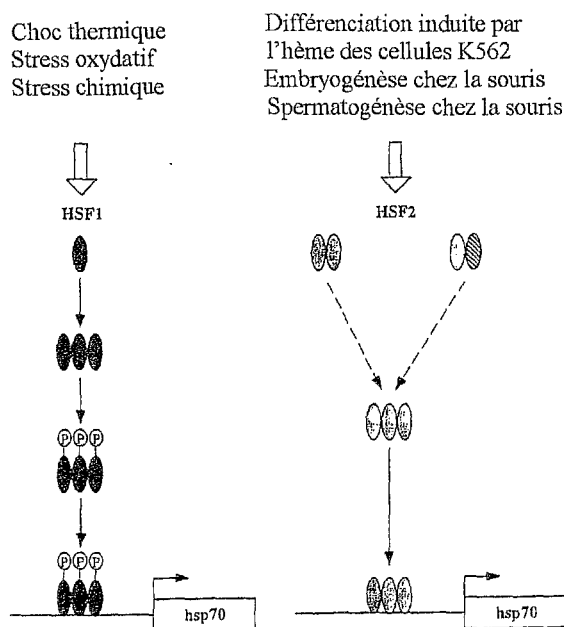


Figure 7 : Modèle de régulation de l'activité de fixation à l'ADN des HSF1 et 2 (Leppä *et al.* 1997).

HSF2, dans sa configuration native, est principalement localisé dans le cytoplasme des cellules. A la suite d'une stimulation type traitement par l'hème, le taux d'HSF2 cytoplasmique demeure constant, tandis que celui des HSF2 trimériques et localisés dans le noyau, augmente de façon significative, en corrélation avec une augmentation de la capacité de fixation à l'ADN.

HSF1 sous forme monomérique est distribué à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, avec cependant une proportion supérieure d'HSF1 dans le cytoplasme. Suite à un stress (thermique par exemple), HSF1 subit une trimérisation et se retrouve alors entièrement localisé dans le noyau.

III.3 Les différents HSF peuvent être simultanément activés au sein de la cellule (Morimoto *et al.* 1994 ; Wu 1995 ; Leppä *et al.* 1997 ; Morimoto *et al.* 1996).

Il a été mis en évidence que les facteurs HSF1 et HSF2, présents dans une même cellule, pouvaient être simultanément activés en réponse à des signaux différents. Ces facteurs présentent les mêmes propriétés que celles observées au sein de cellules exposées soit à un choc thermique, soit à un traitement par l'hème.

Cette co-activation des HSF1 et 2 dans des cellules préalablement traitées par l'hème et exposées à une température élevée, s'accompagne d'un effet synergique permettant une induction importante des gènes *HSP70*. Une explication de cette activité synergique pourrait se situer au niveau de la fixation des HSF1 et 2 au sein des promoteurs *HSP70* : les facteurs 1 et 2, sous forme trimérique, pourraient occuper simultanément le même promoteur, contrairement à ce que l'on observe au sein de cellules traitées par l'hème ou exposées à un

stress thermique, où un promoteur HSP70 ne peut être occupé que par 2 trimères HSF1 ou HSF2. Une autre hypothèse serait que les sous-unités HSF1 et HSF2 puissent former des trimères mixtes, aux propriétés transcriptionnelles supérieures à celles des trimères dits «purs». Cependant, jusqu'à présent, il n'a jamais été prouvé que de tels hétérotrimères étaient capables de se former.

III.4 Les protéines du choc thermique semblent elles-mêmes intervenir dans un processus d'autorégulation des HSF (Morimoto *et al.* 1994 ; Wu 1995 ; Leppä *et al.* 1997).

La réponse cellulaire à un choc thermique, comme la plupart des réponses induites de la cellule, est rapidement déclenchée dès la survenue du stress thermique. En effet, il ne faut que quelques minutes à une élévation de température pour provoquer la transcription des principaux gènes *du choc thermique*, et notamment ceux codant pour HSP70. Cependant, contrairement aux autres réponses cellulaires induites, pour lesquelles l'expression des gènes cibles est maintenue à des taux élevés, la transcription des gènes *du choc thermique* et l'activité de fixation à l'ADN des HSF sont soumises à une atténuation thermodépendante. En fait, la réponse transcriptionnelle au choc thermique est proportionnelle à l'amplitude et à la durée du stress.

En ce qui concerne l'HSF, ses capacités d'oligomérisation et de fixation à l'ADN sont négativement régulées, tant que l'environnement cellulaire est physiologiquement normal. La survenue d'un stimulus activateur révèle le caractère réversible de cette inhibition, en permettant un passage de l'état de non fixation à l'ADN à un état capable de fixation.

Cependant, cette propriété n'est pas intrinsèque au facteur de transcription. Il a été proposé que des protéines régulatrices, exprimées au sein des cellules eucaryotes, étaient capables de réguler l'état oligomérique de l'HSF et son activité de fixation à l'ADN. Les protéines du choc thermique de type HSP70 se sont alors révélées d'excellentes candidates pour ce rôle. L'existence d'une boucle d'autorégulation, mettant en jeu protéines anormales et HSP70, a été proposée (voir figure 8) : les protéines anormalement repliées, qui s'accumulent dans la cellule suite à un choc thermique, sont capables de séquestrer les HSP70 et d'entraîner une activation des HSF. Les HSP70 nouvellement synthétisées, qui s'accumulent à leur tour au sein de la cellule, permettent une prise en charge efficace des protéines altérées par le choc thermique, puis induisent un rétrocontrôle négatif de leur propre synthèse par interaction avec les HSF activés. Ainsi, l'apparition et l'accumulation de protéines altérées semblent directement impliquées dans la détection du choc thermique et/ou dans le déclenchement de la réponse cellulaire à ce choc.

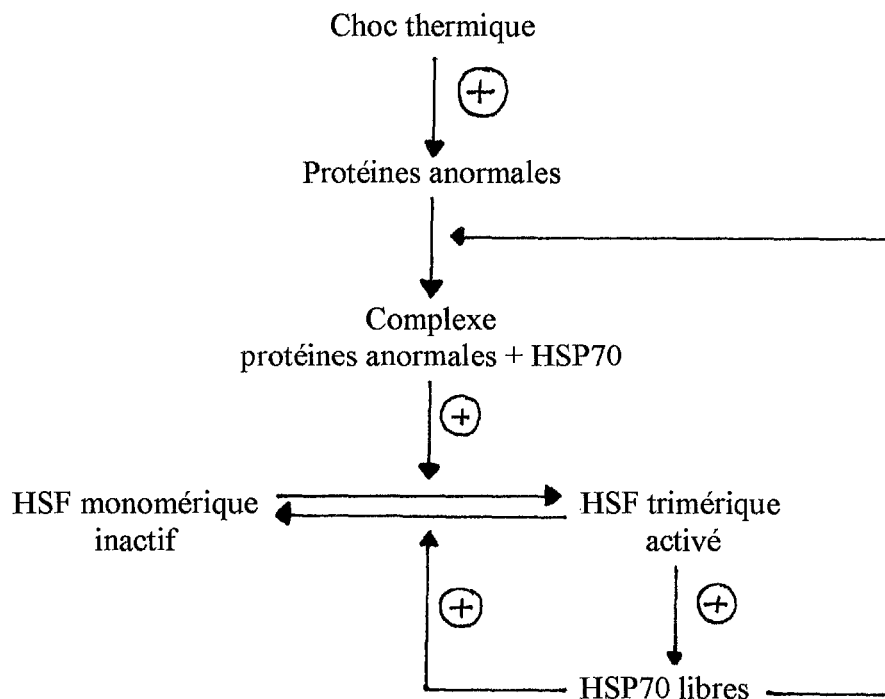


Figure 8 : Proposition pour un processus d'autorégulation des HSF par les HSP70.

Les chaperons moléculaires de la famille HSP70 représentent donc d'intéressantes candidates pour une autorégulation de la réponse au choc thermique, et d'autant plus qu'on les sait capables de favoriser le processus de repliement correct des protéines altérées par un choc thermique.

Il semblerait que l'effet inhibiteur d'HSP70, vis à vis de l'HSF, fasse intervenir la protéine sous forme libre, c'est-à-dire ne fixant aucun substrat. Il paraît par contre tout à fait improbable qu'HSF1 sous forme native et HSP70 s'associent en un complexe stable, puisque c'est sous forme monomérique que l'HSF natif est habituellement détecté. Il doit donc exister, entre l'HSF et ses molécules régulatrices, un équilibre, permettant soit le maintien de l'HSF sous sa forme de non fixation à l'ADN, soit l'acquisition d'une conformation capable de fixation.

Un modèle de régulation de l'activité de fixation à l'ADN d'HSF1 est proposé dans la figure 9 :

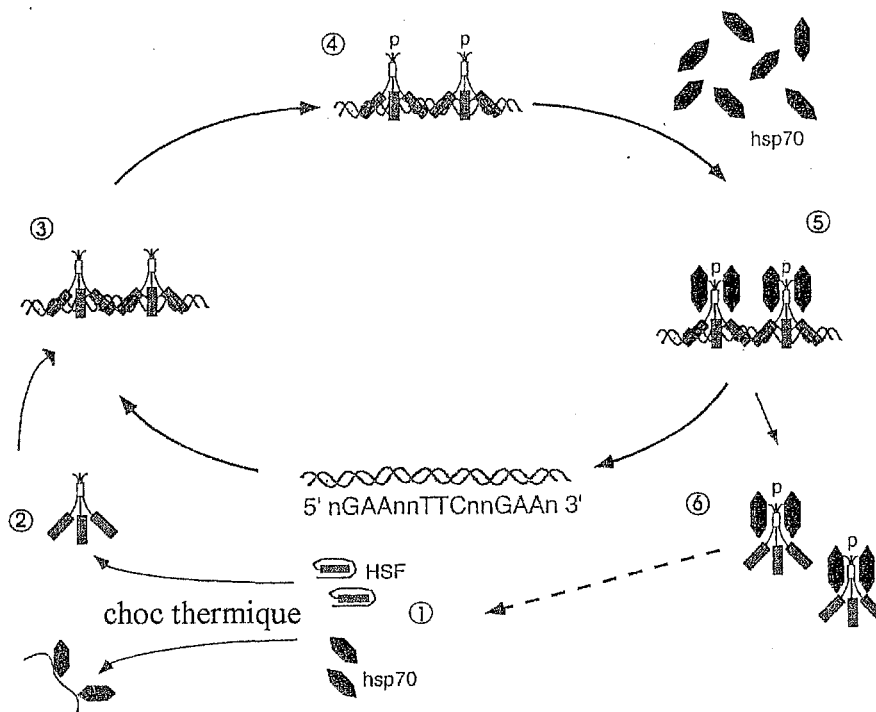


Figure 9 : Cycle de l'HSF : modèle de régulation d'HSF1 (Morimoto *et al.* 1994).

Dans des conditions physiologiques normales, HSF1 est maintenu dans un état monomérique de non fixation à l'ADN par «interaction» avec une HSP70, celle-ci permettant probablement une stabilisation spécifique de cette conformation d'HSF1. (1)

Lors d'un choc thermique, l'apparition d'une grande quantité de protéines anormalement repliées ou sous forme d'agrégats permet l'obtention d'un pool important de nouveaux substrats protéiques, qui vont «entrer en compétition» avec les HSF1 au niveau des HSP70. Ainsi le choc thermique, et par extension d'autres types de stress, se retrouve à l'origine des mécanismes qui permettent une levée de l'influence inhibitrice d'HSP70 sur l'activité de fixation à l'ADN d'HSF1.

HSF1 subit alors une trimérisation (2), il gagne le noyau pour se fixer à l'ADN (3), et fait l'objet d'une phosphorylation permettant l'acquisition de son activité transcriptionnelle (4).

S'ensuivent une transcription des gènes *du choc thermique*, une synthèse et une accumulation d'HSP et notamment d'HSP70, qui interagissent à leur tour avec les HSF1 et interfèrent avec leurs activités (5) et (6). Ces événements semblent être tout à fait importants, en ce qui concerne la régulation de l'activité transcriptionnelle et le retour des HSF1 sous une forme monomérique.

III.5 Les HSF font l'objet d'une régulation rédox (Jacquier-Sarlin *et al.* 1996).

Les HSP représentent une réponse essentielle vis-à-vis du stress cellulaire en général et vis-à-vis du stress oxydatif en particulier. Un stress oxydatif est responsable de la production, au

sein des cellules, de métabolites actifs de l'oxygène, ou RLO, pour «Radicaux Libres de l'Oxygène». Ces RLO sont toxiques pour les cellules et les tissus, et peuvent causer de multiples dommages cellulaires, allant d'altérations de la structure des protéines et des systèmes enzymatiques, à la peroxydation des lipides et aux lésions directes de l'ADN. Par ailleurs, ces métabolites actifs de l'oxygène sont capables d'induire la synthèse des HSP.

Une double régulation des HSF, par des oxydants générateurs de RLO, a pu être mise en évidence (voir figure 10) :

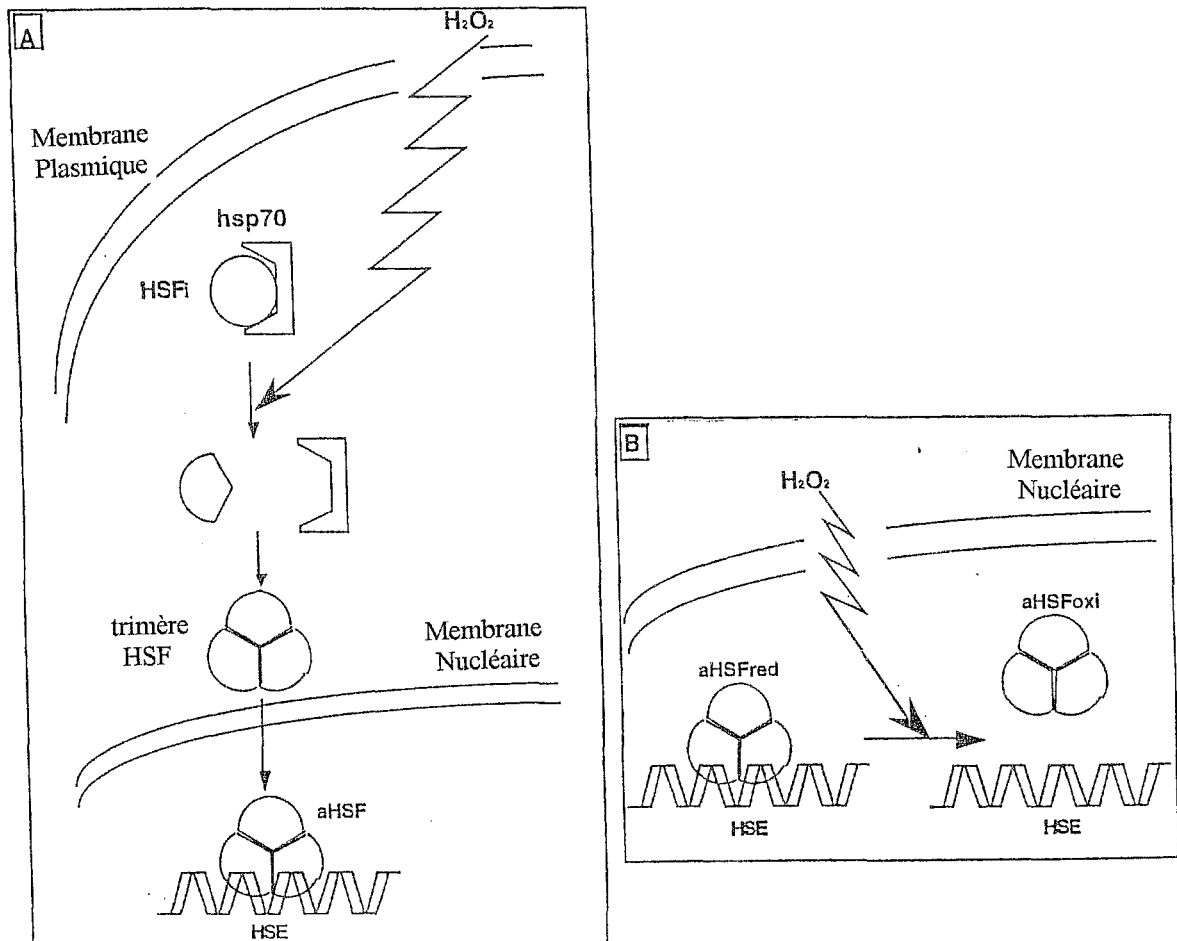


Figure 10 : Double régulation des HSF par le H_2O_2 (à partir de Jacquier-Sarlin *et al.* 1996).

- A : Un oxydant comme le H_2O_2 est capable d'induire chez les HSF l'acquisition d'une activité de fixation à l'ADN. Le H_2O_2 permet une dissociation des «complexes» HSF/HSP70 et le relargage d'HSF inactifs (HSFi). Il favorise ensuite un passage de ces facteurs sous une forme trimérique active (aHSF), capable de se fixer à l'ADN. Les aHSF font alors l'objet d'une translocation nucléaire, ils interagissent avec les HSE et activent la transcription des gènes *HSP*.

- B : Tandis que des aHSF sous une forme réduite (aHSFred) sont capables d'une interaction efficace avec les HSE, des aHSF oxydés par le H_2O_2 (aHSFoxi) perdent toute activité de fixation à l'ADN.

Cette double régulation semble être sous le contrôle d'une petite protéine ubiquitaire, la thiorédoxine (TRX), dont le site actif renferme deux résidus cystéine. Ces résidus, lorsqu'ils se présentent sous forme réduite, se comportent comme des donneurs d'hydrogène, permettant la réduction de ponts disulfures protéiques. Ainsi, la TRX se comporte comme un chaperon moléculaire, qui, en fonction de l'environnement rédox et de la nature du substrat polypeptidique, est capable de catalyser l'oxydation ou la réduction de groupements thiols ou de ponts disulfures, au sein des protéines substrats.

Les HSF renferment, au sein de leur domaine de fixation à l'ADN, des résidus cystéine, dont le caractère oxydé ou réduit influence l'activité de fixation des facteurs. Ces résidus représentent des substrats pour les RLO, conduisant à une oxydation des HSF, qui deviennent alors incapables de se fixer aux HSE.

La figure 11 résume schématiquement le rôle de la TRX dans la régulation rédox de l'HSF :

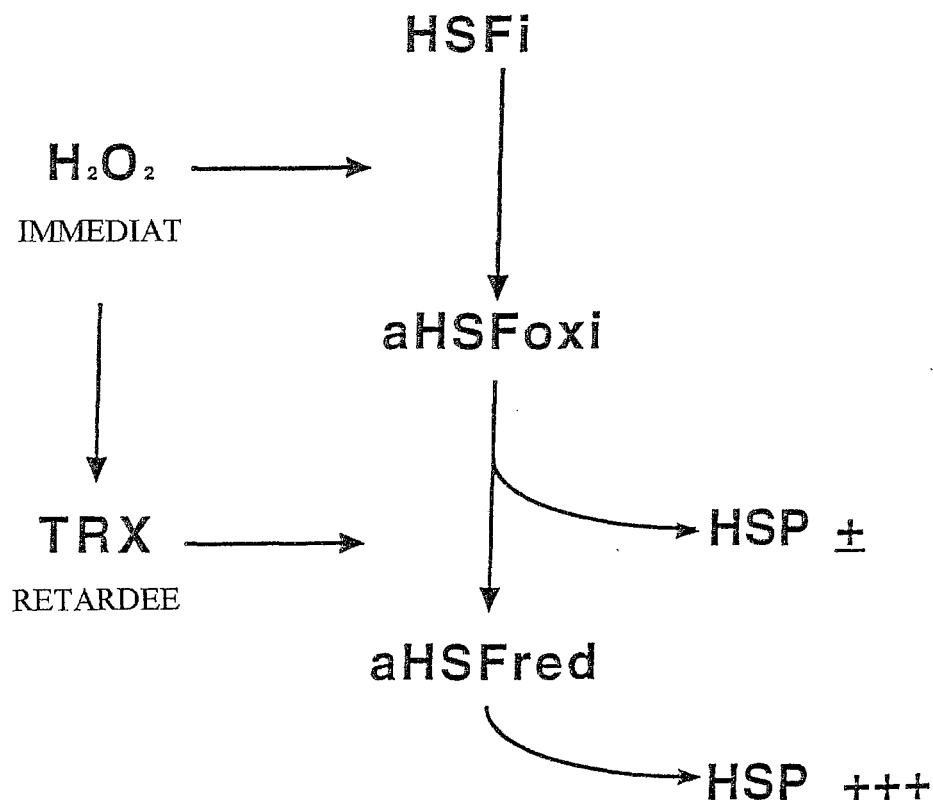


Figure 11 : Régulation de l'HSF par la thiorédoxine (à partir de Jacquier-Sarlin *et al.* 1996).

A la suite d'une exposition à un stress oxydatif, l'HSP70 se dissocie de l'HSF, permettant au facteur de subir une trimérisation et une translocation nucléaire (\rightarrow aHSF). Cet aHSF fait l'objet d'une oxydation, qui le rend incapable d'interagir efficacement avec l'HSE ; ceci aboutit à l'obtention de faibles taux de synthèse HSP (HSP \pm). Parallèlement, mais avec un certain délai, l'expression de la TRX est augmentée. Elle catalyse alors la transformation de la forme aHSF_{oxi} en une forme aHSF_{red}, qui, contrairement à l'aHSF oxydé est capable d'interagir efficacement avec l'HSE et permet une synthèse active d'HSP (HSP+++).

III.6 Vieillessement et réponse transcriptionnelle au choc thermique (Liu *et al.* 1996 ; Holbrook *et al.* 1994).

Le phénomène de vieillissement se caractérise par une diminution progressive de la capacité d'adaptation d'un organisme ou d'une cellule aux changements environnementaux. Ce déclin fonctionnel, que l'on observe aussi bien au niveau cellulaire, tissulaire, qu'au niveau d'un organisme en entier, contribue, au même titre qu'un dysfonctionnement des mécanismes homéostatiques, à une augmentation de la morbidité et de la mortalité liée à l'âge.

Il est actuellement communément admis que les protéines du choc thermique jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie et dans la résistance des cellules face à un environnement hostile. Une capacité diminuée, voire une incapacité des cellules et des organismes âgés à produire des HSP en réponse à un stress, pourrait favoriser la survenue de ce déclin fonctionnel lié au vieillissement.

Cependant, il semble important de noter que les modifications qui surviennent au sein de la cellule et entraînent une réponse atténuée au stress représentent un phénomène progressif, que l'on peut détecter chez des cellules n'ayant pas encore perdu leur capacité de réplication, donc qui ne concerne pas uniquement les cellules en fin de vie.

Les effets d'un traitement thermique sur l'induction de la synthèse des HSP au sein de cellules humaines de type fibroblastes, jeunes et âgées, ont été analysés : les deux types de cellules réagissent en produisant les mêmes familles de protéines ; cependant, la capacité d'induction des cellules âgées est significativement réduite, par rapport à celle des cellules plus jeunes.

De plus, les cellules âgées doivent être soumises à des températures plus élevées et durant une période plus longue, pour induire une réponse transcriptionnelle protectrice. Cette induction retardée et diminuée des HSP, que l'on observe au sein des cellules sénescents, s'accompagne d'une augmentation de la thermosensibilité de ces cellules, ce qui ne fait que renforcer l'idée que les HSP sont à l'origine du phénomène de thermotolérance cellulaire.

Cette différence dans l'expression des protéines du choc thermique entre cellules jeunes et âgées doit être rapportée aux mécanismes transcriptionnels. Une évaluation de l'activité de fixation à l'ADN des facteurs de transcription du choc thermique, ou HSF, a révélé que bien que l'affinité de fixation des facteurs ne variait pas en fonction de l'âge, leur capacité à acquérir cette activité de fixation à l'ADN était inversement corrélée à l'âge des cellules.

D'autres études ont, de la même manière, mis en évidence dans des hépatocytes de rats âgés, suite à un choc thermique, une diminution d'environ 40 à 50 % de l'induction de la synthèse d'HSP70, des taux d'ARNm, de la transcription du gène *HSP70* et de l'activité de fixation à l'ADN des HSF, par rapport à des cellules isolées à partir d'animaux jeunes ou adultes.

L'implication d'une réponse transcriptionnelle atténuée dans la biologie du vieillissement a été renforcée par l'observation que la restriction calorique, seul régime actuellement connu permettant de retarder le vieillissement et d'augmenter la survie des mammifères, était capable d'inverser le processus du déclin lié au vieillissement, au niveau de l'induction de la transcription des HSP70 au sein des hépatocytes.

Des expérimentations supplémentaires, portant sur l'exposition d'un organisme en entier à une température élevée, ont permis de mettre en évidence deux points essentiels :

- il existe, chez les animaux âgés, une tendance générale au développement d'une réponse au choc thermique atténuée ;
- l'importance de cette réponse varie selon le type de cellule, de tissu, d'organe, et selon l'animal considéré. Une étude comparative de l'induction d'ARNm HSP70 au sein des différents organes d'animaux plus ou moins âgés, a montré l'existence d'un déclin fonctionnel lié à l'âge au niveau du cerveau, des poumons, de la peau, tandis que l'expression des HSP70 au sein du foie s'est révélée naturellement faible et sans lien apparent avec l'âge.

Dans le but d'établir de façon un peu plus précise l'implication d'une réponse transcriptionnelle atténuée dans la biologie du vieillissement, il a été proposé de déterminer si l'expression d'HSP70, induite par des stress physiologiques ou environnementaux autres que le choc thermique, faisait également l'objet d'une atténuation liée au vieillissement. L'étude a porté sur des rats adultes et âgés, pour lesquels l'exposition à un stress consistait en une contrainte physique partielle. L'expression d'HSP70 induite par ce type de stress au sein du modèle animal est liée à une activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et à une stimulation du système nerveux sympathique. De ce fait, elle présente l'avantage d'une réponse rapide, spécifique de certains tissus que sont la glande surrénalienne et certains vaisseaux (aortes thoracique et abdominale, veine cave), et dont la régulation est à la fois ACTH dépendante au niveau des surrénales, et sous contrôle adrénergique au niveau des vaisseaux. Ainsi, il a été démontré que même si les réponses surrénales et vasculaires étaient différemment régulées, les animaux âgés présentaient, au sein des deux types de tissus, une expression d'HSP70 significativement diminuée par rapport aux animaux plus jeunes. Un point cependant mériterait d'être précisé, à savoir si l'expression atténuée des HSP70, que l'on observe chez les rats âgés, provient de modifications fonctionnelles de l'activité hypothalamo-hypophyso-surrénalienne, ou d'une réelle altération des cellules et tissus cibles, donc des mécanismes impliqués dans l'expression des gènes *HSP*.

Une évaluation des taux d'activité de fixation à l'ADN des HSF, chez des rats jeunes et âgés, soumis à une contrainte physique, a également été réalisée. Ainsi, des taux d'activité significativement diminués ont été mis en évidence chez les animaux les plus âgés. Une détermination de l'activité constitutive, que l'on observe chez les animaux non soumis à un stress, a également révélé l'existence d'une disparité entre les modèles jeunes et âgés.

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliciter la perte d'activité de fixation à l'ADN chez les animaux âgés :

- une diminution de l'expression et des taux d'HSF chez l'animal âgé,
- une activité moindre des mécanismes activateurs d'HSF1 chez les modèles âgés, en raison d'une altération de la perception et de la transduction du signal du choc thermique, ou à cause de changements survenant dans la biochimie et/ou la localisation subcellulaire d'HSF1, ce qui diminuerait la capacité du facteur à subir une trimérisation et donc une activation.

En fait, il a été démontré que les taux d'HSF1 demeureraient inchangés quel que soit l'âge et qu'une capacité diminuée à se fixer à l'ADN devait être directement attribuée à une moindre capacité du choc thermique à promouvoir la trimérisation. Ainsi, tandis que l'expression des

HSF1 ne paraît pas modifiée par le phénomène du vieillissement, leur capacité à percevoir le choc thermique et à subir une trimérisation semble s'atténuer avec l'âge.

Une autre notion importante est celle de la probable implication d'un mécanisme rédox dans le processus de transduction du signal du choc thermique. L'existence d'un tel mécanisme oxydo-réducteur au sein du processus conduisant à l'activation des HSF pourrait avoir d'importantes implications dans l'analyse des bases biochimiques et moléculaires de la réponse au choc thermique chez les cellules âgées.

L'hypothèse avancée est que les changements qui surviennent dans le statut rédox des cellules vieillissantes pourraient influencer sur de nombreux processus de transduction de signaux ainsi que sur les fonctions d'un certain nombre de facteurs de transcription, tels que la réponse au choc thermique et l'HSF1 respectivement.

IV - Rôles des HSP70, en tant que chaperons moléculaires, dans le repliement des protéines

Un chaperon moléculaire est une protéine capable de se fixer à une autre protéine se présentant dans une conformation instable, permettant ainsi une stabilisation de sa structure. Par un contrôle de la fixation et du relargage de la protéine dite substrat, le chaperon lui assure une conformation adaptée au sein de la cellule :

- repliement et acquisition d'une structure tridimensionnelle,
- assemblage sous forme d'oligomère,
- translocation dans différents compartiments intracellulaires tels que la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique (RE).

Sur la base de cette définition, la plupart des protéines du choc thermique, dont HSP70, ont été reconnues comme présentant des fonctions de type chaperon moléculaire, vis à vis des polypeptides nouvellement synthétisés au sein de la cellule.

IV.1 Problème d'un repliement correct des polypeptides nouvellement synthétisés au sein du milieu cellulaire (Hendrick *et al.* 1993 ; Frydman *et al.* 1994)

En principe, l'information nécessaire à l'obtention d'une structure protéique repliée tridimensionnelle (= état natif) est contenue dans la séquence des acides aminés de la chaîne polypeptidique naissante. Cependant, le mécanisme par lequel une chaîne polypeptidique, à partir d'un état déplié, acquiert une conformation thermodynamiquement stable et définie, demeure encore incomplètement établi. Ce que l'on sait, c'est que ce processus passe par la formation d'intermédiaires dits «de repliement», dont les propriétés sont les suivantes :

- plus ou moins compacts,
- légèrement plus volumineux que la conformation native,

- de conformation proche de la structure protéique secondaire, mais comportant quelques interactions de type tertiaire,

- et d'une flexibilité conformationnelle plus proche de celle de l'état naissant que de celle de l'état natif.

Ces molécules présentent à leur surface des régions hydrophobes habituellement cachées à l'intérieur de la structure de la protéine native. Transitoirement exposées à la surface de la molécule, elles favorisent l'établissement d'interactions intermoléculaires et, par conséquent, la formation d'agrégats insolubles.

Au sein du milieu cellulaire, la concentration élevée en protéines et notamment en polypeptides naissants, favorise la formation de ces interactions intermoléculaires improductives, puisqu'elles empêchent un repliement correct des protéines.

Les polypeptides nouvellement synthétisés émergent des ribosomes ou des membranes subcellulaires de type membranes du RE, en présentant en premier leur extrémité amino-terminale, mais leur repliement ne peut s'effectuer avant que la synthèse ne soit complètement terminée. Ainsi donc, l'acquisition d'une structure tertiaire stable nécessite la présence complète du polypeptide, ou tout au moins celle d'un domaine particulier de la structure, dit «domaine de repliement» (habituellement une séquence de 100 à 200 acides aminés). Avant l'obtention de cette longueur de chaîne, les polypeptides, encore fixés aux ribosomes, se présentent donc sous forme de chaînes partiellement repliées, qui possèdent une tendance naturelle à l'établissement d'interactions aberrantes.

Les cellules, dans le but de prévenir les associations intermoléculaires incorrectes des chaînes polypeptidiques et de promouvoir un repliement correct de ces mêmes chaînes, ont développé une stratégie basée sur l'intervention de chaperons moléculaires, tels que les membres de la famille HSP70.

IV.2 Importance du rôle de l'ATP (Hendrick *et al.* 1993 ; Frydman *et al.* 1994).

Le rôle des chaperons moléculaires se situe à deux niveaux :

- par fixation à la protéine substrat se présentant dans une conformation non native, ils permettent une stabilisation et une protection de la structure,

- par relargage de cette même protéine, ils favorisent un repliement correct et l'acquisition de la conformation finale attendue.

Ces réactions sont étroitement liées à la présence d'ATP hydrolysable (ATP hydrolyse ADP + Pi), qui module le degré d'affinité d'HSP70 vis à vis de son substrat. Plus précisément, il a été démontré qu'une fixation d'ATP au niveau du chaperon moléculaire DnaK (l'HSP70 cytosolique chez *E. Coli*) s'accompagnait de changements conformationnels, qui se traduisent par une diminution de l'affinité du chaperon pour le polypeptide substrat. Ainsi, la dissociation de la protéine fixée est déclenchée par la fixation d'ATP, et l'HSP70 est capable de passer d'un «état ADP» de haute affinité à un «état ATP» de faible affinité, pour un substrat donné.

Finalement, pour des concentrations en ATP physiologiques, l'affinité d'HSP70 pour les protéines est faible, tandis qu'une présence ADP au niveau de la protéine aura plutôt tendance à renforcer son interaction avec le substrat. Etant donnée la meilleure affinité d'HSP70 pour l'ADP, un substrat étroitement lié à la protéine le restera, jusqu'à ce que le nucléotide soit remplacé par de l'ATP.

IV.3 L'interaction HSP70/protéine substrat fait intervenir, chez les deux partenaires, des séquences d'acides aminés hydrophobes (Hendrick *et al.* 1993 ; Frydman *et al.* 1994 ; Hartman *et al.* 1996).

Les chaperons moléculaires ont en commun la capacité de reconnaître des éléments structuraux particuliers, exposés à la surface de protéines dépliées ou de protéines partiellement dénaturées.

Une étude, réalisée dans le but de déterminer les spécificités de fixation peptidique d'une HSP70 particulière, la protéine BiP (présente dans le RE de cellules de mammifères), a démontré que ce chaperon interagissait préférentiellement avec de petits peptides heptamériques, constitués d'une alternance de résidus hydrophobes et aromatiques.

Une approche plus précise de l'interaction a mis en évidence qu'une séquence de deux acides aminés hydrophobes et correctement espacés suffisait à l'obtention d'une interaction efficace, ce qui finalement présente l'avantage d'un motif suffisamment simple pour être présent dans la plupart des protéines.

Ainsi, les protéines auxquelles se fixent les HSP70 sont des structures qui exposent à leur surface des séquences d'acides aminés hydrophobes, habituellement cachées à l'intérieur de la molécule correctement repliée, et qui sont reconnues par l'extrémité C-terminale, elle-même recouverte de résidus hydrophobes, de l'HSP70.

IV.4 Les facteurs dits de «coopération» (Hendrick *et al.* 1993 ; Frydman *et al.* 1994 ; Hartman *et al.* 1996).

Le maintien d'un polypeptide nouvellement synthétisé dans une conformation dépliée implique généralement la formation d'un complexe, faisant intervenir à la fois une HSP70 et d'autres facteurs cytosoliques, ainsi qu'une régulation spécifique de l'HSP70.

En effet, il a été démontré que la plupart des fonctions cellulaires de la DnaK bactérienne nécessitent la coopération de deux facteurs supplémentaires :

- la protéine DnaJ, un chaperon de 45 KDa de la famille des protéines du choc thermique, exprimée de manière constitutive dans la cellule et active sous forme de dimère,
- la protéine GrpE, un facteur de 20 KDa, responsable des échanges nucléotidiques.

L'identification de multiples homologues de DnaJ au sein des cellules eucaryotes démontre le caractère général du mécanisme par lequel DnaK est régulée.

Les effets de DnaJ et de GrpE sur DnaK ont été mis en évidence par des expériences *in vitro*. Il a ainsi été prouvé que les deux protéines interagissaient avec DnaK : DnaJ d'une part, en stimulant l'activité ATPase de DnaK, donc l'hydrolyse de l'ATP fixé à la protéine, GrpE d'autre part, en favorisant l'échange d'une molécule d'ADP contre une molécule d'ATP. En présence de DnaJ et de GrpE, l'activité ATPase de DnaK peut ainsi être stimulée jusqu'à 50 fois.

Un autre processus cellulaire est apparu comme faisant intervenir une coopération entre DnaK, DnaJ et GrpE : il s'agit de la régulation de la transcription des gènes *du choc thermique*, en réponse à différents types de stress cellulaires.

Dans des conditions normales de croissance, le facteur de transcription du choc thermique bactérien, σ^{32} , forme un complexe avec DnaK, DnaJ et GrpE, ce qui permet une dégradation rapide de ce facteur, dont la demi-vie est alors de l'ordre de quelques minutes. Lors d'une exposition à un stress thermique, c'est-à-dire en présence d'une production croissante de protéines dénaturées, le facteur σ^{32} est déplacé du complexe qu'il formait avec DnaK et DnaJ, et devient alors capable d'interagir avec le mécanisme de la transcription.

Cet exemple de coopération entre DnaK, DnaJ et GrpE a quelque chose de remarquable, en ce sens qu'il s'agit d'une interaction mettant en jeu des chaperons d'une part, et une protéine normalement repliée, qu'est le facteur σ^{32} , d'autre part. Ainsi, il semble possible que des protéines « natives » exposent à leur surface, et de manière transitoire, les éléments structuraux hydrophobes habituellement présentés par les structures dépliées, et soient donc reconnues par des chaperons. Le phénomène de relargage qui suit semble être le résultat de changements conformationnels, survenant au sein de ces protéines natives et entraînant une perte d'affinité pour le chaperon.

En ce qui concerne les cellules eucaryotes, certains homologues de DnaJ ont été identifiés dans différents compartiments cellulaires tels que le cytosol, le RE, la mitochondrie et le noyau, tandis qu'un seul homologue de GrpE a été mis en évidence au sein de la matrice mitochondriale.

Chez la levure par exemple :

- la protéine Ydj1p est un homologue cytosolique de la DnaJ bactérienne, et semble intervenir, en coopération avec l'HSP70 cytosolique Ssa1p, dans le phénomène de translocation protéique au sein de la mitochondrie et du RE.
- les membranes du RE renferment un autre type de protéine structurellement apparentée à DnaJ, la protéine Sec63p, qui coopère avec l'HSP70 du RE Kar2p, dans la translocation protéique.

Ces protéines ont en commun une séquence d'environ 70 acides aminés appelée domaine J, dont on pense qu'elle est le site d'interaction avec l'HSP70 correspondante. Une interaction directe entre les polypeptides dépliés et les homologues eucaryotes de DnaJ n'a pu être mise en évidence, contrairement à ce que l'on observe chez les procaryotes. Il semblerait ainsi que ces différentes protéines n'interagissent directement qu'avec la représentante HSP70 qui leur correspond, en régulant ses fonctions et sans intervenir auprès du polypeptide substrat.

IV.5 Hypothèse de mécanisme du repliement protéique faisant intervenir une coopération DnaK, DnaJ, GrpE (voir figure 12) (Hendrick *et al.* 1993 ; Frydman *et al.* 1994).

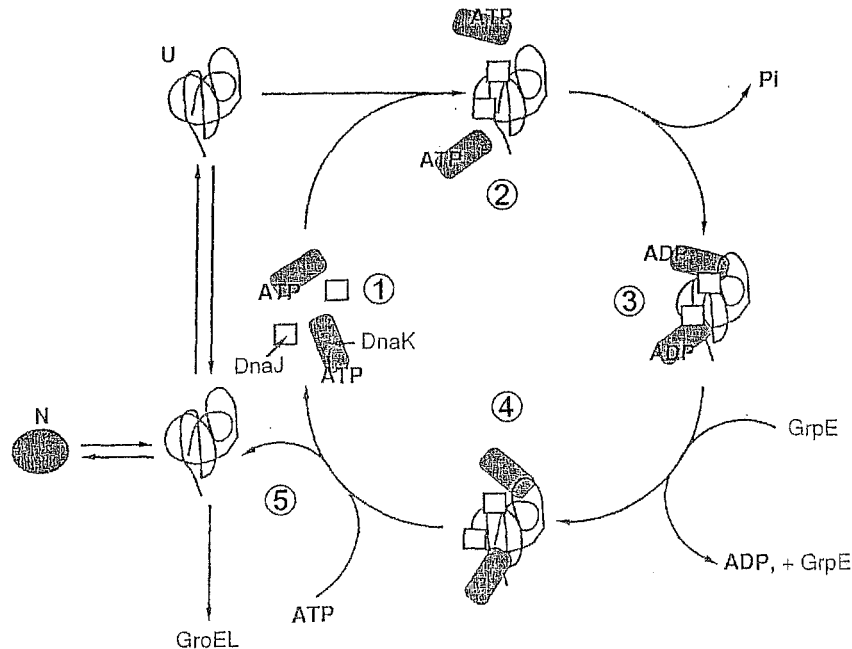


Figure 12 : Modèle pour un cycle réactionnel faisant intervenir DnaK, DnaJ et GrpE, dans le repliement protéique (Frydman *et al.* 1994).

(1) En l'absence de protéine substrat, il n'existe qu'une très faible interaction entre les protéines DnaK et DnaJ. Dans des conditions physiologiques, DnaK se présente sous une forme fixant l'ATP et n'ayant donc que peu d'affinité pour les peptides et polypeptides dépliés.

(2) L'interaction débute par une fixation de la protéine substrat au niveau de DnaJ.

(3) Le complexe formé est alors capable de stimuler l'activité ATPase de DnaK et de stabiliser le chaperon sous sa nouvelle forme fixant l'ADP. Ceci permet l'obtention d'une interaction étroite entre DnaK d'une part et le substrat stabilisé par DnaJ d'autre part.

(4) L'intervention de GrpE au niveau de ce complexe ternaire se traduit par une défixation de l'ADP, qui rend l'interaction DnaK/polypeptide moins étroite.

(5) S'ensuit une fixation rapide d'ATP au niveau de DnaK, qui s'accompagne encore d'une diminution de l'affinité du chaperon pour son substrat, et donc d'un relargage de la protéine fixée. Cette protéine peut alors soit se replier et acquérir spontanément sa conformation native, soit être transférée à un autre «système» de chaperons comportant une HSP60 bactérienne GroEL, et son facteur de coopération GroES, soit enfin réintégrer le cycle précédant par une nouvelle fixation à DnaJ.

En effet, un seul cycle de fixation et de relargage est parfois insuffisant à l'acquisition d'une structure correctement repliée (et notamment dans le cas de certaines protéines dénaturées). L'hydrolyse de l'ATP est toujours nécessaire à la formation du complexe ternaire entre la protéine substrat, DnaK et DnaJ, et autorise l'obtention de multiples cycles d'interactions.

Remarque : à propos des polypeptides naissants (Hendrick *et al.* 1993 ; Frydman *et al.* 1994 ; Hartman *et al.* 1996).

Puisque l'acquisition d'une structure tertiaire stable nécessite l'existence d'un domaine polypeptidique complet, le phénomène de repliement ne peut avoir lieu pendant l'étape de traduction (= traduction de l'ARNm en une succession d'acides aminés formant le polypeptide), alors même que le polypeptide émerge du ribosome. Cette chaîne polypeptidique naissante demeure donc dans un état déplié ou partiellement plié pendant toute la durée de la synthèse, et c'est alors que le rôle d'HSP70 prend toute son importance : elle va permettre de prévenir tout repliement incorrect et toute agrégation des chaînes entre elles, en protégeant leurs régions hydrophobes des interactions abusives. Il semble même possible que la fixation d'une HSP70 au niveau d'une chaîne naissante facilite son passage à travers la «voie de sortie» ribosomale, de la même manière qu'une HSP70 mitochondriale ou du RE favorise la translocation protéique à travers les membranes subcellulaires.

La protéine Dna J semble pouvoir se fixer au niveau du polypeptide naissant très tôt au cours de la traduction, ce qui autorise une interaction co ou post-traductionnelle avec DnaK. DnaJ, en se fixant la première sur le polypeptide et en dirigeant l'HSP70 vers son substrat, a donc un rôle important de sélection des polypeptides en vue d'une fixation aux chaperons moléculaires.

V - Rôle des HSP70, en tant que chaperons moléculaires, dans la translocation des protéines à travers les membranes subcellulaires

Les mécanismes du transport des protéines à l'intérieur des différents compartiments cellulaires reposent sur des principes actuellement bien définis. Les chaînes polypeptidiques traversent les membranes biologiques au niveau de pores protéiques. Pour ce faire, elles doivent se présenter devant la double couche lipidique dans une conformation dite «apte à la translocation», c'est à dire dans un état pouvant être déplié ou partiellement replié. Une fois la traversée effectuée, elles peuvent alors se replier et acquérir une structure native stable. Le passage des protéines par différentes conformations tout au long de ce processus est modulé par des chaperons moléculaires de type HSP70.

V.1 La mitochondrie (Hendrick *et al.* 1993 ; Langer *et al.* 1994).

V.1.1 La plupart des protéines mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol

Bien que la mitochondrie possède son propre ADN et des systèmes indépendants pour la réplication et la synthèse protéique, environ 95 % de la masse totale des protéines mitochondriales sont codées dans le noyau. Ces protéines sont ensuite synthétisées au niveau des ribosomes cytoplasmiques, la plupart sous forme de précurseurs protéiques, qui possèdent au sein de leur domaine amino-terminal une pré-séquence, comportant l'information nécessaire à la translocation intra-mitochondriale. Ce phénomène survient en période post-traductionnelle. Il est suivi d'une répartition des protéines dans les différents compartiments mitochondriaux, tels que les membranes interne et externe, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale.

V.1.2 Les protéines mitochondriales présentent une conformation particulière au cours de la translocation membranaire

Les deux membranes mitochondriales formant une barrière d'environ 10-12 nm de large, il a été démontré qu'une cinquantaine de résidus acides aminés suffisait à les traverser simultanément. Ainsi, les précurseurs protéiques ne traversent pas ces membranes dans leur conformation native : la portion protéique en cours de translocation doit présenter une structure souple, de type feuillet β plutôt que de type hélice α .

Il est, de plus, tout à fait improbable que les précurseurs se présentent dans une conformation totalement dépliée, si l'on considère que ce type de structure s'accompagne d'un risque important d'agrégation.

Ainsi, les protéines semblent traverser les membranes mitochondriales dans une conformation de type «molten globule», qui se caractérise par la présence d'éléments structuraux secondaires et d'une structure tertiaire incomplètement organisée. Il s'agit d'une conformation maintenue dans un état de repliement lâche, qui empêche tout risque d'agrégation tout en permettant une certaine flexibilité, et qui autorise, lors de la traversée de la membrane, l'obtention d'une structure plus relâchée.

V.1.3 Une chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée et destinée à la mitochondrie peut être «préparée» à la translocation de différentes manières (voir figure 13).

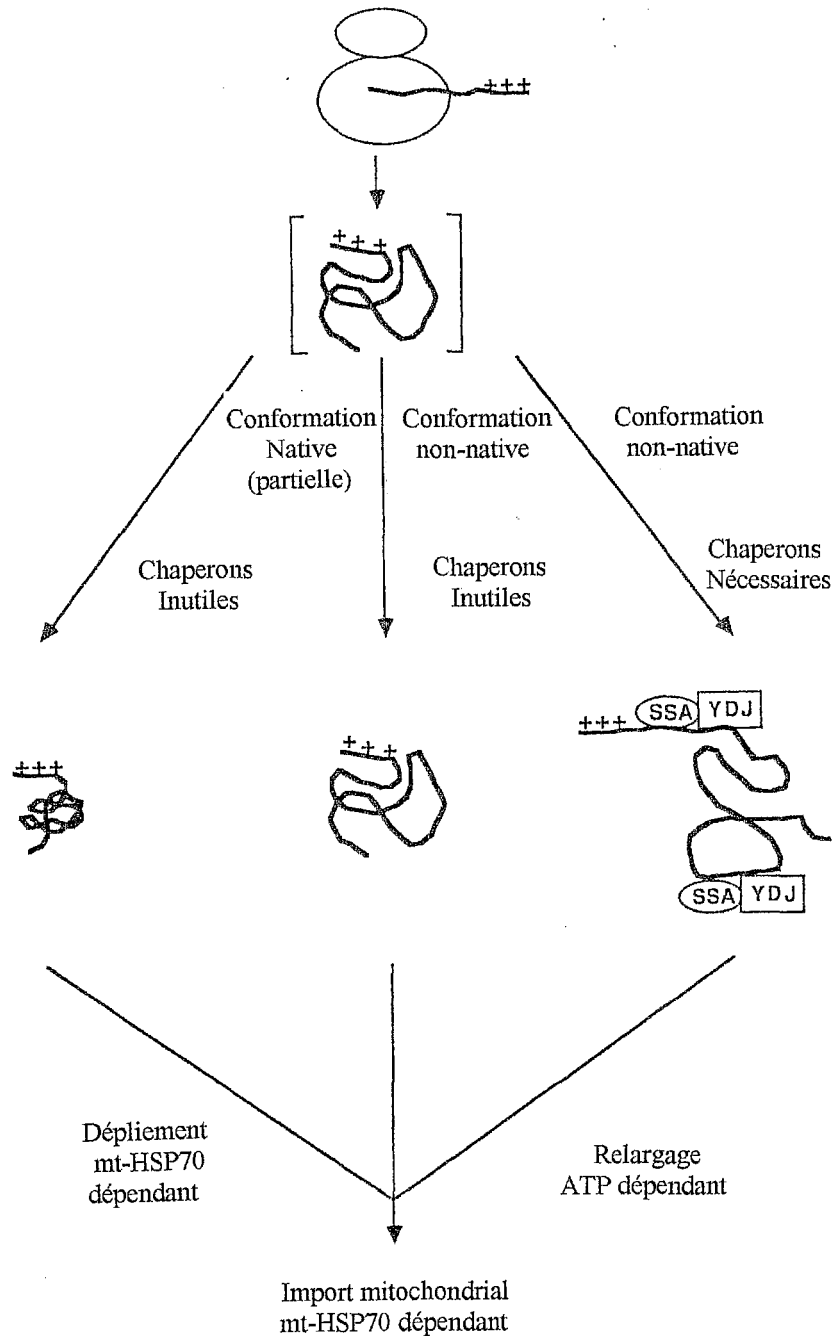


Figure 13 : Proposition de mécanismes permettant un maintien des précurseurs protéiques dans un état «apte à la translocation» au sein du cytoplasme. (SSA) Ssa1p/Ssa2p ; (YDJ) Ydj1p (Langer *et al.* 1994).

D'une façon très générale, il existe pour tout précurseur protéique destiné à la translocation, deux possibilités de devenir en attendant la prise en charge mitochondriale :

- soit la chaîne polypeptidique acquiert son état natif dans le cytoplasme et se déplie juste le temps de la traversée membranaire,
- soit elle est maintenue dans un état partiellement replié, qui n'est pas son état natif, jusqu'à l'importation dans la mitochondrie.

Dans le deuxième cas, il est possible d'attribuer un rôle déterminant à la portion de chaîne appelée pré-séquence, en ce qui concerne la modulation du degré de repliement de la molécule précurseur. Après la translocation, des protéases mitochondriales spécifiques sont capables de couper la pré-séquence, ce qui permet l'acquisition de la structure native. Cependant, la pré-séquence n'est pas suffisante à un maintien prolongé de la conformation dans un état «apte à la translocation». Ainsi, des facteurs cytoplasmiques ATP dépendants ont été identifiés comme intervenant dans la stabilisation des précurseurs protéiques en prévenant leur repliement et leur agrégation : il s'agit de chaperons moléculaires de la famille des HSP70 cytosoliques.

Enfin, un repliement des précurseurs protéiques en l'absence de chaperons cytoplasmiques ne s'accompagne pas forcément d'une abolition de l'aptitude à la translocation. Un dépliement de la structure peut survenir au moment de la traversée, dépliement dû à un mécanisme mitochondrial faisant notamment intervenir une HSP70 intramitochondriale : la protéine mt-HSP70.

V.1.4 Rôle de facteurs cytoplasmiques de ciblage ?

Bien que les chaperons HSP70 cytoplasmiques soient impliqués dans l'importation des protéines à l'intérieur de la mitochondrie (et du RE), l'interaction de ces chaperons avec les pré-séquences protéiques, si elle existe, ne semble pas favoriser un ciblage spécifique de l'organite. Malgré tout, les chaperons pourraient permettre une stabilisation des précurseurs protéiques, dans une conformation qui autoriserait une interaction de la pré-séquence avec des récepteurs protéiques spécifiques, à la surface de la mitochondrie.

Néanmoins, des facteurs cytoplasmiques, capables de se fixer spécifiquement aux pré-séquences mitochondriales, ont été identifiés au sein de cellules de mammifères :

- le facteur PBF (pré-séquence-binding factor) a été purifié à partir de réticulocytes de lapin. Son mode d'action n'est pas encore complètement connu, mais il a été suggéré que ce PBF pouvait moduler la conformation des précurseurs protéiques, en collaboration avec les HSP70. Il confère à la chaîne polypeptidique une spécificité mitochondriale accrue.
- le facteur MSF, pour «mitochondrial-import-stimulating», a été isolé à partir d'un foie de rat. Il est également doté d'une activité de type ATPase. Ainsi, ce MSF pourrait constituer un nouveau type de chaperon moléculaire, spécifique des précurseurs protéiques mitochondriaux et doté une double fonction : celle de reconnaître les pré-séquences et de conférer aux précurseurs protéiques une aptitude à la translocation, et celle de «diriger» les précurseurs protéiques vers la mitochondrie.

Finalement, l'importance respective des facteurs cytoplasmiques et des HSP70, vis à vis de l'importation mitochondriale des protéines, n'a pas encore été totalement éclaircie. Il pourrait exister une coopération de tous ces facteurs, par interaction au niveau de différentes régions du précurseur protéique, permettant une stabilisation de la conformation dite «apte à la translocation», et un ciblage spécifique de l'organite mitochondrial.

V.1.5 Mécanisme de la translocation (voir figure 14)

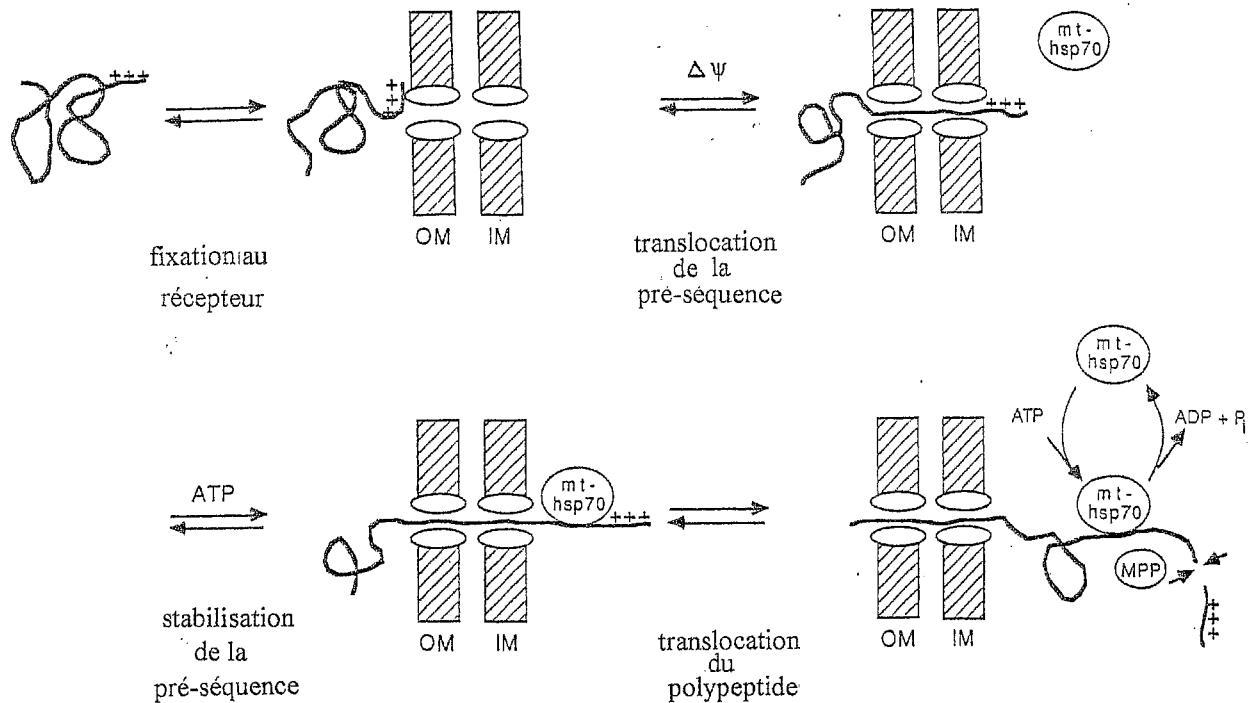


Figure 14 : mécanisme pour une translocation intra-mitochondriale des précurseurs protéiques, induite par mt-HSP70. (mt-HSP70) HSP70 mitochondriale ; (MPP) peptidase matricielle ; (OM) membrane mitochondriale externe ; (IM) membrane mitochondriale interne (Langer *et al.* 1994)

Les précurseurs protéiques sont spécifiquement reconnus par des récepteurs protéiques présents à la surface de la mitochondrie, qui font partie d'un complexe localisé dans la membrane externe. Ce complexe protéique est constitué de six protéines différentes, qui interviennent dans la fixation et l'insertion des chaînes polypeptidiques à l'intérieur du pore de translocation de la membrane externe.

La pré-séquence, localisée à l'extrémité amino-terminale de la protéine, est la première à traverser la membrane externe au niveau du pore de translocation et à entrer en contact avec les composants de la membrane interne.

La traversée de la membrane interne dépend d'une part du potentiel membranaire, et d'autre part de la charge de la pré-séquence. En effet, le potentiel électrique de la membrane pourrait soit exercer une attraction de type électrophorétique de la pré-séquence chargée positivement,

soit modifier la conformation d'un composant de la membrane interne, de telle manière que la translocation soit déclenchée. Malgré tout, le potentiel de membrane ne semble pas suffire à l'obtention d'une translocation de la pré-séquence dans un état stable ; ainsi, il semble qu'en plus de ce potentiel, la présence d'ATP dans la matrice mitochondriale soit indispensable pour permettre à la séquence signal d'atteindre le compartiment matriciel.

Une fixation de la pré-séquence à l'HSP70 mitochondriale mt-HSP70 survient, alors que l'extrémité amino-terminale de la chaîne pénètre dans la matrice. Cette interaction, dépendante de la présence d'ATP, favorise une stabilisation de la séquence cible dans le compartiment matriciel, puis son clivage par une peptidase. Elle est également pourvoyeuse d'énergie, laquelle permet d'une part, en ce qui concerne la portion protéique restée à l'extérieur de la mitochondrie, le passage d'un état plus ou moins replié à un état déplié, capable de traverser les membranes, et d'autre part, la translocation de la chaîne polypeptidique en entier. Il est important de noter que la translocation complète d'une chaîne polypeptidique à travers les membranes mitochondriales nécessite plusieurs cycles ATP dépendants de fixation/relargage de la chaîne peptidique au niveau d'une mt-HSP70.

A la suite de leur interaction avec mt-HSP70, les polypeptides nouvellement importés sont transférés au niveau d'une HSP60 mitochondriale, dont dépend le repliement final de la chaîne, c'est-à-dire l'acquisition de la structure native, et toujours selon un mécanisme ATP dépendant.

Les interactions respectives des chaperons moléculaires HSP70 et HSP60 sont guidées par leur spécificité de fixation : HSP70 montre une plus grande affinité pour les chaînes polypeptidiques dans une conformation dépliée, tandis qu'HSP60 reconnaît préférentiellement un polypeptide en cours de repliement vers son état natif, et le stabilise sous une forme de type structure tertiaire désorganisée.

V.2 Le reticulum endoplasmique (Brodsky *et al.* 1994 ; Hartman *et al.* 1996).

Les protéines destinées à la translocation dans le RE présentent au sein de leur structure un peptide signal, dont le rôle est de conduire la chaîne naissante jusqu'aux membranes du RE. Le peptide signal est généralement constitué d'une séquence d'acides aminés non polaires, à l'extrémité amino-terminale de la protéine. Ce peptide signal peut être clivé par une peptidase lorsque le polypeptide importé émerge dans la lumière du RE ou lorsque la totalité de la chaîne a été transloquée.

La membrane du RE renferme des protéines qui agissent comme des perméases en délimitant un pore membranaire, et qui, par conséquent, facilitent le transport du polypeptide à travers la double couche membranaire.

Comme pour la translocation mitochondriale, les protéines destinées au RE traversent les membranes dans une conformation dépliée, puis, une fois dans la lumière du RE, se replient et acquièrent leur structure native. Là encore, un rôle primordial est réservé à des HSP70, dans ce phénomène de translocation à travers les membranes du RE.

V.2.1 Notion de translocation co et post-traductionnelle ; rôle d'une HSC70

Pour la plupart des protéines destinées au RE, la translocation peut débuter alors que la chaîne est encore en cours de synthèse. En fait, dès que le peptide signal émerge du ribosome, il se fixe au niveau d'une ribonucléoprotéine, désignée par les initiales SRP pour «Signal Recognition Particle».

La SRP possède trois fonctions :

- elle est capable d'arrêter ou de retarder la translocation,
- elle se fixe au peptide signal et le maintient dans une position accessible, à la surface de la protéine naissante,
- elle conduit le complexe ribosome/chaîne naissante jusqu'aux membranes du RE, grâce à une forte affinité pour un récepteur protéique membranaire, appelé «récepteur SRP» ou SR et constitué de deux parties : une sous-unité β membranaire et une sous-unité α périphérique. L'interaction de la SRP avec son récepteur membranaire provoque le relargage du peptide signal. Le mécanisme de la translocation commence lorsque la SRP se détache de son récepteur et donc de la membrane, selon une réaction qui nécessite une hydrolyse de GTP.

Certaines protéines ont la particularité de présenter une translocation post-traductionnelle, pouvant s'effectuer en l'absence de la SRP et de son récepteur. Il s'agit de petits précurseurs protéiques, d'environ 60 à 70 acides aminés, qui doivent être maintenus dans une conformation dépliée jusqu'à ce que la translocation ait lieu. Pour ce faire, l'intervention d'une HSC70 (= HSP70 exprimée de manière constitutive) cytosolique est nécessaire.

V.2.2 Les facteurs impliqués dans la translocation protéique post-traductionnelle à travers les membranes du RE (chez la levure) (voir figure 15)

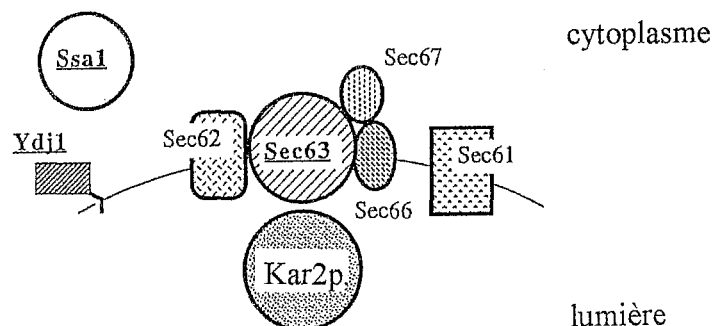


Figure 15 : Facteurs impliqués dans la translocation protéique post-traductionnelle à travers les membranes réticulaires, chez la levure (Brodsky *et al.* 1994).

Les protéines Sec61p, Sec62p et Sec63p ont été identifiées comme étant des constituants membranaires intervenant dans le mécanisme de la translocation.

Sec61p fait partie de ces protéines qui délimitent un pore transmembranaire, tandis que le rôle de Sec62p n'a pas encore été complètement déterminé.

Une HSC70 a été mise en évidence dans la lumière du RE : il s'agit de Kar2p, dont un homologue, la protéine BiP, a été décelé chez les mammifères. Elle présente plus de 50 % d'analogie avec DnaK d'*E. Coli*. La présence d'une telle protéine au sein du RE de levure permet d'envisager l'existence, au sein de ce compartiment réticulaire, d'un homologue de DnaJ, dont le rôle semble être précisément tenu par Sec63p. Cette protéine traverse trois fois la membrane du RE et possède, coté luminal, un domaine qui présente une certaine analogie avec DnaJ. L'orientation particulière de ce domaine par rapport à Kar2p laisse supposer l'existence d'une interaction entre les deux protéines. Cette interaction, dans laquelle le domaine dit de type DnaJ (= domaine J) joue le rôle de médiateur, est régulée par un mécanisme de fixation/hydrolyse d'ATP.

En fait, différentes HSC70 sont impliquées dans le phénomène de la translocation et sont spécifiquement désignées pour accomplir des fonctions précises :

- dans le cytoplasme, Ssa1p intervient probablement en interagissant avec son homologue de DnaJ, Ydj1p,
- dans la lumière du RE, Kar2p semble interagir spécifiquement avec Sec63p. Kar2p serait également capable de se fixer directement au polypeptide transloqué lorsqu'il émerge dans la lumière du RE.

Il a été démontré que les différents membres de la famille des protéines Sec impliqués dans la translocation formaient un complexe membranaire, au sein duquel ont été identifiées trois protéines supplémentaires : Sec66p et Sec67p qui font partie de la même famille, et une protéine de 91 KDa qui semble interagir directement avec Sec61p.

La quantité de Kar2p au sein du RE est nettement supérieure à celle de Sec63p. Ainsi, il semblerait qu'une majorité de Kar2p ne soit pas associée au complexe Sec63p, ce qui suggère que Kar2p possède d'autres rôles au sein du RE :

- une prise en charge des polypeptides nouvellement transloqués lorsqu'ils débouchent dans le compartiment luminal, dans le but de prévenir leur repliement incorrect et de les stabiliser, tant que la translocation n'est pas complète.
- une prise en charge des protéines dénaturées qui s'accumulent dans le compartiment luminal, suite à un stress cellulaire.

V.2.3 Hypothèse de mécanisme pour cette translocation intraréticulaire, toujours chez la levure (voir figure 16)

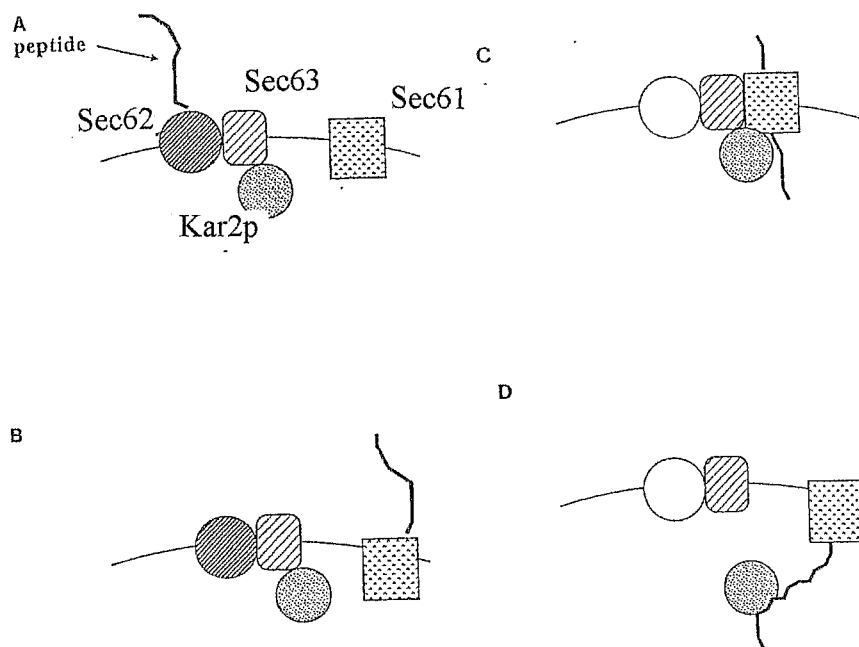


Figure 16 : Proposition de mécanisme pour une intervention de Kar2p dans la translocation intra-réticulaire chez la levure (Brodsky *et al.* 1994)

A- Le polypeptide naissant se fixe au niveau du complexe protéique «accepteur» de la membrane du RE, et, plus précisément, au niveau de la protéine Sec62p de ce complexe. Cette association entre polypeptide et composant membranaire ne nécessite pas d'énergie. En fait, le précurseur protéique est transféré à l'accepteur grâce à son relargage du chaperon cytoplasmique de type Ssa1p.

B- Le précurseur est ensuite transféré au niveau de la protéine Sec61p, qui interagit de façon beaucoup moins étroite avec les autres constituants du complexe, selon une réaction faisant intervenir de l'ATP et la protéine Sec63p. Kar2p, de par son activité ATPase, est également impliquée dans ce transfert.

C- La protéine Sec61p se retrouve intimement associée au polypeptide et au complexe de translocation ; là encore, Kar2p intervient pour favoriser le processus de translocation à travers le pore membranaire délimité par Sec61p.

D- Dans la lumière du RE, le polypeptide encore fixé au complexe de translocation interagit avec Kar2p, elle-même détachée du complexe, en attendant d'acquérir sa conformation repliée native.

Il existe deux façons d'envisager le mécanisme par lequel Kar2p prépare l'interaction du précurseur avec la protéine Sec61p :

- elle pourrait intervenir dans l'activation ou l'assemblage du complexe accepteur,
- elle pourrait favoriser une régénération de ce complexe, pour le préparer à une nouvelle translocation.

Mais comment Kar2p fait-elle pour transmettre une information au complexe de translocation, à travers la membrane du RE ?

Il est important de noter que par l'intermédiaire de son association avec Sec63p, Kar2p est indirectement reliée aux protéines Sec62p, Sec66p et Sec67p, qui sont des composants du complexe accepteur. La régulation de ce complexe pourrait alors reposer sur des changements conformationnels, déclenchés par la fixation ou l'hydrolyse d'ATP au niveau de Kar2p. Sec63p, à laquelle Kar2p est reliée via son domaine de type Dna J, pourrait être le transducteur de ce signal.

La protéine Kar2p est également impliquée dans une étape particulière de la translocation, qui se situe après la fixation du polypeptide au niveau de Sec61p : elle pourrait interagir indirectement avec cette protéine pour augmenter la fidélité de la translocation. En effet, Kar2p pourrait jouer un rôle primordial dans la promotion d'une force conductrice, qui garantirait le caractère unidirectionnel de la translocation.

Enfin, la prise en charge immédiate du polypeptide par Kar2p, au moment même où il pénètre dans la lumière, interdit toute éventuelle tentative de retour vers le milieu extraréticulaire.

En ce qui concerne les besoins énergétiques, le complexe formé par le précurseur et Kar2p présente un niveau énergétique plus bas que celui du polypeptide maintenu dans un état détendu, lorsqu'il traverse la membrane du RE. La fixation du précurseur polypeptidique à Kar2p fait intervenir une libération d'énergie par hydrolyse d'ATP, qui pourrait constituer la seule source d'énergie nécessaire à la translocation. Ainsi, il se pourrait que l'énergie libérée lors de l'interaction polypeptide/Kar2p soit le seul «moteur» de ce processus de translocation.

Lorsque la translocation est terminée, la chaîne polypeptidique est libérée, son repliement peut alors commencer.

En ce qui concerne les cellules de mammifères, une implication de l'HSC70 réticulaire, ou BiP, dans le processus de la translocation polypeptidique demeure un sujet beaucoup plus controversé. Certaines études concluent à une non intervention de la protéine BiP dans le processus de translocation : seuls semblent alors nécessaires, au niveau du RE, les récepteurs SR de la «Signal Recognition Particle» SRP, et un complexe membranaire, contenant notamment la protéine Sec61p de mammifères. L'énergie nécessaire à la traversée membranaire du polypeptide transloqué proviendrait des ribosomes lors de la synthèse protéique. A l'inverse, d'autres études ont démontré que des composants de la lumière du RE étaient indispensables à l'obtention d'une translocation complète.

Ainsi, les mécanismes de la translocation protéique au sein du RE pourraient être différents chez la levure et chez les eucaryotes dits supérieurs. Il est possible que, chez les mammifères, la protéine BiP puisse faciliter la translocation mais ne soit pas absolument nécessaire. Il est

également envisageable qu'une ou plusieurs autres molécules puisse(nt) remplacer le complexe Sec63p-BiP.

VI - Rôle des HSP70 dans la protection des cellules soumises à un choc thermique

Les chaperons moléculaires de type HSP70 jouent un rôle important lorsque la cellule est soumise à des températures élevées : elles lui permettent de faire face à une accumulation de polypeptides dénaturés, et favorisent une inhibition des processus apoptotiques induits par la chaleur.

VI.1 Prise en charge des protéines altérées

Lors d'un choc thermique, certaines protéines deviennent partiellement dénaturées et exposent à leur surface des régions hydrophobes, capables d'induire une interaction des protéines entre elles, entraînant la formation d'agrégats insolubles. Par fixation sur les sites hydrophobes de ces protéines ayant perdu leur structure tridimensionnelle, les HSP70 limitent les interactions et favorisent une désagrégation. Lors du relargage ATP dépendant des protéines substrats, leur conformation peut alors être légèrement modifiée, ce qui diminue à nouveau le risque d'interaction des protéines entre elles, et leur permet de retrouver leur conformation initiale, c'est-à-dire celle d'avant le choc thermique.

Ce processus, généralisé à l'ensemble des protéines dénaturées de la cellule, permettrait la réparation de grandes structures cellulaires endommagées par le stress (Pelham 1986).

Chez *E. Coli*, un rôle de la protéine DnaK et de ses facteurs de coopération, dans la prévention de la dénaturation thermique des protéines, a été mis en évidence, en utilisant comme modèle une luciférase de luciole thermolabile. Lorsque la cellule est exposée à une température de 42 °C, la luciférase est rapidement inactivée par dénaturation et agrégation. La présence de DnaJ lors de l'incubation à température élevée ne prévient pas l'inactivation de l'enzyme, mais supprime son agrégation. La protéine peut alors être réactivée par l'addition de DnaK, de GrpE et de Mg/ATP. Un apport de DnaK, en plus de DnaJ, au cours de l'exposition thermique est plus efficace dans la prévention de l'agrégation ; ceci reflète une nouvelle fois l'existence d'une coopération entre ces deux chaperons.

La mise en évidence d'une interaction similaire entre la luciférase et une HSP70 de mammifère indique que les protéines DnaK et HSP70 de mammifère possèdent des propriétés identiques en matière de protection contre la dénaturation. Cependant, dans le cas de l'HSP70 de mammifère, la participation d'homologues de DnaJ et de GrpE n'a pas encore été démontrée (Hendrick *et al.* 1993 ; Frydman *et al.* 1994 ; Hartman *et al.* 1996).

VI.2 Prévention de l'apoptose

*VI.2.1 Présentation du processus apoptotique et d'un rôle probable des HSP70 dans la prévention de certains phénomènes protéolytiques (Vaux *et al.* 1996 ; Mosser *et al.* 1997).*

L'apoptose peut être définie comme une forme programmée d'autodestruction cellulaire. Ce mécanisme physiologique de mort cellulaire est essentiel lors de l'embryogénèse, et pour le

maintien d'un nombre approprié de cellules au sein d'organismes multicellulaires ; mais il peut être également déclenché lorsque des cellules sont confrontées à des conditions non physiologiques, telles qu'une exposition à une hyperthermie modérée, une anoxie, une irradiation UV, des substances nocives ou de chimiothérapie.

Le processus apoptotique se caractérise par la survenue de modifications morphologiques et biochimiques distinctes au niveau des cellules considérées. Ainsi, on observe une rupture du contact entre les différentes cellules (entre cellules apoptotiques d'une part, entre cellules apoptotiques et cellules normales d'autre part), tandis qu'elles expulsent de l'eau dans le milieu extracellulaire et que leur cytoplasme subit une condensation. La chromatine se condense également et le noyau se divise en différents fragments. Les cellules se scindent en de multiples fragments, regroupés au sein de «corps apoptotiques» encadrés d'une membrane, qui sont alors rapidement reconnus et engloutis par des cellules phagocytaires voisines. Ce phénomène a la particularité de s'effectuer sans dégranulation des phagocytes, c'est-à-dire sans réaction inflammatoire locale (\neq nécrose).

En ce qui concerne les changements biochimiques survenant au cours du processus apoptotique, on note :

- une augmentation intracellulaire des concentrations en ions Ca^{2+} , qui pourrait représenter l'événement déclencheur de l'apoptose et qui semble être due soit à un afflux de calcium extracellulaire à l'intérieur de la cellule, soit à une redistribution du calcium intracellulaire entre les différents compartiments de la cellule, soit enfin aux deux phénomènes à la fois.
- une acidification cellulaire,
- une fragmentation de l'ADN oligonucléosomal résultant de l'activation, par le calcium intracellulaire, d'une endonucléase calcium dépendante,
- une dégradation de protéines nucléaires spécifiques.

Bien que des signaux très différents les uns des autres soient capables d'induire un phénomène d'apoptose, ils procèdent tous selon un mécanisme commun, impliquant des molécules à la fois initiatrices et actrices de ce processus biochimique d'autodestruction.

Les phénomènes protéolytiques qui participent au processus apoptotique reposent sur l'intervention de protéases particulières appelées les caspases (voir figure 17).

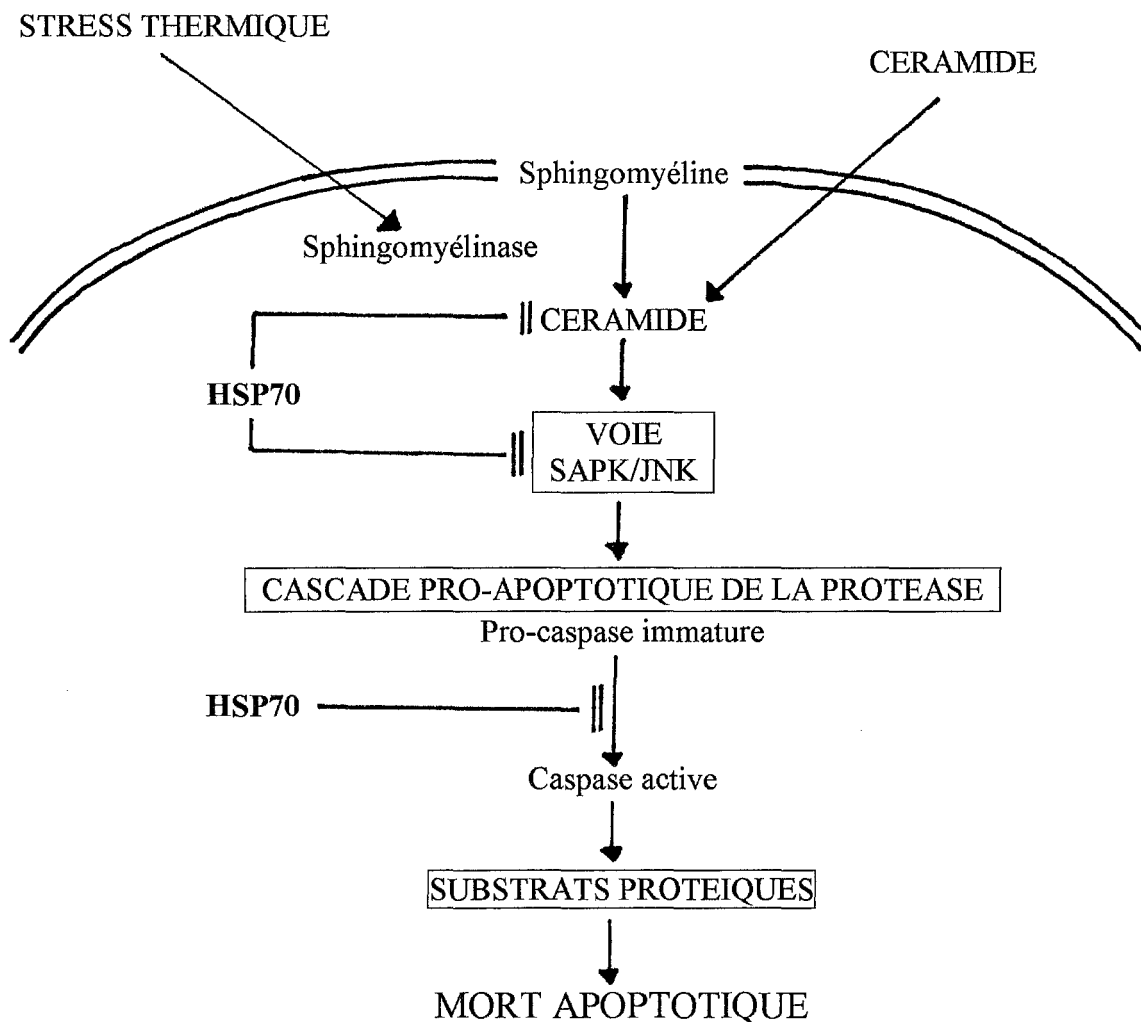


Figure 17 : HSP70 prévient l'apoptose induite par le stress, en interférant en amont ou avec la voie SAPK/JNK et en bloquant les réactions protéolytiques caspases dépendantes (Mosser *et al.* 1997).

Ces caspases existent initialement sous forme de proenzymes inactives. Elles acquièrent leur activité protéolytique en réponse à un stimulus inducteur d'apoptose et participent alors à une multitude de réactions en chaîne, aboutissant au phénomène de mort cellulaire.

Un point cependant demeure obscur : la façon dont le signal de «mort cellulaire», perçu et propagé par la cellule, conduit à l'activation de ce groupe de protéines. Il semblerait que certains inducteurs de mort cellulaire soient capables de déclencher directement les cascades de réactions caspases dépendantes. Ces mêmes inducteurs pourraient également intervenir au niveau d'un phospholipide, la sphingomyéline, permettant, par activation d'une sphingomyélinase, l'hydrolyse de la molécule et l'obtention d'un second messager de type céramide, étroitement impliqué dans le processus de l'apoptose. En effet, il a été démontré qu'un apport exogène de céramide était capable d'induire l'apoptose, au même titre qu'un choc thermique générateur de céramide endogène.

Un autre acteur de ce processus apoptotique est une protéine kinase SAPK/JNK, qui fait partie d'une famille de kinases dont la régulation est extracellulaire (ERK pour «extracellularly regulated kinase»). Cette protéine intervient au sein d'une cascade de réactions, dite voie SAPK/JNK, qui mobilise toute une famille de protéines, et qui est déclenchée par les mêmes inducteurs de mort cellulaire que ceux responsables de la

production de céramide. Il a été démontré qu'une phosphorylation des différents substrats de cette voie SAPK/JNK conduisait soit à un retard dans le déroulement du cycle cellulaire, soit au phénomène d'apoptose.

Un lien entre la voie de la sphingomyéline et celle de SAPK/JNK a été mis en évidence par l'observation qu'un apport exogène de céramide était capable d'activer la voie SAPK/JNK.

Enfin, il semble qu'il existe d'étroites collaborations entre SAPK/JNK et caspases, puisque l'intervention de la voie de la protéine kinase semble déterminante dans l'obtention des caspases actives.

Des cellules, renfermant des taux élevés d'HSP synthétisées en réponse à une première exposition à un choc thermique, se révèlent plus résistantes face à des conditions de stress, et échappent au phénomène d'apoptose. Ainsi, les HSP pourraient soit limiter les dommages cellulaires et par là éteindre le signal d'autodestruction, soit prévenir l'activation de certaines molécules impliquées dans la détection et le déroulement du processus apoptotique.

Il semble que la résistance à l'apoptose des cellules renfermant de grandes quantités d'HSP soit en relation directe avec une activité SAPK/JNK réduite. Ceci implique une possibilité d'intervention des HSP au sein même de la voie SAPK/JNK ou en amont, au sein d'un mécanisme empêchant une trop grande production de céramide, ou limitant les effets cytotoxiques de ce dernier. D'un autre côté, il s'avère que des cellules, exprimant des HSP, sont capables de résister à une apoptose induite par le stress, en dépit d'une forte activité SAPK/JNK. Ainsi, l'inhibition apoptotique découlant de l'intervention des HSP pourrait également survenir en aval de l'activation SAPK/JNK, au sein même du processus d'activation des caspases. Il se trouve que les caspases préexistent sous forme de pro-caspases immatures, dépourvues de fonctions autocatalytiques et qui ont besoin, pour acquérir leur activité, de l'intervention d'une caspase mature, laquelle réalise un clivage initial au sein de la structure protéique. De nouveaux sites, révélés lors de ce clivage, sont alors, à leur tour, spontanément autoclivés par l'enzyme devenue active. Ainsi, il est fort probable que l'étape d'activation de la caspase, qui repose entièrement sur des modifications fonctionnelles de sa structure, soit une cible de choix pour des HSP agissant en tant que chaperons et capables d'un maintien de l'enzyme sous forme inactive.

VI.2.2 HSP70, apoptose et mitochondrie (Polla *et al.* 1998)

Un stress physique, de type choc thermique, est capable d'induire au sein de la cellule une réponse, dont la nature dépend de l'importance de l'élévation de température : synthèse d'HSP et/ou apoptose lorsqu'elle est modérée, nécrose cellulaire lorsqu'elle est importante.

Cependant, si le choc thermique peut induire l'apoptose, il peut aussi la prévenir, lorsqu'il est administré sous forme de préconditionnement, permettant une surproduction de la plupart des HSP. L'inhibition de l'apoptose est ainsi étroitement liée aux niveaux de synthèse des HSP et à l'induction, par ces protéines, d'une thermotolérance cellulaire.

La prévention de l'apoptose par les HSP, et notamment par HSP70, s'exerce également par l'intermédiaire d'une protection contre les oxydants ou métabolites actifs de l'oxygène. D'ailleurs, une protection cellulaire contre les lésions oxydatives ou la cytotoxicité du facteur

de nécrose tumorale, $TNF\alpha$, a pu être mise en évidence *in vitro*, aussi bien lors de la préexposition au choc thermique que lors de la surproduction d'HSP70.

L'hypothèse selon laquelle la mitochondrie serait la cible essentielle de la protection relayée par HSP70 est avancée depuis plusieurs années. En effet, la mitochondrie semble étroitement impliquée dans le processus apoptotique : elle pourrait d'ailleurs en constituer le centre décisionnel, à l'origine des choix entre survie ou mort cellulaire et entre mort par nécrose ou mort par apoptose.

En ce qui concerne les HSP70, un rôle déterminant a été établi pour l'HSP70 cytosolique dans l'import protéique intramitochondrial, et donc dans le fonctionnement correct des mitochondries. Cependant, il paraît a priori plus logique d'attribuer la protection de la fonction mitochondriale en premier lieu à des chaperons intramitochondriaux ; mais ceci reste à être démontré.

Une étude de Polla *et al.* (1996), réalisée *in vitro*, a permis, d'écarter la possibilité d'une action protectrice prépondérante au niveau des membranes plasmiques ou de l'ADN nucléaire. Elle a mis en évidence une protection sélective des mitochondries par le choc thermique, ainsi qu'une corrélation étroite entre le degré de protection mitochondriale et la concentration en HSP70. Cette protection mitochondriale a été confirmée, *in vivo*, chez le rat préexposé à un choc thermique, avant perfusion cardiaque de peroxyde d'hydrogène. Seule la concentration d'HSP70 cytosolique (mais pas celle des HSP mitochondriales) était alors augmentée.

Si l'on considère la mitochondrie comme cible essentielle de la protection induite contre les oxydants par HSP70, la question se pose de savoir comment cette protéine agit au niveau mitochondrial.

Trois hypothèses ont été proposées (voir figure 18) :

- HSP70 assurerait un maintien de l'importation intramitochondriale de protéines essentielles à la fonction de l'organite (1.).
- HSP70 serait capable d'agir au niveau de structures particulières de la membrane externe, appelées pores de transition de perméabilité à la membrane mitochondriale, ou MTP, pour «Mitochondrial Permeability Transition Pores», dont des représentants ont été également identifiés au niveau de la membrane interne (2.). Les MTP semblent jouer un rôle déterminant dans l'induction de l'apoptose par les RLO : en effet, lors d'un stress oxydant, les RLO pourraient provoquer une ouverture des MTP, favorisant ainsi le relargage d'un ou de plusieurs facteurs AIF (apoptosis inducing factor(s)) intramitochondriaux, impliqués dans le phénomène d'apoptose. Les MTP, identifiés à la membrane interne des mitochondries, sont des canaux sensibles à la ciclosporine. En se liant à des cyclophilines intra-mitochondriales, la ciclosporine est capable de provoquer une fermeture des MTP. Ainsi, HSP70 pourrait jouer un rôle similaire à la membrane externe de la mitochondrie, et il est possible d'envisager une coopération des deux types de protéines dans la régulation de l'activité des MTP, HSP70 à la membrane externe, la ciclosporine à la membrane interne.
- HSP70 pourrait enfin chaperonner certaines protéines intramitochondriales, notamment la (ou les) présumé(s) «facteurs de mort mitochondriaux» ou AIF, prévenant de ce fait leur action pro-apoptotique (3.).

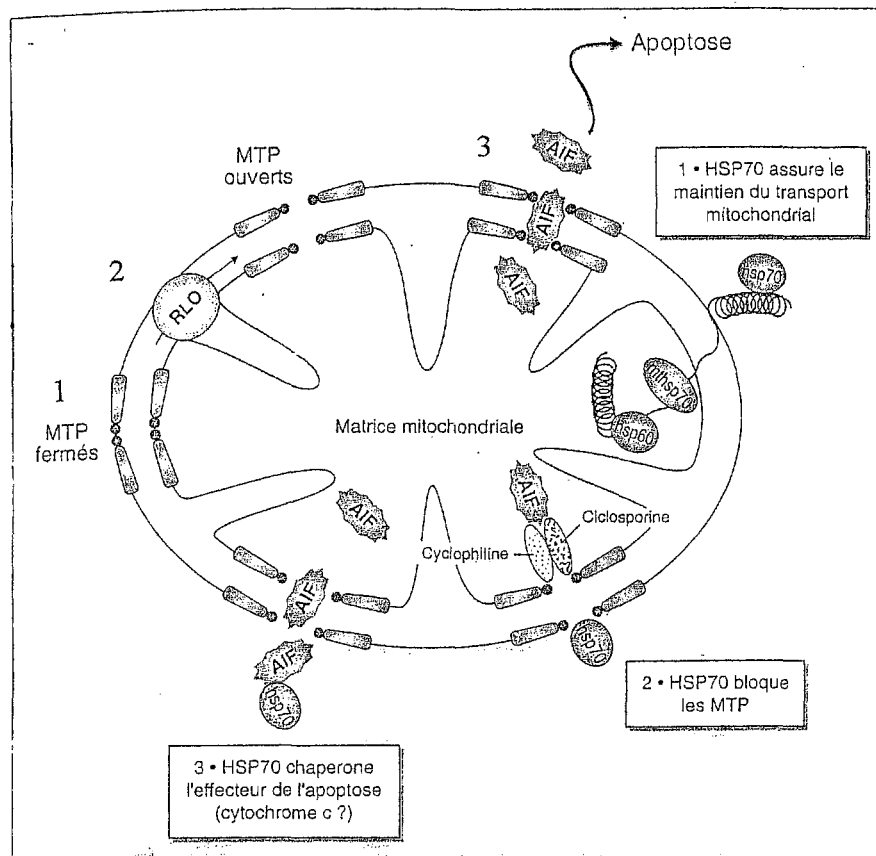


Figure 18 : HSP70 et protection mitochondriale : mécanismes proposés (Polla *et al.* 1998).

VII - Rôle des HSP70 dans la dégradation protéique intracellulaire (Sherman *et al* 1996).

Il a récemment été démontré qu'en plus de leur rôle dans le repliement des protéines, les chaperons moléculaires de la famille HSP70 intervenaient de façon essentielle dans la dégradation de certains polypeptides anormaux, à la fois au sein des cellules procaryotes et eucaryotes. En effet, lorsque ces protéines du choc thermique se voient dans l'incapacité d'induire le repliement correct d'une protéine dénaturée, elles facilitent sa dégradation par les mécanismes de protéolyse cellulaire. Leur rôle s'apparente alors à celui de cofacteurs enzymatiques, vis-à-vis des protéases impliquées dans le processus. Ainsi, les HSP permettent une solubilisation du substrat protéique, son maintien dans un état de repliement correct, et une prévention de son agrégation (voir figure 19).

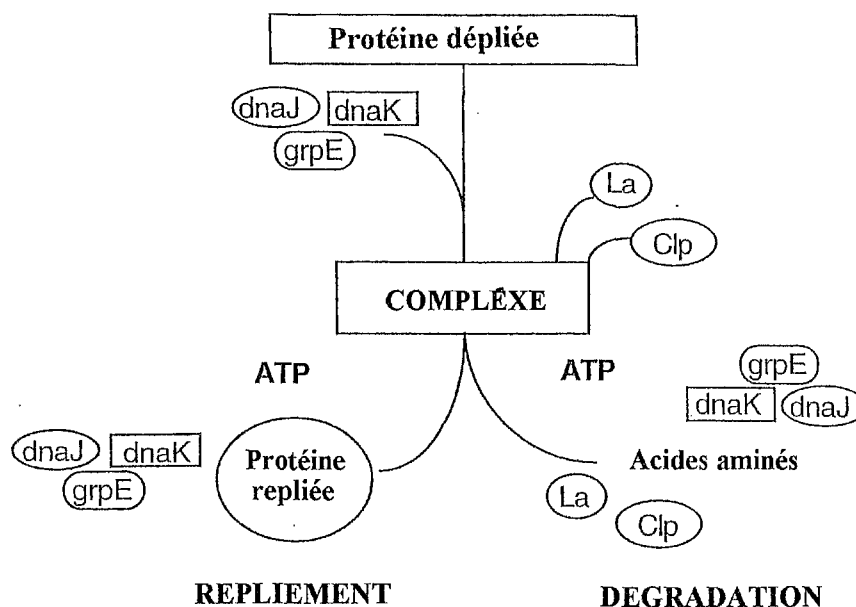


Figure 19 : Lorsque DnaK et ses co-facteurs se fixent au niveau d'une protéine dépliée, ils peuvent soit permettre un repliement correct de la protéine, soit, si cela est impossible, promouvoir sa dégradation par des protéases (La et Clp) selon un processus ATP dépendant (Sherman *et al.* 1996).

Cette capacité qu'a la cellule d'induire rapidement l'élimination de certaines de ses protéines altérées représente un avantage non négligeable. Elle permet d'éviter à la fois une accumulation de protéines potentiellement toxiques, et une consommation excessive et vaine d'ATP, au cours de multiples cycles de repliements protéiques inutiles.

VII.1 La dégradation des protéines au sein des procaryotes et des mitochondries

VII.1.1 Au sein des procaryotes

* Chez *E. Coli*, la dégradation de la plupart des protéines anormales est catalysée par des enzymes particulières de type protéases, HSP pour la plupart, dont le fonctionnement est ATP dépendant.

Les deux plus importantes sont les protéases La et Clp, qui clivent protéines et ATP lors d'une réaction couplée.

La protéase La est un homopolymère constitué de 6 sous-unités. Chacune de ces sous-unités contient un domaine peptidase et un domaine responsable de l'hydrolyse de l'ATP. L'enzyme possède également une région allostérique particulière, qui permet une fixation spécifique des polypeptides dépliés, et qui favorise leur dégradation sélective. La fixation d'un substrat protéique au niveau de cette région régulatrice favorise une activation des fonctions ATPase et protéolytique, qui conduit à l'hydrolyse de la protéine.

La protéase Clp est constituée de deux composants : l'un est formé de six grandes sous-unités et présente une activité de type ATPase (Clp A), l'autre contient sept petites sous-unités douées d'activité peptidase (Clp P). Pour cette enzyme également, l'activation du composant

ATPase passe par la fixation d'un substrat protéique, ce qui, au final, déclenche le phénomène de protéolyse.

La protéase La semble responsable d'une dégradation rapide de la plupart des protéines anormales, ainsi que de celle d'un certain nombre de protéines régulatrices, présentant une durée de vie courte.

La protéase Clp semble, quant à elle, plutôt impliquée dans la dégradation, suite à une privation d'azote, de polypeptides normalement stables, et dans celle de certains polypeptides de fusion.

Récemment, une nouvelle protéase HflB a été mise en évidence au sein des organismes procaryotes. Il s'agit d'une protéase de membrane dont le fonctionnement est ATP dépendant. Elle présente une homologie avec certaines des sous-unités d'un des complexes protéiques les plus importants du cytoplasme eucaryote, le protéasome 26 S, et avec certaines protéases des membranes mitochondriales. HflB est notamment impliquée dans la dégradation rapide du facteur de transcription du choc thermique σ^{32} .

* La nécessité d'une présence HSP lors des phénomènes de dégradation protéique a, pour la première fois, été mise en évidence au cours d'une expérience, révélant la survenue d'une stabilisation prolongée du facteur de transcription σ^{32} , lors d'une inactivation de DnaK et de ses co-facteurs. Le facteur σ^{32} possède habituellement une demi-vie très courte, de l'ordre de une minute ; mais, exposé à des températures élevées ou à d'autres conditions défavorables, il acquiert une stabilité plus durable, qui lui permet d'induire la transcription de l'ensemble des gènes *du choc thermique*.

En fait, il a été démontré que DnaK, en présence d'une température normale, était capable de se fixer au σ^{32} , entraînant une rapide dégradation de cette protéine, apparemment grâce à l'intervention de la protéase HflB. Suite à un choc thermique, les protéines endommagées qui s'accumulent au sein de la cellule se fixent au niveau des DnaK libres, de telle sorte que la quantité de DnaK disponible pour une interaction avec le σ^{32} diminue rapidement. Ainsi, la fraction de facteur σ^{32} demeurée libre échappe au phénomène de protéolyse et stimule la transcription des gènes *du choc thermique*.

Une expression accrue de protéases et de chaperons, au sein des cellules «stressées», conduit ainsi à une élimination des protéines endommagées, une restauration de la dégradation rapide du σ^{32} , une abolition de la réponse au choc thermique.

* En plus de ce rôle régulateur tout à fait primordial, DnaK, DnaJ et GrpE ont été identifiés comme intervenant dans la dégradation rapide d'un polypeptide mutant PhoA61, une phosphatase alcaline ne pouvant être sécrétée en raison d'une mutation au niveau de sa séquence signal. A 30 °C, PhoA61, relativement stable, n'est pas associé à des chaperons. A 37 °C ou 41 °C, la protéine est rapidement dégradée et plus de 30 % de la quantité totale de PhoA61, contenue dans la cellule, se retrouvent piégés au sein de complexes faisant intervenir DnaK, GrpE, les protéases La et Clp. Ainsi DnaK, qui agit selon une réaction ATP dépendante, est indispensable à la dégradation de PhoA61 par l'une ou l'autre des protéases La et Clp. Le maintien d'une interaction prolongée entre la protéine mutante, DnaK et peut-être DnaJ semble faciliter l'attaque par la protéase.

Par ailleurs, on a pu observer que DnaK, DnaJ et GrpE étaient également capables de se fixer à la phosphatase alcaline non mutante et de promouvoir sa translocation à travers la membrane d'*E. Coli*. Ainsi, c'est probablement une incapacité des chaperons à promouvoir ce processus de transport, ou tout autre repliement protéique, qui conduit à une interaction prolongée entre les chaperons et la protéine, qui, d'une manière ou d'une autre, favorise l'attaque protéolytique.

VII.1.2 Au sein de la mitochondrie

La mitochondrie renferme des homologues protéiques de DnaK, DnaJ et GrpE. A l'image de ce qui se passe chez *E. Coli*, la dégradation de certaines protéines anormales fait intervenir des chaperons, ainsi qu'un homologue mitochondrial de la protéase La, la protéase Pim.

Cependant, à l'inverse de ce que l'on peut observer chez *E. Coli*, la dégradation des protéines mitochondriales nécessite non seulement la formation d'un complexe avec les chaperons, mais également une dissociation rapide de ce complexe. Il a ainsi été proposé que les protéines dépliées étaient relarguées par les chaperons sous une forme soluble, rapidement et efficacement digérée par les protéases mitochondriales.

VII.2 Le rôle des chaperons dans la dégradation des protéines chez les eucaryotes

* Comme les cellules procaryotes type *E. Coli*, les cellules eucaryotes sont capables de dégrader rapidement leurs protéines anormales, selon un processus ATP dépendant. Cependant, ce mécanisme protéolytique, qui s'effectue à la fois au sein du cytoplasme et du noyau, est bien plus complexe que celui rencontré chez *E. Coli*.

Il s'agit d'un processus comportant deux étapes principales : la première correspond à la fixation de nombreuses molécules dites «ubiquitines» au niveau du substrat protéique, la seconde permet une rapide dégradation de ce substrat par le complexe protéasome 26 S.

L'étape d'«ubiquitination» fait intervenir différentes protéines et enzymes : tout d'abord des enzymes (E1), responsables de l'activation des ubiquitines selon un mécanisme ATP dépendant, puis des protéines (E2) permettant un transport des ubiquitines, et enfin, toute une famille de ligases (E3) dont dépend la fixation des ubiquitines activées au substrat protéique.

* Des chaperons moléculaires eucaryotes, homologues de DnaJ, et différents homologues eucaryotes de DnaK interviennent dans l'«ubiquitination» de certaines protéines anormales. Ces HSP70 et homologues de DnaJ sont capables de se fixer au niveau de polypeptides naissants ou endommagés par la chaleur, et de promouvoir leur repliement correct. Cependant, dans les cas où la tentative de repliement se révèle infructueuse (protéines mutantes, endommagées par la chaleur, certains polypeptides normaux mais de courte durée de vie), ces HSP peuvent favoriser une prise en charge des protéines par les enzymes d'«ubiquitination» E2 et E3.

Afin de déterminer, de manière un peu plus précise, le rôle des chaperons moléculaires lors du processus d'«ubiquitination», des études ont été menées chez la levure. Ces études se sont révélées un peu plus complexes que chez *E. Coli*, puisque la levure renferme dans son

cytoplasme au moins six protéines HSP70 différentes : la famille Ssa renferme quatre espèces d'HSP70 très proches les unes des autres, tandis que la famille Ssb en comporte deux.

Les protéines Ssa sont les principales HSP70 induites par la chaleur, et participent à la translocation des précurseurs polypeptidiques dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie.

Les protéines Ssb, que l'on rencontre associées aux ribosomes, semblent promouvoir le repliement initial des polypeptides naissants.

Toutes ces HSP70 sont amenées à travailler de concert avec les deux homologues DnaJ du cytoplasme, les protéines Ydj et Sis.

Des expériences ont été menées au sein d'une levure mutante, dont les deux principaux gènes HSP70 (*Ssa1* et *Ssa2*) étaient inactivés. Chez cette levure, la dégradation de protéines de courte durée de vie et de polypeptides anormaux renfermant des analogues d'acides aminés s'est révélée bien plus ralentie qu'au sein des levures de type sauvage. Une semblable diminution de la dégradation protéique a été observée chez un mutant des gènes *Ssb1* et *Ssb2*, chez lequel les deux gènes étaient inactivés, ainsi qu'au sein d'autres mutants, dont les gènes *Ydj1* et *Sis1* des homologues DnaJ étaient également inactivés.

D'autres expériences ont permis de mettre en évidence qu'une inhibition de la dégradation protéique au sein des cellules mutantes pouvait ne concerner que certains substrats de la voie des ubiquitines, par ailleurs capable de réaliser une dégradation normale des autres polypeptides.

Il semble qu'en plus d'un rôle dans la solubilisation des substrats, la prévention de leur agrégation, leur maintien dans un état de repliement correct, les chaperons soient responsables de l'étape de reconnaissance des substrats. Ainsi, Ydj1, probablement en coopération avec les HSP70, se fixe spécifiquement au niveau de certaines protéines anormales et les maintient dans un état partiellement déplié, qui favorise à son tour une fixation des ubiquitines par les protéines E2 et E3 (voir figure 20).

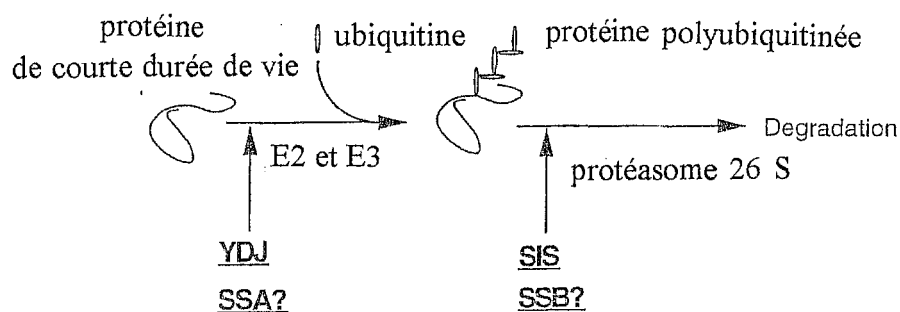


Figure 20 : La protéine Ydj1 est nécessaire à l'ubiquitination de certains polypeptides, tandis que la protéine Sis est impliquée dans la dégradation, par le protéasome 26S, des polypeptiques «polyubiquitinés» (Sherman *et al.* 1996).

La protéine Sis1, autre homologue de la DnaJ procaryote, semble n'intervenir que plus tard dans le processus, lors de l'étape de dégradation, par le protéasome 26 S, des dérivés

«multiubiquitinés». Cette protéine Sis1 est capable de se fixer à certaines protéines «polyubiquitinées», et de favoriser leur association avec le protéasome 26 S en les maintenant dans un état partiellement déplié. Cependant, le point exact de fixation de la protéine Sis1, à savoir la protéine substrat ou la chaîne formée par les ubiquitines, ainsi que les caractéristiques du substrat qui rendent la dégradation dépendante de cette protéine Sis1, n'ont, à l'heure actuelle, pas encore été déterminés.

* La voie de dégradation dépendante des ubiquitines concerne à la fois des protéines anormales (par exemple de type dénaturé), et des protéines tout à fait normales, de courte durée de vie. Ces dernières présentent, pour la plupart, d'importantes fonctions régulatrices. Elles renferment des séquences signal particulières, dites de dégradation, qui leur permettent d'être reconnues et dégradées lorsque les conditions cellulaires le nécessitent. Il semble que ces séquences signal soient le site d'interaction entre ces protéines de courte durée de vie et les protéines et enzymes E2 et E3.

Si les chaperons moléculaires sont impliqués dans une reconnaissance des protéines anormales, permettant leur «ubiquitination», il est également possible qu'ils soient capables de se fixer aux signaux de dégradation de certaines protéines régulatrices de courte durée de vie, et de favoriser de la même manière leur «ubiquitination».

Dans ce dernier cas, il est important de noter l'existence d'une étape supplémentaire, qui précède et déclenche le processus d'«ubiquitination», à savoir une phosphorylation de la protéine substrat. Une fixation des chaperons au niveau des séquences signal de dégradation est indispensable à l'obtention d'une phosphorylation correcte, permettant alors et seulement le phénomène d'«ubiquitination». Parmi les chaperons, Ydj1 est la plus impliquée dans cette étape de phosphorylation, puisque c'est elle qui, probablement en collaboration avec une HSP70, maintient le substrat dans une conformation autorisant sa reconnaissance par la protéine kinase.

* Finalement, les deux homologues de DnaJ, Ydj et Sis, interviennent à différents niveaux dans le processus protéolytique :

- Ydj est nécessaire à la phosphorylation de certaines protéines régulatrices porteuses d'une séquence signal, permettant ainsi leur «ubiquitination» ; elle est également indispensable à l'«ubiquitination» de certains polypeptides anormaux ;

- la protéine Sis possède un rôle essentiel dans la dernière étape de la dégradation des polypeptides «ubiquitinés».

VII.3 Rôle de la protéine Bip dans la protéolyse au sein du réticulum endoplasmique, chez les mammifères

De nombreuses protéines sécrétoires et protéines de membrane, qui sont transportées au niveau du RE, n'atteignent pas la surface de la cellule, mais subissent une dégradation rapide au sein même de la lumière réticulaire. Parmi ces protéines instables, on rencontre des polypeptides mal repliés, et des polypeptides incapables de s'associer et de former les multicomplexes stables auxquels ils sont destinés.

Bien que le mécanisme protéolytique du RE n'ait pas encore été précisément déterminé sur un plan biochimique, il a été démontré que l'homologue HSP70 présent au niveau du RE, à savoir la protéine Bip, jouait un rôle essentiel dans ce processus de dégradation. Ainsi, la protéine Bip est indispensable à la dégradation des chaînes légères d'IgG, au sein de lignées cellulaires incapables de synthétiser des chaînes lourdes. Au sein de lignées cellulaires normales, la formation d'une IgG, par assemblage entre une chaîne légère et une chaîne lourde, s'effectue au niveau du RE ; puis, la molécule obtenue est transportée à travers l'appareil de Golgi pour atteindre la surface cellulaire et être excrétée. Lorsque la cellule ne synthétise pas de chaînes lourdes, les chaînes légères sont rapidement dégradées au sein même du RE. Il semblerait que la protéine Bip soit capable de se fixer au niveau des chaînes légères avant leur dégradation, et permette ainsi une reconnaissance de ces molécules destinées à la protéolyse intraréticulaire.

VIII - Rôle des HSP70 dans la protéolyse lysosomale (Dice *et al.* 1994 ; Hendrick *et al.* 1993).

Il existe différents processus par lesquels les lysosomes, dans des circonstances particulières, internalisent les protéines intracellulaires. L'un de ces processus concerne des protéines cytosoliques dont la particularité est de présenter une ou plusieurs séquence(s) d'acides aminés de type Lys, Phe, Glu, Arg, Gln, appelée(s) KFERQ.

Ce type d'internalisation a été mis en évidence au sein de fibroblastes humains en culture, en réponse à une privation de facteurs de croissance, et chez les animaux (rats) au sein de tissus tels que le foie, le rein, le cœur, en réponse à un jeûne. Dans les deux cas, les circonstances de la protéolyse sont les mêmes : il s'agit d'un état de privation vis à vis duquel les cellules réagissent en dégradant leurs protéines, dans le but de se réapprovisionner en acides aminés libres, utilisables pour la synthèse protéique, la néoglucogénèse, et en tant que source d'énergie. Dans un premier temps, la protéolyse lysosomale n'est pas sélective. Mais, si la privation se prolonge, la situation est alors forcée d'évoluer, au risque de voir s'installer un déficit en certaines enzymes ou protéines régulatrices, indispensables à la vie cellulaire dans ces conditions. C'est alors qu'un autre processus de dégradation lysosomal se met en route : il s'agit d'un mécanisme qui ne concerne que les protéines porteuses de la séquence KFERQ, dont la présence dans une telle situation n'est pas indispensable. Ce processus nécessite la présence d'ATP et sa spécificité repose sur l'intervention d'une protéine du choc thermique, HSC73, exprimée de manière constitutive à l'intérieur de la cellule de mammifère. En effet, cette protéine serait capable de reconnaître spécifiquement la séquence d'acides aminés KFERQ, au sein des protéines substrats devant être dégradées en priorité.

Cette protéine HSC73 est principalement localisée au niveau du cytoplasme de la cellule, mais des exemplaires lysosomaux ont été mis en évidence. Ces protéines lysosomales apparaissent, pour certaines, à la surface du lysosome. Toutefois, pour la plupart, elles ont été mises en évidence à l'intérieur de la vésicule lysosomale, d'où elles semblent intervenir en facilitant le passage de la protéine substrat à travers la double couche lipidique.

Les hypothèses suivantes ont été proposées, concernant les différentes étapes de cette internalisation spécifique des protéines dans les lysosomes :

- 1 - fixation de l'HSC73 cytosolique à une protéine contenant le motif KFERQ,

2 - fixation de la protéine substrat au niveau d'un récepteur/transporteur protéique de la membrane lysosomale,

3 - passage de la protéine à travers la membrane jusqu'à la lumière lysosomale, «aidée» par une HSC73 lysosomale,

4 - dégradation de la protéine par les enzymes lysosomales.

Les mécanismes par lesquels l'HSC73 cytoplasmique stimule la dégradation lysosomale des protéines porteuses de la séquence KFERQ ne sont pas encore connus. Plusieurs hypothèses ont été proposées :

- HSC73, comme la plupart des protéines de la famille HSP70, participe à l'importation de précurseurs protéiques dans la mitochondrie, en maintenant ces polypeptides dans un état déplié, apte à la translocation. Ainsi, un rôle similaire pourrait être envisagé dans le processus d'import lysosomal.

- d'un autre côté, HSC73 pourrait intervenir en favorisant la fixation de la protéine substrat à son récepteur membranaire.

- enfin, il est possible qu'HSC73 agisse elle-même comme transporteur protéique vis-à-vis de son substrat.

En ce qui concerne la régulation de ce processus d'import lysosomal, là encore les choses ne sont pas très claires. Elle pourrait faire intervenir des modifications post-traductionnelles d'HSC73 et/ou sa fixation à des cofacteurs, capables d'altérer ses propriétés de fixation à la séquence peptidique cible. Par ailleurs, il se pourrait que les phénomènes régulateurs s'intéressent directement à la protéine importée, en occasionnant des changements conformationnels chez cette protéine. Enfin, une régulation pourrait s'effectuer directement au niveau des récepteurs/transporteurs protéiques à la surface du lysosome.

Ile PARTIE

L'HSP27

La réponse cellulaire au choc thermique ou à d'autres stress physiologiques fait intervenir à la fois de «grandes» protéines du choc thermique telles que les HSP60, HSP70, HSP90, mais également des protéines de petit poids moléculaire, appelées sHSP pour «small heat shock proteins». Ces petites protéines du choc thermique sont impliquées non seulement dans la protection des cellules vis à vis d'agressions diverses, mais aussi dans des processus biochimiques essentiels, au sein des cellules non stressées.

Les sHSP sont synthétisées au cours du développement et de la croissance cellulaires, et leur expression s'avère étroitement corrélée au degré de différenciation et au statut oncogénique de la cellule. Des taux élevés de sHSP confèrent aux cellules une protection efficace vis-à-vis du choc thermique et de toute une variété de stress chimiques ou métaboliques. Enfin, on attribue à ces sHSP une fonction homéostatique au niveau des mécanismes cellulaires de transduction des signaux, ainsi qu'un rôle dans la croissance, la différenciation et les processus de transformation cellulaires (Arrigo *et al.* 1994 ; Arrigo 1998).

I - Les sHSP : approche génique et structurale

La famille des sHSP possède des représentants dans pratiquement tous les organismes, à l'exception peut-être du groupe des procaryotes. Au sein des différentes espèces, les sHSP sont bien moins conservées que leurs consœurs de haut poids moléculaire, telles que les HSP70. Leur nombre également est variable : on distingue quatre protéines principales chez la drosophile (les Dm-HSP22, 23, 26 et 27), trois chez les mammifères (l'HSP27 et les cristallines αA et αB), une chez la levure et plus de vingt chez les plantes (Arrigo *et al.* 1994). Leurs masses moléculaires sont comprises entre 15 et 30 KDa, mais seules nous intéresseront dans ce chapitre les sHSP d'un poids moléculaire voisin de 27 KDa, indifféremment appelées HSP25, HSP27 ou HSP28.

I.1 Localisation et structure du gène *HSP27* (Arrigo *et al.* 1994 ; Benndorf *et al.* 1997).

Chez les Humains, l'HSP27 est codée par un unique gène actif, localisé sur le chromosome 7. Chez la souris également, un seul gène actif permet l'expression de l'HSP25.

Le gène *HSP25* de souris est constitué de trois exons codant respectivement pour 122, 22 et 62 acides aminés, et de deux introns. La région promotrice de ce gène présente plusieurs éléments de fixation de facteurs de transcription dont deux boîtes TATA, un élément du choc thermique (HSE), et un élément de fixation des récepteurs oestrogéniques. Ces deux derniers éléments sont impliqués dans l'activation du gène *HSP25*, respectivement par un choc thermique et des hormones oestrogéniques (voir figure 21).

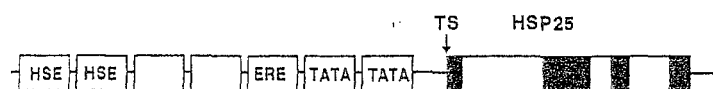


Figure 21 : Organisation du gène *HSP25* de souris et de sa région promotrice. HSE, élément du choc thermique ; ERE, élément de fixation des récepteurs oestrogéniques ; TATA, boîte TATA ; TS, point de départ de la transcription ; HSP25, gène *HSP25* ; les exons sont représentés en blanc, les introns en noir. (Benndorf *et al.* 1997).

I.2 Structure de la protéine HSP27 (Arrigo *et al.* 1994).

D'une façon générale, les protéines de la famille des sHSP sont constituées de deux domaines principaux :

- Le domaine I correspond, dans le cas de l'HSP27 humaine, à la portion de protéine comprise entre les acides aminés 1 et 87. Ce domaine est, dans son ensemble, peu conservé, aussi bien entre sHSP de différentes espèces qu'entre sHSP d'une même espèce. De petites portions présentent néanmoins un caractère hautement conservé, et correspondent probablement aux régions les plus importantes de ce domaine. Ainsi, les sHSP de poulet, de mammifères et de drosophile ont en commun des séquences de phosphorylation hautement conservées et situées à l'extrémité de ce domaine I.

- Le domaine II, également surnommé domaine α cristallin, correspond aux résidus 88 à 167 de l'HSP27 humaine ; il s'agit d'une séquence hautement conservée, quelles que soient la sHSP et l'espèce considérées.

La structure secondaire d'HSP27 révèle une prédominance de structures de type feuillets β , tandis que les enroulements de type hélices α ne représentent que 5 % de la conformation protéique totale. Des hélices α , présentant un caractère hautement hydrophobe, ont cependant été identifiées au niveau des extrémités amino et carboxy-terminales de certaines sHSP (dont l'HSP27). Elles pourraient favoriser certaines interactions de ces protéines, entre elles, avec les membranes ou encore avec d'autres protéines.

II - Expression des sHSP (Arrigo *et al.* 1994).

II.1 Expression des sHSP lors d'un stress

Des études, effectuées sur des cellules de drosophile et de mammifères en culture, ont permis de démontrer que les sHSP faisaient partie des protéines du choc thermique dont l'expression est la plus importante à la suite d'une exposition à un choc thermique ou à d'autres types de stress. Chez les mammifères, leur expression basale est très variable d'une lignée cellulaire à l'autre, et parfois même tellement faible, qu'elle rend leur détection problématique. Cependant, suite à un choc thermique, il n'est pas rare d'observer des taux de sHSP dix à vingt fois supérieurs au taux d'expression initiaux.

L'activation transcriptionnelle des gènes *sHSP* est le principal mécanisme régulateur de l'expression de ces protéines : il autorise une accumulation des sHSP à la suite d'un stress. L'induction des gènes *sHSP* par le stress semble dépendre, comme c'est le cas pour les autres gènes *du choc thermique*, de la fixation de facteurs de transcription HSF, au niveau de séquences régulatrices ou éléments du choc thermique, HSE, situées en amont des gènes. De telles séquences ont en effet été identifiées au niveau des régions promotrices de la plupart des gènes *sHSP* (drosophile, HSP27 humaine et de souris, cristalline α B). Malgré tout, il existe des différences entre l'induction par le stress des sHSP et celle des autres protéines du choc thermique : les sHSP de drosophile s'expriment habituellement pour des températures bien inférieures à celles nécessaires à l'induction des HSP70 ; les sHSP de mammifères sont, quant

à elles, synthétisées plus lentement, mais de manière plus durable, à la suite d'un choc thermique.

II.2 Expression des sHSP au sein de cellules non stressées

Les gènes *sHSP* ont la possibilité de s'exprimer en l'absence de stress. Une telle expression a pour la première fois été mise en évidence chez la drosophile, au sein de cellules en cours de différenciation et lors d'étapes spécifiques du développement cellulaire. A cette occasion, un rôle de première importance a pu être attribué à une hormone de type β -ecdysterone, dont l'accumulation s'accompagne d'une induction importante des gènes *sHSP*. L'intervention de la β -ecdysterone semble s'effectuer par interaction directe avec l'ADN, par l'intermédiaire des séquences de fixation des récepteurs stéroïdiens, situés en amont des gènes *sHSP*.

Des résultats similaires ont été obtenus chez les mammifères : HSP27 est l'une des principales protéines synthétisées à la suite d'une exposition des cellules à des hormones stéroïdiennes telles que les oestrogènes. Son expression a pu être mise en évidence aussi bien au sein de tissus humains sensibles aux oestrogènes, qu'au niveau de tumeurs du sein.

La mise en évidence de nouveaux éléments régulateurs, au niveau de la région promotrice des gènes *sHSP*, indique qu'en plus d'une induction hormonale, ces gènes sont sous le contrôle d'autres mécanismes complexes de régulation. Cependant, ces nouvelles séquences se révèlent extrêmement délicates à identifier précisément, puisque pour un même gène *sHSP*, elles vont différer selon le type de tissus ou l'étape de développement considérés. Il a d'ailleurs été démontré que contrairement à ce qui se produisait à la suite d'un choc thermique, l'expression constitutive (donc en l'absence de stress) des sHSP était spécifique de certains tissus, et hautement dépendante du degré de développement des cellules.

Au cours du développement chez la souris, il a été observé qu'HSP27 s'accumulait, en l'absence de stress, au sein de plusieurs tissus, tels que les neurones de la corde spinale et les cellules de Purkinje, mais aussi au sein de certains tissus musculaires. Une présence d'HSP27 a également été mise en évidence au cours d'une étape précoce du développement du rat, la fermeture du tube neural.

Chez les rats et souris adultes, HSP27 et les cristallines α A et α B présentent chacune des spécificités d'expression différentes. La cristalline α A se rencontre exclusivement au sein des cellules du cristallin et de la rate. HSP27 et la cristalline α B ont été mises en évidence au sein de plusieurs tissus, dont les muscles lisses et squelettiques, mais sont absentes de la rate. Enfin, seule la cristalline α B s'exprime à des taux élevés au sein du système nerveux central.

Une modulation du taux d'expression des sHSP chez les mammifères a également été mise en évidence dans certaines situations pathologiques, telles que des états de dégénérescence neuronale, des pathologies dégénératives du cerveau, du foie, certaines formes de tumeurs cancéreuses.

En résumé, les sHSP, en plus de leur rôle au cours du stress, interviennent au sein de cellules non stressées et dans certaines situations pathologiques. Plus précisément, elles semblent s'accumuler lorsque les cellules interrompent leur division et entrent dans une phase de différenciation. Au sein de cellules présentant un index mitotique élevé (telles que celles du système nerveux en cours de développement ou celles des gonades), des taux élevés de sHSP

semblent nécessaires à une régulation du taux de division de ces cellules. Enfin, la présence d'HSP27 de mammifère, mais pas de sHSP de drosophile, au niveau des cellules musculaires est cohérente avec une fonction attribuée à cette protéine au niveau du cytosquelette cellulaire.

III - Localisation cellulaire et propriétés biochimiques des sHSP

III.1 Au sein de cellules non stressées (Arrigo *et al.* 1994 ; Benndorf *et al.* 1997).

Des études, effectuées sur des cellules humaines et de poulet, ont permis de localiser l'HSP27 exprimée de manière constitutive, au niveau du cytoplasme de ces cellules, et plus précisément au niveau d'une zone périnucléaire polarisée. Une localisation similaire a pu être observée au sein de cellules ayant «récupéré» d'une exposition à un stress. En comparaison, la Dm-HSP27 de drosophile présente au contraire une localisation plutôt nucléaire.

Des sHSP de type HSP27, exprimées de manière constitutive, ou transitoirement au cours du développement cellulaire, ou enfin en réponse à une induction hormonale, ont été isolées de cellules en culture, par lyse de ces cellules et récupération de la fraction soluble. Les sHSP ont ainsi pu être examinées d'un point de vue conformationnel. Les résultats obtenus ont mis en évidence l'existence de structures supramoléculaires oligomériques, d'un poids moléculaire compris entre 200 et 800 KDa. Ces particules, visualisées au microscope électronique, ont révélé des formes rondes plus ou moins régulières, parfois globulaires, parfois en forme d'anneaux, et composées de 8 monomères (voir figure 22).

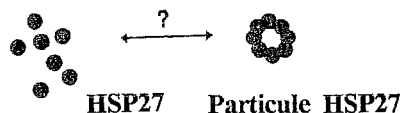


Figure 22 : L'HSP27 forme des structures supramoléculaires en forme d'anneaux, constituées de 8 monomères (Benndorf *et al.* 1997).

III.2 Au sein de cellules stressées (Arrigo *et al.* 1994 ; Benndorf *et al.* 1997).

Lors d'une exposition à un choc thermique ou à d'autres formes de stress, les sHSP connaissent une redistribution à l'intérieur ou autour du noyau. La taille des oligomères HSP27 augmente, permettant ainsi la formation de structures hautement agrégées insolubles, qui vont migrer à l'intérieur du noyau pendant toute la durée de l'exposition thermique (voir figure 23).

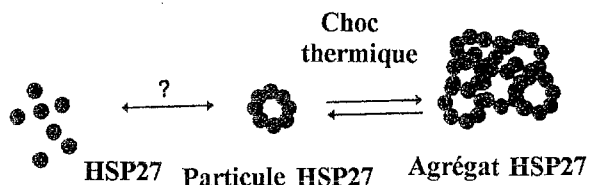


Figure 23 : Lors d'un choc thermique, les particules HSP27 forment des structures hautement agrégées et insolubles (Benndorf *et al.* 1997).

Lors de la phase de récupération qui suit le choc thermique, on observe une nouvelle réorganisation de la composition cellulaire, à savoir un retour progressif des sHSP dans l'espace cytoplasmique.

Tous ces phénomènes semblent modulés par l'état métabolique et le degré de thermorésistance des cellules. Il paraît d'ailleurs important de préciser que des cellules thermotolérantes, soumises à un choc thermique, ne sont le lieu d'aucun des phénomènes précédemment décrits.

La signification fonctionnelle des processus transitoires de superagrégation et de redistribution nucléaire, dont les sHSP font l'objet lors d'une exposition à un choc thermique, demeure encore relativement floue. Il est possible que ces phénomènes soient le reflet d'une inactivation transitoire des sHSP, ou encore qu'ils permettent une protection de la structure nucléaire.

III.3 Notion de phosphorylation (Arrigo *et al.* 1994 ; Benndorf *et al.* 1997).

Les sHSP ont la capacité de subir une phosphorylation en réponse à une grande variété de stimuli. Ceci suggère qu'en plus de leur taux d'expression, leur taux de phosphorylation participe à la régulation de leurs fonctions.

L'HSP27 de rat α , la première, a été identifiée sous de multiples isoformes. Puis, il a été démontré que les différents isoformes de l'HSP27 humaine, habituellement désignés par les lettres a, b, c et d, correspondaient en fait aux produits d'un même gène, respectivement phosphorylés en 0, 1, 2 ou 3 sites de leur structure.

Il est peu à peu devenu évident que la phosphorylation d'HSP27 intervenait de façon essentielle dans les différents événements physiologiques qui accompagnent la croissance et la différenciation des cellules.

De nombreux agents sont actuellement connus comme étant capables d'induire une phosphorylation de l'HSP27 de mammifère : il s'agit d'une part d'agents toxiques, tels que le choc thermique, l'arsenic, le peroxyde d'hydrogène et d'une façon plus générale le stress oxydatif, et, d'autre part, de mitogènes, de facteurs de différenciation et de croissance tels que la thrombine ou la bradykinine, le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le sérum, des cytokines inflammatoires (interleukine 1, tumor necrosis factor ou TNF), des promoteurs de tumeurs...

La plupart de ces agents induisent une augmentation très rapide de la phosphorylation, détectable en quelques minutes. Cependant, ni la transcription du gène *sHSP* ni, par conséquent, l'accumulation de la protéine ne font l'objet d'une activation de la part de ces facteurs. Dans le cas du choc thermique, qui est capable d'induire à la fois les deux processus, la phosphorylation précède l'accumulation de la protéine et affecte préférentiellement les protéines préexistantes.

L'HSP27 humaine peut être phosphorylée au niveau de trois sites, identifiés comme étant les serines 82, 78 et 15. Il semblerait que la phosphorylation ne survienne pas selon un ordre défini et constant, et que les serines 82 et 15 soient les principaux sites phosphorylés à la suite d'un choc thermique, d'une exposition à de l'arsenic ou de la thrombine, d'une stimulation

sérologique. Les sites de phosphorylation d'HSP27 sont contenus au sein d'une séquence d'acides aminés, dont le motif Arg-X-X-Ser est le même pour chacun d'entre eux. Il est possible que la phosphorylation de ces sites puissent réguler les fonctions de stabilisation et de multimérisation, attribuées au domaine α cristallin de la protéine. Enfin, bien que la phosphorylation ne modifie pas la demi-vie apparente de la protéine, elle semble affecter la taille des multimères sHSP.

III.4 Régulation de la phosphorylation (Arrigo *et al.* 1994 ; Benndorf *et al.* 1997 ; Huot *et al.* 1996).

* Les cinétiques de phosphorylation/déphosphorylation d'HSP27, mesurées *in vivo*, sont étroitement corrélées aux cinétiques d'augmentation et de diminution des activités protéine kinases, détectées au sein de la cellule. Ainsi, une stimulation de l'activité HSP27 kinase semble être le principal mécanisme régulateur de la phosphorylation d'HSP27.

Une protéine, d'activité HSP27 kinase et induite par une exposition à un choc thermique, a été purifiée à partir de cellules de hamster chinois. Sa détermination structurale a permis de mettre en évidence deux polypeptides, de 45 et 54 KDa environ. Ces enzymes ont également été induites par un traitement par l'arsenic, le TNF α , l'H₂O₂, et suite à une stimulation de cellules quiescentes par du sérum, par la thrombine ou le FGF. Ainsi, l'activation de la pp 45-54 HSP27 kinase semble donc être le principal point de convergence des différentes voies cellulaires de transduction des signaux, responsables de la phosphorylation d'HSP27.

Cette pp 45-54 kinase présente une certaine homologie avec la pp 53-60 MAPKAP kinase II, une protéine kinase induite par l'insuline et responsable de la phosphorylation de la glycogène synthétase. La MAPKAP kinase II reconnaît le motif Leu-X-Arg-X-X-Ser et permet, *in vitro*, une phosphorylation efficace d'HSP27 au niveau des mêmes sites que ceux phosphorylés *in vivo*.

* Les taux de phosphorylation d'HSP27 semblent être également sous la dépendance d'activités phosphatases. En effet, HSP27, sous sa forme phosphorylée, représente un excellent substrat pour les calcium/calmoduline phosphatases, et pour certaines phosphatases sensibles aux radicaux oxydés.

Les agents générateurs de radicaux oxydés interviennent donc dans la régulation de certaines activités HSP27 phosphatases, mais ils font également partie des principaux inducteurs de l'activité pp 45-54 kinase. Ainsi, une activation des kinases et une inactivation des phosphatases sont les deux phénomènes indispensables à l'obtention de ce taux de phosphorylation particulièrement élevé, que l'on observe suite à une exposition à des agents générateurs de radicaux oxydés. Il semble cependant important de préciser que des mécanismes indépendants des radicaux oxydés existent également et qu'ils permettent une induction tout aussi efficace de la phosphorylation d'HSP27 (voir figure 24).

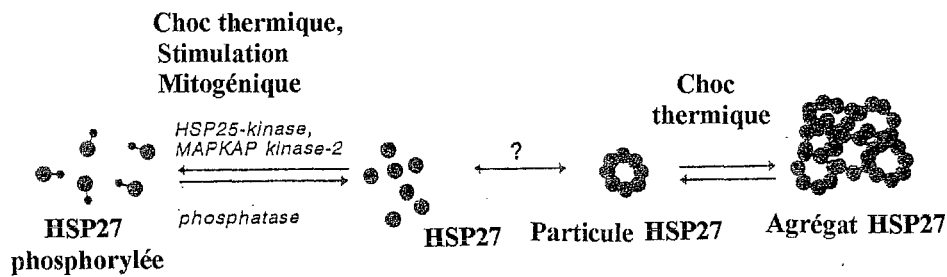


Figure 24 : L'HSP27 kinase, la MAPKAP kinase 2 et diverses phosphatases permettent le maintien d'un équilibre entre les formes phosphorylée et non phosphorylée d'HSP27 (Benndorf *et al.* 1997).

* En ce qui concerne la pp 45-54 HSP27 kinase, il a été démontré qu'un traitement par une protéine phosphatase entraînait une perte de ses activités. Ceci suggère que cette enzyme est elle-même sous le contrôle de processus de phosphorylation/déphosphorylation.

Ainsi, une protéine kinase particulière, la MAP kinase pour «Mitogen-Activated Protein» kinase, représente l'une des principales molécules activatrices de l'HSP27 kinase, à l'origine d'une activation directe de la protéine. La MAP kinase est une protéine dont l'activité est induite par pratiquement tous les inducteurs de la phosphorylation d'HSP27, dont le choc thermique et l'H₂O₂. Cette MAP kinase est considérée comme une molécule de toute première importance, dans la mise en route d'une protection cellulaire en réponse à des stimuli externes, tels que facteurs de croissance, mitogènes, agents de différenciation ; elle possède d'ailleurs plusieurs substrats impliqués dans d'importants processus physiologiques. La MAP kinase est également capable de phosphoryler la MAPKAP kinase 2, qui, comme on l'a déjà vu, phosphoryle *in vitro* la glycogène synthétase et HSP27. Elle peut enfin phosphoryler différents facteurs de transcription et moduler ainsi leur activité.

L'identification de la pp 45-54 HSP27 kinase comme substrat de la MAP kinase laisse entrevoir un rôle tout à fait primordial pour les sHSP dans l'accomplissement de fonctions importantes, dans le cadre de la réponse cellulaire à divers stimuli environnementaux.

III.5 Acylation (Benndorf *et al.* 1997)

En dehors de la phosphorylation, HSP27 subit d'autres modifications post traductionnelles. Ainsi, une fixation covalente d'acides gras de types acide palmitique, acide stéarique, acide oléique, acide linoléique a été mise en évidence au niveau de la protéine. Il semblerait que les isoformes phosphorylés d'HSP27 soient acylés préférentiellement.

L'acylation pourrait être l'une des explications à l'hétérogénéité de taille que l'on observe entre les différents oligomères HSP27, car elle permet la formation de liaisons hydrophobes entre des sites protéiques particuliers, indispensables à l'agrégation des protéines entre elles.

III.6 Dimérisation d'HSP27 à la suite d'un stress oxydatif (Benndorf *et al.* 1997)

Les agents inducteurs de stress oxydatif tels que l'H₂O₂, les radiations UV, l'arsenite de sodium et le cadmium, induisent également la synthèse des HSP. Ce phénomène semble être

relié à la capacité qu'ont ces oxydants de modifier directement les groupements thiols au niveau cellulaire, en particulier ceux du glutathion, qui joue lui-même un rôle dans la thermotolérance et l'induction des HSP. De leur côté, ces HSP sont capables de stabiliser des protéines, au sein de cellules exposées à un stress oxydatif.

Un mécanisme a été proposé par lequel les sHSP, et notamment les HSP27, agiraient comme protecteurs vis-à-vis des stress oxydatifs : il s'agit d'un phénomène de dimérisation, qui permet à ces protéines de former des dimères en présence de glutathion oxydé ou d' H_2O_2 , par l'intermédiaire d'un de leurs résidus cystéine situé en position 140 (voir figure 25).

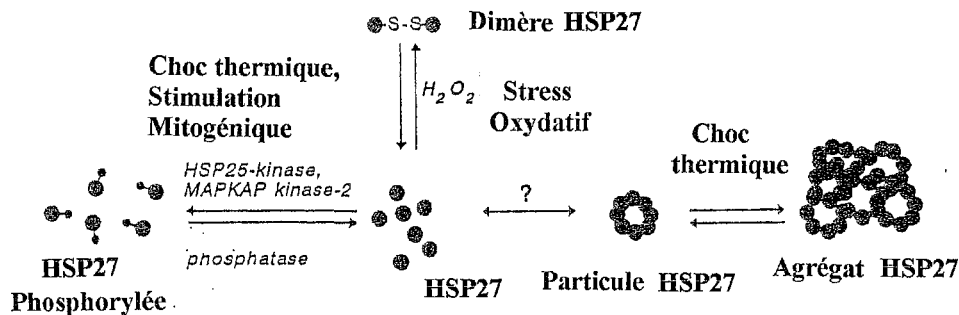


Figure 25 : Les HSP27 réagissent à un stress oxydatif par la formation de dimères HSP27 (Benndorf *et al.* 1997).

Cette dimérisation s'accompagne d'une perte d'activité des protéines HSP27, et notamment en ce qui concerne l'inhibition de la polymérisation de l'actine (voir plus loin pour plus de détails concernant le rôle inhibiteur d'HSP27 sur la polymérisation des microfilaments d'actine).

Ainsi, la formation de dimères HSP27 aide à un maintien du glutathion, et des groupements sulfhydryl en général, sous une forme réduite lors de processus oxydatifs, et pourrait constituer une sorte de «frein oxydatif», au sein de cellules riches en HSP27.

IV - Rôles des sHSP

IV.1 Au sein de cellules non stressées

Les sHSP interviennent de manière essentielle dans les processus physiologiques de la croissance et de la différenciation, à la fois des cellules normales et des cellules cancéreuses, ainsi qu'au cours du développement d'organismes tels que la drosophile ou la souris.

IV.1.1 Modulation du processus apoptotique cellulaire (Arrigo 1998).

Un aspect intéressant des sHSP concerne leur accumulation lors de la toute première phase de divers processus cellulaires de différenciation, ainsi qu'au cours d'étapes spécifiques du développement cellulaire. Ce phénomène se caractérise par une expression transitoire de

sHSP lors du passage de la cellule d'une phase de division active à une phase de différenciation.

De nombreuses expériences ont été menées afin de déterminer la signification biologique de cette expression physiologique de sHSP. Il a tout d'abord été observé qu'une inhibition partielle de l'accumulation d'HSP27 interférait avec la différenciation granulocytaire de cellules humaines promyélocyaires HL-60. Puis, une étude menée au sein de cellules embryonnaires de souris a permis de démontrer qu'une inhibition quasi complète de l'expression d'HSP27 empêchait la différenciation de ces cellules, par exacerbation du processus apoptotique.

Ainsi, il semble qu'HSP27 soit capable de contrôler les phases de division et de différenciation de cellules de mammifères, par modulation de leur processus apoptotique. (Voir plus loin pour plus de détails concernant l'implication d'HSP27 au sein du processus apoptotique cellulaire)

IV.1.2 Interaction avec les microfilaments d'actine (Arrigo *et al.* 1994 ; Benndorf *et al.* 1997 ; Lavoie *et al.* 1995).

Des études, menées *in vitro* au sein de cellules de volaille, ont, pour la première fois, démontré qu'une sHSP pouvait se comporter comme une protéine de «coiffage» des microfilaments d'actine, permettant, par fixation au niveau de leurs extrémités libres, une inhibition du processus de polymérisation.

Des expériences ultérieures ont permis de mettre en évidence, *in vivo*, une interaction similaire de l'HSP27 de mammifère avec les microfilaments d'actine (voir figure 26).

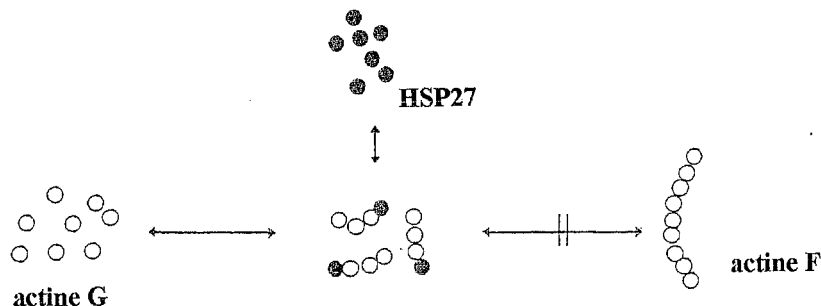


Figure 26 : L'HSP27 est capable de se fixer au niveau des extrémités libres des microfilaments d'actine et d'inhiber le processus de polymérisation (Benndorf *et al.* 1997).

Des études, menées sur des fibroblastes de hamster chinois traités par de la saponine (un agent permettant une bonne préservation des protubérances de la membrane plasmique, ainsi que des structures corticales de l'actine) ont révélé qu'HSP27, tout en étant hautement concentrée au niveau d'une région périnucléaire, était également extrêmement présente au sein de régions cytoplasmiques de grande motilité. Ces régions ont la particularité de renfermer des protubérances membranaires, telles que les «ruffles» et les lamellipodes, qui sont des sites très actifs de la polymérisation de l'actine au sein du fibroblaste. Parallèlement, il a été démontré qu'une surexpression d'HSP27, au sein de ces fibroblastes, permettait de prévenir

partiellement la rupture du réseau de microfilaments, induite par une exposition des cellules à de la cytochalasine D. Ceci conforte l'idée d'un rôle des HSP27 dans la dynamique des microfilaments cellulaires.

Une surexpression d'HSP27 phosphorylable s'accompagne d'une augmentation de la concentration d'actine sous forme de microfilaments, ou actine F, au niveau du cortex cellulaire, et d'une intensification de l'activité de pinocytose de la cellule, un processus qui dépend de la dynamique de l'actine. Au contraire, la surexpression d'une forme non phosphorylable d'HSP27 (obtenue à partir d'une forme mutante du gène *HSP27*) entraîne une diminution de la concentration corticale de l'actine F et de l'activité de pinocytose.

En réponse à une stimulation par la thrombine ou le FGF, deux facteurs capables d'induire la phosphorylation d'HSP27, on observe une augmentation de la quantité d'actine F au sein de la cellule. Cette augmentation est bien plus importante au sein de cellules surexprimant l'HSP27 phosphorylable, qu'au sein de cellules ne surexprimant pas la protéine. Des cellules, surexprimant la forme mutante non phosphorylable d'HSP27, ne connaissent, quant à elles, qu'une légère augmentation de leur contenu en actine F, en réponse à ces mêmes facteurs. Ceci permet d'assimiler la forme non phosphorylable d'HSP27 à un mutant négatif dominant, capable d'inhiber l'accumulation de l'actine sous forme de microfilaments. Ainsi, les effets opposés des HSP27 de type sauvage et mutant sur la dynamique des microfilaments d'actine renforcent l'idée d'une régulation, par la phosphorylation, de l'activité d'HSP27 vis à vis de ces microfilaments.

La phosphorylation d'HSP27, qui survient lors d'une stimulation de la cellule par des agonistes, types facteurs de croissance, pourrait provoquer une modification de la conformation de la protéine, entraînant une dissociation d'HSP27 d'avec l'extrémité des filaments d'actine. Une phosphorylation spécifique d'HSP27 au niveau cortical pourrait donc réguler globalement l'organisation spatiale de l'actine, en permettant une libération de l'extrémité des microfilaments et l'addition des monomères. Enfin, la présence d'une forme non phosphorylable d'HSP27 en quantité importante au sein de la cellule, serait à l'origine d'une augmentation de la durée de vie de la protéine à l'extrémité du microfilament, réduisant ainsi la réponse de ces microfilaments aux facteurs de croissance (voir figure 27).

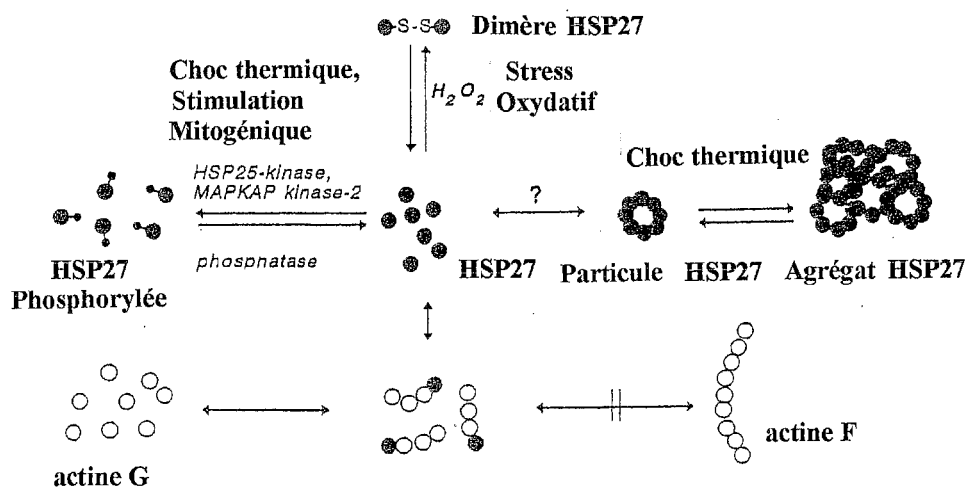


Figure 27 : L'activité inhibitrice d'HSP27 sur la polymérisation des microfilaments d'actine est abolie par les phénomènes de phosphorylation, de dimérisation et d'organisation de la protéine en structures supramoléculaires, pouvant être induits par un choc thermique, une stimulation mitogénique ou un stress oxydatif (Benndorf *et al.* 1997).

IV.2 Au sein de cellules soumises à un stress

Dans la plupart des lignées cellulaires et des organismes étudiés, l'accumulation de protéines du choc thermique, à la suite d'une exposition à un choc thermique ou à d'autres types de stress, s'accompagne de l'acquisition par les cellules d'une capacité augmentée de survie à d'autres traitements hyperthermiques ultérieurs, ou thermotolérance. Cette protection nouvellement acquise vis à vis des stress thermiques, parce qu'elle repose sur des taux intracellulaires élevés d'HSP, présente un caractère transitoire et ne dure que le temps nécessaire aux cellules pour récupérer des taux d'HSP normaux.

Au sein de cellules rendues thermotolérantes et qui expriment dans sa totalité le spectre des protéines du choc thermique, presque toutes les structures et activités cellulaires sont protégées des effets immédiats du choc thermique. Ces cellules peuvent malgré tout subir des dommages liés à la température élevée, mais elles connaissent alors une récupération très rapide, dès le retour à une température normale. Au contraire, des cellules qui ne surexpriment que la seule petite protéine HSP27, ne sont pas protégées de l'effet inhibiteur immédiat du choc thermique vis à vis de différents processus cellulaires (synthèse protéique, transcription des gènes ribosomiaux, transformation ribosomale spécifique de l'ARN et translocation des HSP70 au niveau du noyau). Cependant, leur récupération suite à ce choc thermique est aussi rapide et efficace que celle des cellules globalement thermotolérantes. Ainsi, une surexpression des petites protéines du choc thermique confère aux cellules, au même titre qu'une surexpression des protéines de la famille HSP70, une résistance globalement augmentée, en cas d'exposition à une température élevée (Arrigo *et al.* 1994).

Cette résistance pourrait reposer sur la capacité des sHSP à favoriser un redémarrage des phénomènes de transcription et de synthèse protéique, interrompus par le choc thermique. Une interaction de protéines non natives avec les oligomères sHSP qui s'accumulent lors d'un choc thermique pourrait également constituer l'un des mécanismes moléculaires de cette protection thermique. En effet, ce phénomène permet de prévenir une agrégation des protéines non natives entre elles et favorise leur repliement par d'autres chaperons tels que les HSP70. D'autre part, les sHSP sont capables d'interagir directement avec les microfilaments d'actine ; elles semblent donc idéalement désignées pour empêcher la rupture du réseau de microfilaments survenant suite à une exposition à un choc thermique ou à d'autres types de stress, protégeant ainsi la cellule d'une mort certaine. Enfin, il a récemment été démontré que ces protéines étaient capables d'intervenir en tant que régulateurs négatifs, dans le processus de mort cellulaire programmée.

*IV.2.1 Recouvrement des fonctions de transcription et de synthèse protéique, suite à un choc thermique, et notion de thermotolérance (Carper *et al.* 1997).*

La transcription de l'ADN en ARN et la synthèse des protéines font partie des principaux phénomènes affectés par une exposition des cellules à un stress thermique. On observe, en effet, au sein de cellules non thermotolérantes de type CHO (pour Chinese Hamster Ovary cells) une diminution d'environ 90 % de la synthèse protéique totale, à la suite d'un choc thermique. Dans les mêmes conditions, des cellules thermotolérantes connaissent une réduction de 50 % de leurs taux de synthèse protéique et mettent environ 7 heures pour récupérer des taux de synthèse avoisinant ceux d'avant le choc thermique. En comparaison, des lignées cellulaires de contrôle non thermotolérantes mettent environ 10 heures pour récupérer leurs taux initiaux, tandis qu'au sein de cellules surexprimant spécifiquement

HSP27, 6 heures suffisent à la réobtention d'une synthèse protéique normale. En ce qui concerne les taux de synthèse de l'ARN, une diminution de 60 % a été observée au sein des cellules non thermotolérantes. Les cellules thermotolérantes, quant à elles, connaissent une diminution de leurs taux qui n'est que de 40 %. Enfin, les cellules thermotolérantes recouvrent des valeurs proches de leurs valeurs initiales en environ 5 heures, les cellules de contrôle après 7 heures, les cellules surexprimant spécifiquement HSP27, en environ 5 heures également.

En fait, HSP27 ne semble protéger que légèrement les cellules des effets de la chaleur sur les synthèses de l'ARN et des protéines ; elle semble surtout favoriser un recouvrement de ces processus endommagés par le choc thermique.

Une expression constitutive d'HSP27 peut entraîner jusqu'à 100 % d'augmentation de la survie des cellules à un choc thermique unique, et ceci, bien que les deux processus étudiés précédemment, à savoir la synthèse de l'ARN et la synthèse protéique, ne fassent pas partie des phénomènes les plus impliqués dans la survie cellulaire. Le mécanisme exact par lequel HSP27 autorise une telle augmentation de la survie des cellules n'est pas précisément défini. Il semble impliquer le recouvrement rapide de nombreux processus physiologiques complexes, accordant aux cellules le temps nécessaire à la réparation de tous les dommages occasionnés par la chaleur, avant que ne débute la phase de division cellulaire.

Un recouvrement rapide des taux de synthèse de l'ARN et des protéines, suite à un choc thermique, participe à une diminution de la sensibilité thermique de la cellule, mais n'affecte pas l'acquisition d'une thermotolérance cellulaire. En effet, bien que la survie initiale d'une cellule à un choc thermique unique puisse varier de manière considérable en fonction des quantités intracellulaires d'HSP27 exprimées, toutes les lignées cellulaires étudiées ont développé une thermotolérance de même importance, quel que soit leur taux d'HSP27.

Ainsi, une surexpression de la seule petite protéine HSP27 et, d'une manière générale, celle d'une seule protéine du choc thermique ne suffit pas au développement du phénomène de thermotolérance. En fait, les quatre principales familles de protéines du choc thermique, dont les synthèses sont induites simultanément en réponse à un choc thermique, sont nécessaires à l'acquisition d'une thermotolérance efficace.

IV.2.2 Prévention de l'accumulation et de l'agrégation de protéines non natives, suite à un choc thermique (Jakob et al. 1993).

L'influence des petites protéines du choc thermique sur les phénomènes de dépliement et de repliement protéiques, suite à un choc thermique, a été mise en évidence lors d'une étude de Jakob *et al.* (1993). Cette étude met en jeu deux protéines thermosensibles, que sont une citrate synthétase mitochondriale et une α glucosidase. Les deux enzymes, incubées à des températures élevées, ont rapidement fait l'objet d'une dénaturation par perte de leurs conformations natives, accompagnée d'une tendance spontanée à la formation d'agrégats volumineux. L'introduction, dans le milieu d'incubation, de quantités prédéfinies de sHSP a permis de supprimer le phénomène d'agrégation. Ces observations démontrent que les sHSP sont capables de reconnaître et de se fixer à des protéines partiellement dépliées lors d'une exposition à un stress thermique, et de les protéger d'une agrégation irréversible, indépendamment de la présence d'ATP.

Le dépliement partiel et l'agrégation des protéines α glucosidases s'accompagnent d'une perte de leur activité enzymatique. Il a été démontré que les sHSP étaient capables d'influer sur les cinétiques d'inactivation de ces protéines : HSP27 a permis une augmentation de leur demi-vie d'inactivation de 5 à environ 10 min, selon un processus dépendant de sa concentration.

D'autres expériences ont été menées afin de déterminer le rôle des sHSP en tant que chaperons moléculaires, dans le mécanisme de repliement des protéines. La citrate synthétase et l' α glucosidase, incubées en l'absence de sHSP, ont bénéficié de taux de repliement d'environ 8 et 20 % respectivement. En présence d'HSP27, des taux de repliement de 25 et 45 % ont pu être mis en évidence, et le nombre de molécules correctement repliées s'est révélé hautement dépendant de la concentration en sHSP.

Ainsi, les sHSP ont été identifiées comme des chaperons moléculaires, capables de prévenir, à la suite d'un choc thermique, une agrégation irréversible des protéines endommagées par la chaleur. Elles sont également capables de promouvoir un repliement fonctionnel de ces protéines, soit en intervenant directement, soit en favorisant leur repliement par d'autres protéines du choc thermique.

Enfin, les interactions entre sHSP et protéines semblent ne pas nécessiter la présence d'ATP, contrairement à ce que l'on a pu observer jusqu'à présent pour les autres protéines du choc thermique.

IV.2.3 Préservation de l'intégrité du réseau de microfilaments d'actine

a) A la suite d'une exposition à un choc thermique (Lavoie *et al.* 1995).

* La phosphorylation de la petite protéine du choc thermique HSP27 participe à la modulation de la dynamique des microfilaments d'actine, en réponse à des facteurs de croissance, au sein de cellules non soumises à un stress. Lors d'un choc thermique, HSP27 subit une phosphorylation au niveau des mêmes sites et grâce aux mêmes protéines kinases que lors d'une stimulation mitogénique. Ceci laisse envisager une intervention active de la protéine dans les phénomènes de stabilisation et de protection des microfilaments, au sein des cellules stressées.

La rupture du cytosquelette et la désagrégation des fibres d'actine font partie des principaux effets immédiats du choc thermique chez les eucaryotes supérieurs. Ainsi, la stabilité des microfilaments d'actine constitue un facteur important dans la survie des cellules soumises à une hyperthermie ou à d'autres types de stress, et la stabilisation des microfilaments représente une cible déterminante de la fonction de protection cellulaire d'HSP27.

* Pour déterminer le rôle de la phosphorylation d'HSP27 dans la réponse au choc thermique et, plus précisément, dans la protection des microfilaments, plusieurs lignées cellulaires issues de hamsters chinois ont été développées : certaines expriment de manière constitutive différents taux d'HSP27 de type sauvage donc phosphorylable (= cellules HU27), d'autres une forme non phosphorylable de l'HSP27 humaine (= cellules HU27 pm3). Contrairement aux cellules HU27 qui présentent une capacité de survie très augmentée suite à un choc thermique, les cellules HU27 pm3 ne bénéficient que d'une augmentation substantielle de leur durée de vie.

Au sein des cellules HU27 pm3, les microfilaments présentent un caractère hautement thermosensible. Au sein des cellules HU27, l'HSP27 de type sauvage favorise une augmentation de la stabilité des structures filamenteuses et donc une diminution de leur thermosensibilité.

En fait, au sein des deux types de cellules, le choc thermique est responsable d'une rapide désagrégation de la structure des microfilaments d'actine au niveau du cortex cellulaire, et d'une rupture des fibres d'actine au sein du cytoplasme. Ces deux phénomènes sont à l'origine d'une perte des protubérances membranaires et d'une rétraction des cellules du substratum. Cependant, ces phénomènes présentent des degrés de sévérité différents selon le type de cellules. Au niveau des cellules HU27 pm3, les structures corticales et fibreuses d'actine filamenteuse subissent une désorganisation totale lors du choc thermique ; elles se retrouvent sous forme de structures granuleuses, ayant une tendance spontanée à la formation de petits agrégats cytoplasmiques ponctuels, généralement localisés à proximité de la membrane cellulaire. Ces altérations s'accompagnent d'un arrondissement des cellules, probablement dû à une contraction de l'actine F restante et à une adhérence réduite des cellules au substratum. Au niveau des cellules HU27, on observe par contre une certaine protection du cytosquelette : bien que les effets du choc thermique soient toujours sévères, de nombreuses cellules conservent des structures filamenteuses longues et étendues, ainsi que des protubérances membranaires contenant de multiples fibres d'actine.

Des études comparatives ont été menées entre cellules HU27 et cellules HU27 pm3, concernant les effets d'un apport cellulaire de cytochalasine D sur les microfilaments d'actine. La cytochalasine D est un inhibiteur hautement spécifique de la polymérisation de l'actine, capable d'interagir étroitement avec les extrémités «de croissance» des microfilaments, prévenant ainsi l'addition des monomères. Les cellules HU27 se sont révélées beaucoup plus résistantes à un traitement par la cytochalasine D que les cellules HU27 pm3. De plus, au sein des cellules HU27 traitées par la cytochalasine D, l'HSP27 de type sauvage a également permis une accélération de la reformation des microfilaments d'actine, au cours de la période de récupération suivant l'élimination de la molécule inhibitrice.

* L'induction de la phosphorylation d'HSP27 par des agents de stress ou des mitogènes s'accompagne d'une diminution de la taille des structures multimériques formées par la protéine. Cette réduction de taille semble être proportionnelle au degré de phosphorylation de la protéine. En effet, une phosphorylation maximale d'HSP27, telle qu'on l'obtient par exemple à la suite d'un traitement par l'arsenic, favorise une accumulation de complexes d'environ 125 KDa, tandis que des taux de phosphorylation intermédiaires, obtenus par stimulation thermique ou mitogénique, conduisent à l'obtention d'oligomères de 150 à 200 KDa environ.

D'un point de vue conformationnel, HSP27 pourrait donc s'apparenter à une structure multicouche, composée d'un core central stable d'environ 125 KDa (4 à 6 sous-unités) représentant le plus petit oligomère détectable, auquel peuvent se fixer d'autres molécules HSP27 sous forme monomérique ou dimérique, correspondant aux 25 à 50 KDa de différence, observés entre les différentes espèces. Le processus de fixation/défixation des sous-unités HSP27, au niveau du core central, pourrait être modulé par le phénomène de phosphorylation : lorsqu'une phosphorylation survient, les sous-unités HSP27 sont libérées du core central et se réassocient alors rapidement en une structure de type core. En effet, aucune particule solitaire de moins de 125 KDa n'a jamais pu être observée.

* En ce qui concerne la fonction protectrice d'HSP27, il semble que, très tôt au cours d'un stress, les changements conformationnels induits par la phosphorylation, au niveau des oligomères HSP27, puissent réguler l'activité de la protéine au niveau des microfilaments d'actine, permettant à la fois une augmentation de leur stabilité et une meilleure récupération après l'exposition thermique.

En l'absence de stress, la forme non phosphorylée d'HSP27 est capable de se fixer aux extrémités des microfilaments, limitant ainsi la polymérisation de l'actine. Lors d'une stimulation mitogénique, d'un choc thermique ou d'autres traitements toxiques pour la cellule, des changements surviennent au sein de la structure de la protéine, à la suite du phénomène de phosphorylation. Ces changements conformationnels pourraient réduire l'affinité de fixation d'HSP27, autorisant ainsi une augmentation de la cinétique d'addition des monomères d'actine. Au contraire, d'importantes quantités de la forme non phosphorylable d'HSP27 ont plutôt tendance à augmenter la durée de vie de la protéine à l'extrémité du microfilament et à diminuer le taux de polymérisation de l'actine ; ils rendent ainsi les filaments plus sensibles à une destruction par le stress, et moins répondeurs à une stimulation mitogénique.

b) Lors d'une exposition à un stress oxydatif (Huot *et al.* 1996).

De même qu'elle permet une stabilisation des microfilaments d'actine en réponse à un choc thermique, la phosphorylation d'HSP27 présente également une fonction homéostatique de préservation du réseau de microfilaments, lors d'un stress oxydatif.

* Des cellules, exposées à de l' H_2O_2 , sont le siège de modifications oxydatives qui, au niveau de l'actine, se traduisent par un rétrécissement et une fragmentation des fibres, ainsi que par une concentration de l'actine F autour du noyau. Des cellules HU27, exprimant l'HSP27 de type sauvage, bénéficient d'une protection vis-à-vis de ces manifestations toxiques, tandis que les cellules HU27 pm3, de par la présence d'une HSP27 non phosphorylable, sont beaucoup plus sensibles aux effets de l' H_2O_2 .

Il semble que la protection conférée par HSP27, vis à vis des phénomènes oxydatifs à type de fragmentation de l'actine, ne puisse être attribuée à des altérations du métabolisme de l' H_2O_2 . En effet, qu'il s'agisse des cellules HU27 ou HU27 pm3, des taux comparables en enzymes impliquées dans la biotransformation de l' H_2O_2 (glutathion peroxydase et catalase), ont été relevés. Les activités de ces enzymes se sont également révélées très semblables, ce qui renforce l'hypothèse que la résistance des cellules HU27 ne peut être attribuée à un catabolisme augmenté de l' H_2O_2 .

* Des expériences similaires, utilisant la ménadione comme agent oxydant, ont été menées sur les cellules HU27 et HU27 pm3. La ménadione participe activement au cycle d'oxydoréduction cellulaire et favorise, au même titre que l' H_2O_2 , la survenue d'altérations au sein du réseau de microfilaments d'actine. Elle est également un puissant activateur de la pp 45-54 HSP27 kinase. Les résultats obtenus ont montré que la ménadione était responsable d'une fragmentation de l'actine semblable à celle induite par l' H_2O_2 , au sein des cellules HU27 pm3, tandis que les cellules HU27 se montraient résistantes à cet effet.

Ainsi, il est possible de conclure que d'une manière générale, l'expression de l'HSP27 de type sauvage protège les cellules d'une rupture des microfilaments d'actine, induite par un stress

oxydatif (H_2O_2 ou ménadione par exemple), et que la phosphorylation de la protéine est indispensable à l'obtention de cet effet protecteur.

* Un point cependant mérite d'être précisé : bien que l'effet protecteur de l'HSP27 de type sauvage ait été observé au sein de toutes les lignées HU27 étudiées, une résistance générale de ces cellules au phénomène de mort cellulaire n'a pu être unanimement démontrée. Certaines lignées se sont révélées résistantes au phénomène de fragmentation de l'actine, et malgré tout très sensibles à la mort cellulaire induite par l'agent oxydant. Ceci démontre que les microfilaments d'actine ne constituent pas la seule cible cellulaire dont la préservation est susceptible de favoriser la survie de la cellule, suite à un traitement par H_2O_2 . En effet, les métabolites réactifs de l'oxygène sont également responsables d'altérations au niveau des membranes et de l'ADN, qui participent, au même titre que la dégradation des filaments d'actine, à une diminution du potentiel de survie de la cellule.

* Le maintien de l'intégrité du réseau de microfilaments reste cependant pour la cellule l'une des principales conditions autorisant sa survie lors de phénomènes oxydatifs. De plus, le fait que la phosphorylation d'HSP27 soit indispensable à l'obtention d'une protection efficace contre la fragmentation de l'actine, induite par les oxydants, suggère que la voie de phosphorylation d'HSP27 pourrait être elle-même un composant essentiel de la réponse adaptative au stress oxydatif. Comme on l'a vu précédemment, la phosphorylation d'HSP27 fait intervenir l'activation d'une pp 45-54 kinase, étroitement apparentée à la MAPKAP kinase 2. Cette enzyme, très sensible aux phénomènes de stress, est elle-même activée par une p 38 MAP kinase. Ainsi, la p 38 MAP kinase pourrait être l'une des principales actrices d'un processus métabolique, hautement sensible aux phénomènes de stress, qui, à travers la phosphorylation d'HSP27, conduit à une stabilisation des microfilaments. Ce processus pourrait représenter une toute première réponse cellulaire adaptative, prélude aux mécanismes généraux de défense contre le stress oxydatif.

IV.2.4 HSP27 et mort cellulaire programmée (Arrigo 1998).

a) Les sHSP, et notamment HSP27, interfèrent avec le processus de mort cellulaire déclenché par certains inducteurs de stress oxydatif, tels que le $TNF \alpha$.

* Le facteur de nécrose tumorale ou $TNF \alpha$, pour «Tumor Necrosis Factor», est une cytokine pro-inflammatoire qui permet, *in vivo*, l'élimination de cellules cancéreuses potentiellement dangereuses, en induisant leur suicide selon un mécanisme de type nécrotique. Le $TNF \alpha$ s'est également révélé cytotoxique, vis à vis de différentes cellules transformées, cultivées *in vitro*.

* Il a été démontré que la fixation du $TNF \alpha$ au niveau de ses récepteurs cellulaires s'accompagnait de la phosphorylation de polypeptides d'un poids moléculaire de 27 KDa, identifiés comme étant des membres de la famille des sHSP. Il semble ainsi que la phosphorylation d'HSP27 corresponde à une réaction de défense de la part de la cellule, soumise aux effets cytotoxiques de la cytokine.

* La stimulation des récepteurs cellulaires du $TNF \alpha$ conduit à une augmentation rapide des taux intracellulaires de radicaux libres de l'oxygène (RLO). A de faibles concentrations, les RLO sont capables de moduler l'expression de certains gènes. Cependant, lorsque leur taux est trop élevé, comme c'est le cas lors d'une stimulation par le $TNF \alpha$, ils sont directement responsables de dommages oxydatifs, pouvant conduire à la mort de la cellule.

* Le fait qu'une expression de sHSP permette une augmentation de la résistance cellulaire vis-à-vis d'oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène ou la ménadione laisse envisager la possibilité que ces protéines soient capables de protéger les cellules des effets du TNF α . En effet, il a été démontré qu'une expression de sHSP favorisait une diminution des taux intracellulaires de RLO et empêchait une production explosive de ces espèces réactives, en réponse à une stimulation par le TNF α . Les sHSP participent donc à une abolition des effets induits par les RLO, à type de peroxydation lipidique, d'oxydation protéique et d'activation du facteur de transcription NF κ B, pouvant conduire à une mort par nécrose (voir figure 28).

* Qu'il s'agisse de la diminution des taux de RLO ou d'une protection générale des cellules vis à vis du TNF α , l'activité des sHSP dépend de la présence, au niveau cellulaire, d'une molécule détoxifiante particulière, le glutathion. Ce tripeptide est l'une des principales sources cellulaires de groupements thiols, et protège les cellules des dommages oxydatifs ; il est essentiel à la fonction protectrice d'HSP27.

Une surexpression de sHSP provoque une augmentation du contenu cellulaire de glutathion, jusqu'à l'obtention d'une valeur plateau maximale. Cette augmentation particulière du taux de glutathion ne peut être détectée qu'au sein de cellules normalement dépourvues de toute expression constitutive de sHSP. Au sein d'autres types de cellules, contenant déjà des concentrations élevées de sHSP endogènes, le taux de glutathion n'est pas altéré par une surexpression de sHSP, probablement parce que le taux maximal de glutathion toléré par les cellules a déjà été atteint. Les sHSP semblent également capables de maintenir le glutathion sous une forme réduite, lors d'une exposition de la cellule à un stress oxydatif.

En fait, le mécanisme par lequel les sHSP favorisent une diminution des taux de RLO, permettent un maintien du glutathion sous sa forme réduite et donc stimulent le pouvoir réducteur de la cellule, n'est pas encore totalement connu. Plusieurs hypothèses ont été avancées :

- Puisque les sHSP se comportent comme des chaperons protéiques, il est possible qu'elles agissent comme des chaperons spécialisés vis-à-vis des enzymes impliquées dans la voie des RLO-glutathion, telles que la glutathion réductase, la Se-glutathion peroxydase, la glutathion transférase ou la glucose 6 phosphate déshydrogénase.

- Les sHSP pourraient stimuler la dégradation des protéines oxydées par les RLO.

L'analyse de l'organisation structurale de l'HSP27 de mammifère a permis un apport supplémentaire d'informations : à la suite d'un traitement des cellules par le TNF α , la masse moléculaire native de la plupart des HSP27 augmente de façon très importante et transitoire. Cette augmentation, qui correspond à la formation d'oligomères HSP27 de plus de 800 KDa, ne s'observe pas au sein de cellules surexprimant des enzymes détoxifiantes, telles que la glutathion peroxydase, ce qui suggère que la production intracellulaire très importante de RLO, générée par le TNF α , joue un rôle essentiel dans la formation de ces oligomères volumineux. Ainsi, la forme hautement agrégée d'HSP27 semble représenter la structure active de la protéine, tandis que la phosphorylation, en favorisant une accumulation d'HSP27 sous la forme d'oligomères de petite taille, conduit à une inhibition de l'activité protectrice de la protéine vis-à-vis du TNF α .

b) Les sHSP protègent les cellules de l'apoptose.

* Le phénomène d'apoptose peut être induit *in vitro*, au sein de cellules en culture, par une stimulation des récepteurs membranaires Fas/APO-1/CD95, par une exposition des cellules à la staurosporine (un inhibiteur des protéines kinases) ou enfin dans des conditions cellulaires particulières telles qu'une privation de facteurs de croissance.

Les récepteurs Fas/APO-1 présentent de nombreuses similitudes avec les récepteurs du TNF α . Cependant, ces deux types de récepteurs induisent des mécanismes de mort cellulaire très différents l'un de l'autre. Leurs ligands respectifs ont également des fonctions très différentes : le TNF α est responsable d'une éradication, par la nécrose, de certaines cellules tumorales, tandis que le Fas/APO-1 élimine spécifiquement, et selon un mécanisme de type apoptotique, des cellules non pathogènes.

* En ce qui concerne les sHSP, il a été démontré qu'une expression de l'HSP27 humaine était capable d'inhiber le processus apoptotique, induit soit par une stimulation des récepteurs Fas, soit par une exposition des cellules à la staurosporine. Le mécanisme moléculaire, par lequel la sHSP exerce son activité protectrice vis à vis de l'apoptose, demeure quant à lui relativement peu connu ; il semble cependant qu'HSP27 pourrait intervenir en amont de la cascade des caspases (voir figure 28).

Remarque : on ne sait encore pas si les sHSP, au sein du processus apoptotique, ont plutôt tendance à agir seules ou en collaboration avec d'autres protéines du choc thermique, telles que les HSP70, qui interviennent elles-mêmes à différents niveaux de ce processus.

* Les sHSP apparaissent actuellement comme de nouveaux régulateurs négatifs du phénomène de mort cellulaire programmée. Elles diffèrent cependant des autres protéines anti-apoptotiques connues à ce jour, telles que les familles IAP («Inhibitor of Apoptosis») et Bcl-2. En dépit du fait que les protéines sHSP et Bcl-2 sont capables l'une et l'autre de moduler les taux de RLO et de glutathion, leurs modes d'action lors de l'apoptose sont différents. De plus, aucune activité de type chaperon moléculaire, décrite pour HSP27, n'a pu être mise en évidence pour Bcl-2, et contrairement à Bcl-2, HSP27 n'est pas une protéine que l'on rencontre au niveau mitochondrial.

Enfin, puisqu'*in vivo* le TNF α provoque la destruction de certaines cellules de type cancéreuses, l'expression d'HSP27 pourrait être considérée soit comme un élément de protection des cellules saines vis à vis d'une destruction par le TNF α , soit comme un élément autorisant certaines cellules cancéreuses à échapper à l'immuno-surveillance dépendante de cette cytokine.

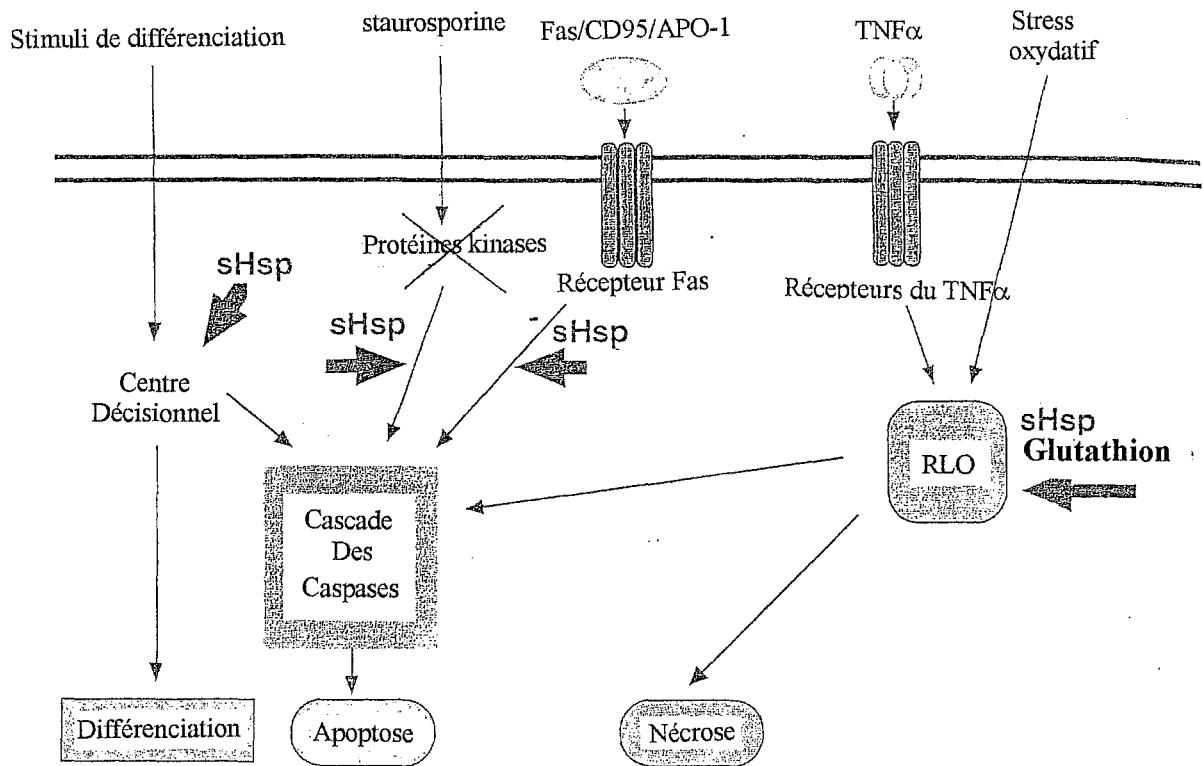


Figure 28 : Représentation schématique des différentes voies influençant l'expression des petites protéines du choc thermique (Arrigo 1998).

CHAPITRE II

PLACE DES HSP

EN

CANCEROLOGIE

Ire PARTIE

EXPRESSION DES HSP DANS LES CELLULES TUMORALES

De nombreuses caractéristiques se rapportant aux fonctions, à la régulation et à l'expression des protéines du choc thermique permettent d'envisager un rôle de ces protéines dans le processus du cancer. Cependant, toutes les HSP ne sont pas impliquées dans le phénomène : seuls quelques membres des familles HSP27, HSP60, HSP70 et HSP90 interviennent dans certains aspects du processus cancéreux.

La découverte d'une présence d'HSP (notamment HSP60 et HSP70) à la surface des cellules tumorales laisse envisager une intervention immunologique de ces protéines. En effet, elles représentent des déterminants antigéniques pour des groupes de cellules T d'origine $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$. Ainsi, il est possible que l'hyperthermie favorise non seulement le phénomène de mort cellulaire, mais également, par l'induction d'une expression membranaire d'HSP, une augmentation de l'antigénicité de la tumeur et donc une stimulation de la réponse immunitaire naturelle.

Etant donnée leur principale fonction de chaperon moléculaire, les HSP pourraient également jouer un rôle de transporteur pour des peptides antigéniques tumoraux, et/ou chaperonner certaines protéines oncogènes essentielles à la régulation de la prolifération cellulaire (c-myc, p53).

Enfin HSP70, et surtout la petite protéine du choc thermique HSP27, pourraient intervenir comme marqueurs intrinsèques des cellules tumorales, et parfois même comme facteurs pronostiques du devenir de certaines tumeurs.

I – Mise en évidence d'une expression et d'une localisation inhabituelles des protéines du choc thermique, au sein des cellules tumorales (Ferrarini *et al.* 1992).

Il a été démontré que des cellules tumorales exprimaient des taux bien plus élevés de HSP, comparés à ceux des cellules normales.

L'expression de ces HSP a été évaluée, en l'absence de stimulus environnemental, au sein de six lignées cellulaires tumorales : sur les six étudiées, deux lignées cellulaires exprimaient la protéine HSP72, normalement induite par le stress, et la plupart des lignées surexprimaient une HSP90 dans leur cytoplasme.

L'expression d'HSP72 a également été évaluée, en réponse à un choc thermique, à la fois au sein de cellules normales et de cellules tumorales. Les cellules normales ont toutes présenté une augmentation significative de leurs taux d'HSP72. Les cellules tumorales ont répondu de façon bien moins homogène au stress : trois lignées cellulaires sur les six n'ont présenté aucune variation de leur contenu en HSP72, et, sur ces trois, deux lignées exprimaient la protéine de manière constitutive.

Par ailleurs, au sein des cellules normales, il existe une corrélation entre l'expression d'HSP72 et le cycle cellulaire. A l'inverse, au sein des cellules tumorales, les taux cytoplasmiques d'HSP72 semblent ne pas être régulés au cours du cycle cellulaire.

Enfin, les cellules tumorales se distinguent des cellules normales par une répartition intracellulaire particulière d'HSP72, que l'on rencontre principalement au niveau nucléaire.

De plus, cette protéine, habituellement localisée à l'intérieur de la cellule normale, peut s'exprimer, dans le cas d'une tumeur, à la surface de la cellule.

II – HSP et antigénicité tumorale

II.1 Notion d'antigénicité tumorale (Srivastava *et al.* 1991)

Les antigènes tumoraux sont des molécules capables d'induire la mise en œuvre d'une réponse immunitaire antitumorale, au sein de l'hôte porteur de la tumeur. La nature de ces antigènes tumoraux est une question essentielle en immunologie cancéreuse. Un petit nombre de ces molécules a ainsi été défini sur un plan biochimique : certaines sont des antigènes viraux qui s'expriment au sein des cellules tumorales, d'autres apparaissent comme présentant une grande homologie avec certains des membres de la famille des protéines du choc thermique. Dans ce dernier groupe (celui des protéines du choc thermique), chaque antigène est donc une protéine modérément abondante, présente non seulement au sein des cellules tumorales, mais également au sein des tissus normaux.

II.2 Les HSP, en tant qu'antigènes tumoraux, s'expriment à la surface des cellules tumorales : mécanismes pour une expression membranaire des HSP

Les protéines du choc thermique sont traditionnellement localisées à l'intérieur de la cellule, au niveau du cytoplasme, de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique, du noyau ou du nucléole. Cependant, les HSP à caractère antigénique précédemment mentionnées ont été, tout au moins en partie, identifiées à la surface de la cellule tumorale. Ainsi, il semble que les HSP possèdent des fonctions immunologiques, qui nécessitent leur présence à la surface des cellules (Srivastava *et al.* 1991).

Une question se pose alors, à savoir la nature du mécanisme permettant à ces protéines d'être dirigées vers la surface de la cellule. En effet, la plupart d'entre elles (et notamment les HSP70) ne possèdent ni peptide signal conventionnel, autorisant un transport à travers les membranes, ni domaine d'ancrage transmembranaire (Multhoff *et al.* 1998 ; Ferrarini *et al.* 1992).

Ce transport des HSP semble en fait clairement distinct de la voie de sécrétion classique de classe I, du complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH. En effet, des molécules telles que la brefeldine A ou la colchicine, qui sont capables de bloquer la voie classique de transport des protéines, via le RE et l'appareil de Golgi, bloquent la sécrétion de polypeptides normalement véhiculés par cette voie, sans inhiber l'expression membranaire d'HSP70. D'autre part, HSP70 est transportée jusqu'à la membrane cellulaire sans compromettre l'intégrité de la cellule, ni nécessiter la mort de celle-ci. Ainsi, le transport des protéines du choc thermique, type HSP70, jusqu'à la surface de la cellule semble survenir de façon post-traductionnelle, selon un mécanisme cytoplasmique d'exportation protéique indépendant du Golgi, et non encore précisément défini (Multhoff *et al.* 1998 ; Multhoff *et al.* 1997).

Les hypothèses suivantes ont été proposées :

- les HSP pourraient être amenées à s'ancrer au niveau de la membrane plasmique de la cellule, en tant que constituants de complexes protéiques plus volumineux, dont certains composants seraient habilités à se fixer au niveau de la membrane (Multhoff *et al.* 1998).
- les HSP pourraient chaperonner d'autres protéines, au sein de vésicules intracellulaires d'exocytose, et donc être incorporées, à cette occasion, à l'intérieur des exosomes. De la même manière, elles pourraient être transportées jusqu'à la membrane plasmique, au sein de vésicules lysosomales, indépendamment de la voie du RE/Golgi (Multhoff *et al.* 1997).
- le métabolisme profondément altéré des cellules tumorales pourrait induire des perturbations dans le mécanisme classique de sécrétion, ce qui permettrait à des protéines inhabituelles de s'exprimer à la surface de la membrane ou d'être excrétées (Multhoff *et al.* 1998).
- enfin, l'environnement particulier des cellules tumorales (à savoir un milieu acide, hypoxique, pauvre en nutriments) favorise l'obtention d'un pH intracellulaire plus bas que celui des cellules normales. Ce pH pourrait être responsable de la survenue de changements conformationnels au sein des protéines de la cellule. En effet, il a été prouvé qu'un pH acide était capable, dans le cas de la toxine diphtérique, d'induire un changement conformationnel de la protéine, qui lui permettait d'interagir avec la membrane plasmique. Ainsi, HSP70 pourrait bénéficier d'un devenir identique au sein de la cellule tumorale, autorisant une expression de surface de la protéine (Multhoff *et al.* 1998).

II.3 Les différents rôles possibles des HSP dans l'antigénicité tumorale (Srivastava *et al.* 1991).

L'administration d'une préparation antigénique issue d'une tumeur, à un animal, favorise le développement d'une immunité antitumorale au sein de l'organisme animal, qui lui permet de faire face à une mise en contact ultérieure avec des cellules tumorales vivantes, provenant de la tumeur à partir de laquelle la préparation antigénique a été obtenue. La même préparation, issue de tissus normaux, est, quant à elle, dépourvue de la capacité d'induire une réaction immunitaire. Une étude comparative des structures d'antigènes issus de tissus normaux et tumoraux n'a pas pu mettre en évidence de différences fondamentales entre les deux types d'antigènes. Il a alors été suggéré que les protéines du choc thermique pouvaient ne pas porter elles-mêmes le caractère antigénique de la tumeur, mais plutôt servir de transporteurs à d'autres entités immunogènes, telles que de courts peptides. Ces protéines pourraient ainsi servir soit de molécules présentatrices de l'antigène, à l'image des molécules du CMH, soit de molécules accessoires, impliquées dans la préparation et la présentation de l'antigène par des molécules du CMH (voir figure 29).

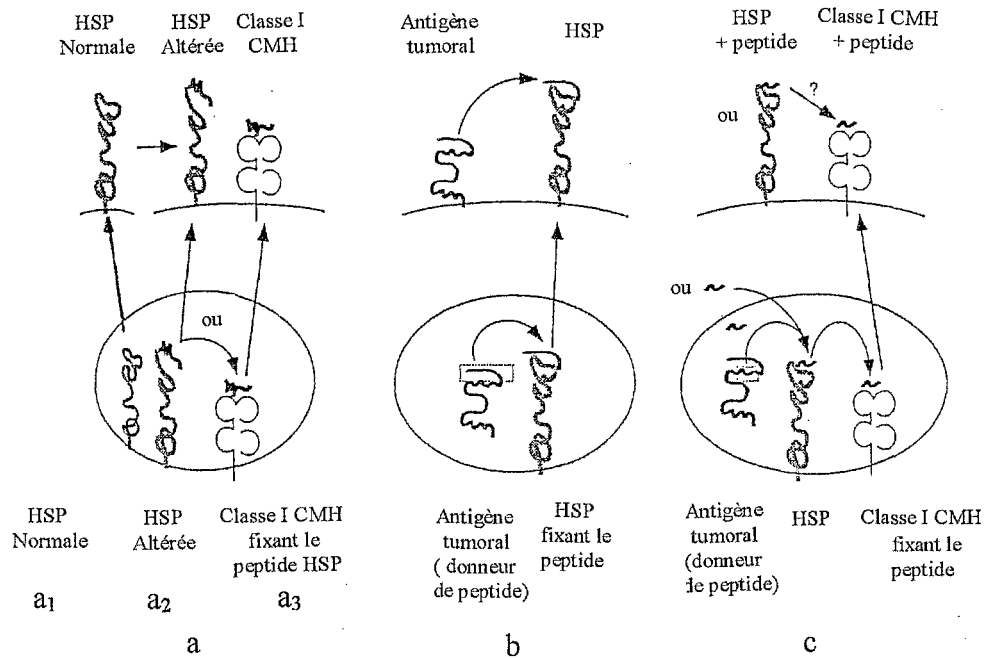


Figure 29 : Les différents rôles possibles des HSP dans l'antigénicité tumorale (Srivastava *et al.* 1991).

a₁- Des HSP normales peuvent s'exprimer de manière inhabituelle à la surface de la cellule tumorale.

a₂- Des HSP altérées, produites au sein d'une cellule transformée de type cellule tumorale, peuvent s'exprimer à la surface de celle-ci.

a₃- Des molécules de classe I du CMH sont capables de présenter, à la surface de la cellule tumorale, des portions peptidiques issues d'HSP altérées, produites par la cellule.

b- Les antigènes HSP ne sont pas immunogènes par eux-mêmes, mais peuvent le devenir en fixant de petits peptides dérivés d'antigènes distincts. Les HSP jouent alors le rôle de molécules présentatrices de l'antigène, à l'image des molécules du CMH.

c- Les HSP facilitent l'assemblage ou le réassemblage des molécules du CMH avec leurs peptides antigéniques, issus d'antigènes tumoraux, au sein du compartiment intracellulaire ou à la surface de la cellule.

II.4 HSP et immunité antitumorale

* L'immunité antitumorale protectrice passe par une reconnaissance des molécules antigéniques par des lymphocytes T :

- les lymphocytes T, qui présentent un récepteur (TCR) de type $\alpha\beta$, reconnaissent le peptide antigénique lorsqu'il est présenté par une molécule du CMH, ou par une HSP.

- les lymphocytes T, qui présentent un TCR de type $\gamma\delta$, ont plutôt tendance à reconnaître directement la molécule antigénique, lorsqu'elle s'exprime seule à la surface de la cellule. Il semble cependant exister des cas où les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont également capables de reconnaître des complexes antigènes/CMH (Kaufmann *et al.* 1994).

* Une proposition de mécanisme pour une réponse immunitaire antitumorale induite par les HSP est schématisée figure 30.

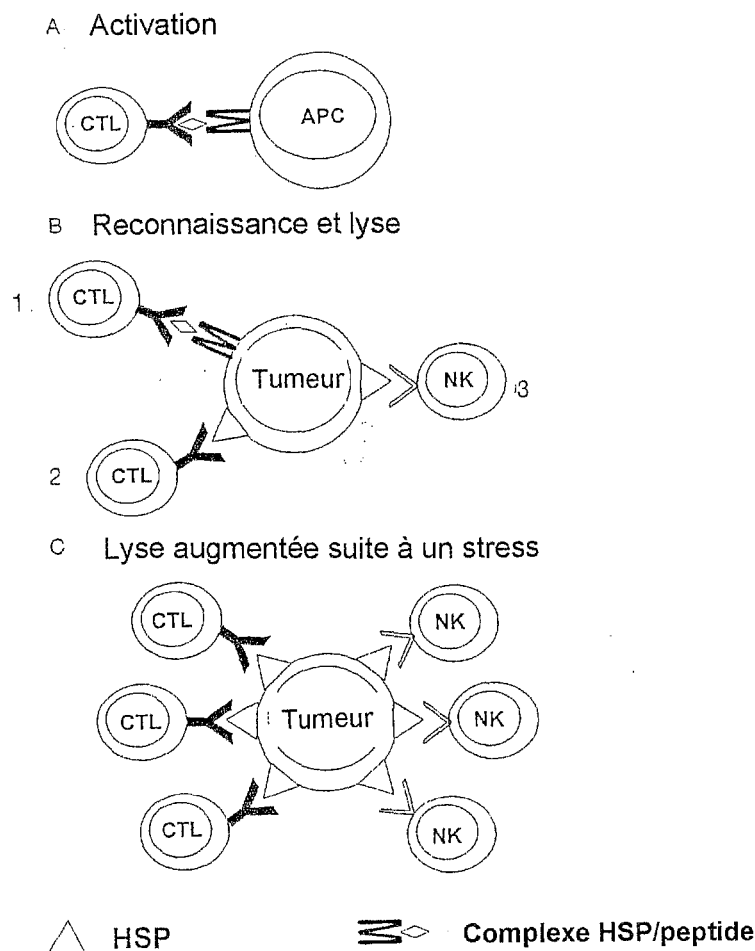


Figure 30 : Illustration schématique d'une réponse immunitaire antitumorale induite par les HSP (Multhoff *et al.* 1998)

Des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont activés par des cellules présentatrices de l'antigène ou APC (macrophages par exemple), qui expriment à leur surface des peptides tumoraux chaperonnés par des HSP (figure 30, A).

Ces CTL préactivés sont alors capables de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales cibles, qui expriment à leur surface les complexes HSP/peptides tumoraux. Il s'agit, dans ce cas précis, d'une réponse immunitaire impliquant une reconnaissance des antigènes tumoraux par des lymphocytes T de type $\alpha\beta$, d'une façon dite «restreinte par le CMH» (figure 30, B₁).

A côté de cette réponse immunitaire restreinte par le CMH et faisant intervenir des lymphocytes T $\alpha\beta$, il semble qu'une réponse non restreinte par le CMH intervienne, impliquant, pour sa part, des lymphocytes T de type $\gamma\delta$. Il s'agit, cette fois-ci, d'une reconnaissance directe, par le lymphocyte T, d'une HSP60 ou d'une HSP70, qui s'exprime seule à la surface de la cellule tumorale (figure 30, B₂).

Enfin, une protéine HSP70, présente à la surface de la cellule tumorale, peut intervenir dans la reconnaissance de cette cellule par le système immunitaire, en tant que «signal positif de reconnaissance» pour des cellules Natural Killer (figure 30, B₃). En effet, il a été démontré (Multhoff *et al.* 1997) que la sensibilité de cellules tumorales à la lyse par un groupe de cellules NK (Natural Killer) était étroitement corrélée à l'expression d'HSP70, à la surface des cellules tumorales. Il a également été suggéré que les cellules NK étaient capables de reconnaître, à l'image des lymphocytes T $\alpha\beta$, des peptides tumoraux présentés par des HSP70.

Un stress physique (par exemple un choc thermique non léthal) ou chimique entraîne une augmentation de l'expression d'HSP70 à la surface de certaines cellules cancéreuses (sarcomes, lymphomes). Cette quantité augmentée d'HSP70, au niveau de la membrane plasmique, s'accompagne d'une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales à la lyse par les lymphocytes T et les cellules NK (figure 30, C).

* Les HSP peuvent être présentées par des molécules de classe I du CMH et reconnues par des lymphocytes T de type $\gamma\delta$.

Les molécules de classe I, codées au sein du complexe majeur d'histocompatibilité, présentent un rôle spécifique de présentation de l'antigène aux cellules T, et plus particulièrement aux lymphocytes T de type $\alpha\beta$. Il a néanmoins été proposé que ces molécules pouvaient être reconnues comme molécules présentatrices de l'antigène, par des cellules T de type $\gamma\delta$. Etant donné que les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont capables de reconnaître des protéines du choc thermique, il a été proposé que des molécules de classe I pouvaient jouer un rôle dans la présentation des HSP aux cellules T $\gamma\delta$.

Ainsi, les protéines de stress, synthétisées au sein de cellules «malades» (infectées ou cancéreuses), pourraient être dégradées, et les peptides obtenus pris en charge par des molécules de classe I nouvellement synthétisées. Lorsque ces complexes moléculaires atteignent la surface de la cellule, ils fournissent au système immunitaire un signal précoce de reconnaissance.

Enfin, il a été proposé que les lymphocytes T $\gamma\delta$ pouvaient être impliqués dans les toutes premières étapes de la réponse immunitaire cellulaire. Ainsi, en tant que première population impliquée dans la reconnaissance des cellules «malades», ces lymphocytes sont à l'origine,

via leur activation et la production de cytokines, de la stimulation de la réponse cellulaire lymphocytes T $\alpha\beta$ dépendante, qui, au final, est responsable de la disparition totale des pathogènes (Imani *et al.* 1996).

II.5 Les HSP dans le processing et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T Helper (Pierce 1994).

La reconnaissance d'un antigène étranger par les lymphocytes T Helper nécessite une préparation particulière de l'antigène ou «processing», et une présentation de cet antigène par des cellules APC, exprimant des molécules de classe II du CMH. Le processing implique une internalisation de l'antigène dans un compartiment acide, au cœur de l'APC, une protéolyse de la molécule, et la fixation des fragments peptidiques obtenus à des molécules de classe II du CMH. Les complexes peptide/CMH sont alors exprimés à la surface de l'APC, afin de permettre une reconnaissance par les cellules T Helper.

La production de complexes peptide/CMH de classe II, par une cellule APC, est un processus intracellulaire complexe de repliement et d'assemblage protéiques. Comme la plupart des processus d'assemblage survenant au sein de la cellule, il nécessite l'intervention de chaperons moléculaires, dont certains ont été identifiés comme étant des membres de la famille HSP70.

Les molécules de classe II du CMH sont des protéines membranaires, composées d'une chaîne α et d'une chaîne β . Les deux chaînes, en s'associant, délimitent un sillon de fixation du peptide, pouvant accepter des chaînes peptidiques d'un minimum de 8-9 acides aminés. Dès leur synthèse au sein du RE, les chaînes α et β constituent des dimères, qui présentent un caractère instable en l'absence de fixation du peptide. Les hétérodimères $\alpha\beta$ s'associent alors rapidement avec une chaîne «non polymorphique», appelée la chaîne «invariante» (Ii). Les complexes $\alpha\beta$ Ii existent sous forme de trimères, qui se constituent progressivement au sein du RE, par l'association de trois dimères $\alpha\beta$ avec un trimère Ii. Ces complexes sont transportés à travers l'appareil de Golgi jusqu'à un compartiment endosomal post-golgique, où ils se dissocient, et où les dimères $\alpha\beta$ fixent l'antigène ayant pénétré la cellule par la voie endocytaire.

Depuis quelques années, les membres de la famille HSP70 ont été proposés pour une intervention en tant que chaperons moléculaires, dans le processing de l'antigène. Contrairement à ce que l'on observe *in vitro*, la formation, au sein d'une APC, des complexes impliquant les peptides antigéniques survient très rapidement (entre 15 et 30 minutes) après que le peptide soit entré dans la cellule ; les complexes ainsi formés ont également la propriété de se dissocier très rapidement. Ceci peut s'expliquer par le fait que les APC renferment des protéines de type chaperon, qui facilitent l'assemblage et la dissociation des complexes antigène/CMH.

Une purification des principales protéines présentant une affinité pour les peptides, au sein des cellules APC, a permis de mettre en évidence l'existence de trois à quatre protéines dominantes, d'un poids moléculaire de 70 KDa. Les trois protéines les plus abondantes ne semblent pas jouer un rôle dans le processing de l'antigène : il s'agit de l'HSP70 réticulaire ou protéine BiP, de l'HSC70 cytoplasmique, et d'une HSP70 mitochondriale appelée PBP74. Cependant, une protéine de 72-74 KDa a été identifiée, au sein des compartiments

subcellulaires précédemment décrits comme étant les sites d'assemblage des complexes antigène/classe II du CMH. Ainsi, cette protéine, apparentée sur un plan sérologique à la famille HSP70, semble intervenir, au sein des compartiments cellulaires où elle se trouve et où elle est protégée de l'action des protéases, dans le phénomène de processing de l'antigène.

III – HSP et prolifération tumorale

Le développement d'une tumeur dépend de la balance entre les taux de prolifération et de mort cellulaire. Les agents capables de provoquer une croissance tumorale peuvent le faire de deux façons : soit par stimulation de la prolifération cellulaire, soit par diminution du taux de mort cellulaire programmée ou apoptose. De plus, tandis que la croissance de la plupart des tumeurs est probablement due à une activation des oncogènes promoteurs de la prolifération cellulaire et à une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur, la croissance tumorale pourrait également être augmentée, *in vivo*, par l'activation de gènes, dont les produits permettent aux cellules d'échapper à la surveillance immunologique de l'organisme hôte (Fuller *et al.* 1994 ; Jäättelä *et al.* 1992).

III.1 Une surexpression d'HSP70 protège les cellules tumorales de l'apoptose

En ce qui concerne la protection vis-à-vis du phénomène d'apoptose, les HSP se comportent au sein des cellules tumorales comme au sein des cellules normales. Ainsi, le processus d'apoptose s'accompagne d'une expression accrue des HSP, dont l'activité protectrice passe par une intervention à différents niveaux du métabolisme cellulaire. En voici quelques exemples :

- les HSP limitent la dégradation protéique caspases dépendante,
- elles protègent contre les effets des oxydants ou RLO,
- elles protègent les mitochondries.

III.2 Les deux protéines du choc thermique HSP70 et HSP27 jouent un rôle essentiel dans les toutes premières étapes de la tumorigénèse, en permettant aux cellules tumorales d'échapper à la surveillance immunologique

*III.2.1 Une surexpression d'HSP70 protège les cellules tumorales des effets cytotoxiques des TNF α et β (Jäättelä *et al.* 1992).*

Les facteurs de nécrose tumorale α et β jouent un rôle essentiel dans la destruction des cellules tumorales, *in vitro*, par des macrophages activés et des lymphocytes cytotoxiques, dont on sait qu'ils contribuent activement aux premières étapes d'une surveillance immunitaire antitumorale. Les TNF α et β sont eux-mêmes produits par d'autres cellules immunitaires, ayant probablement une activité antitumorale *in vivo*. Ainsi, une résistance des cellules tumorales à l'action cytotoxique des TNF semble être un phénomène essentiel au développement d'une tumeur primaire *in vivo*.

Le mécanisme par lequel des cellules tumorales résistent à la mort induite par les TNF demeure encore incomplètement établi. Il a été démontré qu'un blocage des synthèses protéiques permettait à des cellules, préalablement résistantes au TNF, de devenir sensibles à ce facteur. Ainsi, cette sensibilité à la mort cellulaire induite par les TNF serait due à une absence de protéines protectrices, exprimées de manière constitutive au sein des cellules

résistantes. HSP70, qui est synthétisée à des températures normales au sein de certaines cellules tumorales, est l'une de ces protéines protectrices.

En fait, deux notions importantes ont été mises en évidence par Jäättelä *et al.* (1992) :

- un traitement par la chaleur et une surexpression d'HSP70 confèrent des degrés de résistance identiques vis-à-vis du TNF ; ceci suggère qu'HSP70 joue un rôle essentiel dans cette résistance, au sein de cellules soumises à un choc thermique ou à d'autres types de stress ;
- de faibles taux d'HSP70, exprimée de manière constitutive, peuvent également conférer une résistance partielle vis-à-vis du TNF, au sein de cellules non stressées.

Enfin, en ce qui concerne le mode d'action d'HSP70, il semble qu'elle intervienne en aval de la fixation des TNF à leurs récepteurs, sans interférer avec les mécanismes de transduction du signal, nécessaires à l'activation du facteur de transcription NF κ B.

III.2.2 Les protéines HSP70 et HSP27 protègent les cellules tumorales des effets cytotoxiques de certaines cellules immunitaires effectrices (monocytes) et du stress oxydatif (Jäättelä et al. 1993).

Des cellules, capables de détruire un large spectre de cellules tumorales, sans spécificité apparente, constituent une première ligne de défense indispensable vis-à-vis du processus malin. Parmi ces cellules douées d'une capacité de destruction spontanée, on dénombre des cellules de type NK, des cellules naturellement cytotoxiques et des monocytes. L'induction d'une réponse au choc thermique au sein de cellules tumorales les rend partiellement résistantes à la cytotoxicité induite par les TNF α et β , les monocytes activés et les lymphocytes cytotoxiques.

En ce qui concerne la sensibilité des cellules tumorales aux monocytes, trois points importants ont été démontrés (par Jäättelä *et al.* 1993) :

- une brève exposition des cellules tumorales à la chaleur les protège d'une mise en contact ultérieure avec des monocytes ;
- des lignées cellulaires exprimant HSP70 de manière constitutive se révèlent aussi résistantes, vis-à-vis des monocytes, que des cellules de contrôle traitées par la chaleur ;
- une surexpression de la petite protéine du choc thermique, HSP27, permet également aux cellules d'être légèrement, mais significativement, plus résistantes à la destruction par les monocytes.

Rôles du TNF α et des radicaux libres dans cette cytotoxicité monocyttaire :

Le TNF α est l'un des principaux médiateurs de la cytotoxicité monocyttaire. Comme on l'a vu précédemment, une surexpression d'HSP70 rend les cellules plus résistantes à la cytotoxicité du TNF α . Ainsi, cette résistance induite par les HSP70, vis-à-vis du TNF α , pourrait expliquer en partie la résistance vis-à-vis des monocytes.

La production et le relargage de radicaux libres de l'oxygène font partie du programme de lyse cellulaire, utilisé par les monocytes, pour détruire les cellules tumorales. Ainsi, la résistance des cellules tumorales, induite par la production des HSP70 et HSP27, vis-à-vis de la cytotoxicité des monocytes, pourrait être due à une meilleure tolérance au stress oxydatif. De plus, la production intra-cellulaire de radicaux libres fait également partie du mécanisme de lyse utilisé par les TNF. Ainsi, la résistance au stress oxydatif, induite par les HSP, pourrait expliquer, tout au moins en partie, la résistance induite par ces mêmes protéines vis-à-vis des TNF et des monocytes.

III.3 HSP70, proto-oncogènes et p53 (Morimoto 1991).

Les HSP jouent un rôle indirect dans le développement du cancer de par leur capacité d'interagir avec des protéines cellulaires normales et mutées. Les HSP sont capables d'interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans les cancers : HSP70 est impliquée dans des interactions de type protéine-protéine avec les produits de l'oncogène humain *c-myc* et du gène suppresseur de tumeur *p53*.

III.3.1 HSP et produits des proto-oncogènes

Les proto-oncogènes sont des homologues cellulaires de gènes viraux impliqués dans certains cancers. Ces gènes cellulaires sont des constituants génétiques normaux de la cellule. Ils contribuent pour certains d'entre eux à des fonctions importantes de la vie embryonnaire ou du développement des organismes. Ces gènes ne sont pas forcément associés à un pouvoir oncogène ; seul leur mauvais fonctionnement dû à une anomalie de leur structure ou de leur système de régulation peut induire une activité oncogène. Les protéines codées par les oncogènes peuvent agir soit au niveau nucléaire pour changer l'expression d'autres gènes, soit au niveau post-transcriptionnel. Cependant, la transformation tumorale ne peut résulter de l'activation simple d'un oncogène, d'autres événements génétiques doivent intervenir pour permettre l'obtention d'une transformation cellulaire.

Les produits des proto-oncogènes sont capables d'interagir avec les HSP. Comme les HSP, ils sont synthétisés de manière rapide et transitoire en réponse à divers stimuli (par exemple, un choc thermique), qui favorisent également une augmentation de la stabilité des ARNm *c-fos* et *c-myc*.

De plus, les proto-oncogènes sont impliqués dans l'expression de l'HSP70 elle-même. En effet, le produit du gène *c-myc* a été mis en évidence au niveau du noyau de la cellule, ce qui suggère une possible implication de cette protéine dans la régulation de l'expression de certains gènes. Le fait que le taux d'expression du gène *HSP70* de mammifère soit élevé, au sein de plusieurs lignées cellulaires tumorales, implique qu'une fonction cellulaire, exprimée au sein de ces lignées tumorales, stimule la production d'HSP70. Selon Kingston *et al.* (1984) le produit du gène *c-myc* est capable de stimuler l'expression de l'HSP70 de drosophile. Le même phénomène a été rapporté pour la protéine HSP70 humaine, avec, dans les deux cas, une stimulation qui s'effectue d'une manière distincte de l'expression basale ou de l'induction par un choc thermique, du sérum ou des virus. Cette stimulation dépend de deux séquences, localisées plus de deux cents bases en amont du point de début de transcription du gène *HSP70*. La présence de ces deux séquences au niveau de la région promotrice du gène *HSP70*, capables de fixer la protéine *c-myc*, laisse envisager la possibilité que cette protéine, ou un complexe protéique contenant la protéine, puisse jouer un rôle dans l'expression d'HSP70, par interaction directe avec le promoteur (Fuller *et al.* 1994 ; Kingston *et al.* 1984).

III.3.2 HSP et p53

a) p53 sauvage et mutée : implications dans les processus de prolifération et de tumorigénèse

Le gène suppresseur de tumeur *p53* est un gène régulateur de la croissance cellulaire, impliqué dans le maintien d'une prolifération cellulaire normale (Finlay 1992).

Les phénotypes «sauvage» et «muté» représentent les différentes conformations de la protéine *p53* correspondante. Cette conformation est tout à fait critique en ce qui concerne les fonctions de la *p53*. Seul le phénotype sauvage correspond à la forme suppressive de la protéine (Milner *et al.* 1991). La protéine *p53* sauvage est capable d'arrêter le cycle cellulaire lorsque des dommages surviennent au sein de l'ADN. Son mode d'action comporte une fixation au niveau d'une séquence spécifique de l'ADN, et l'activation transcriptionnelle de gènes spécifiques : gènes codant pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, dans l'arrêt de la croissance cellulaire à la suite de dommages touchant l'ADN, et dans l'apoptose (Fourie *et al.* 1997). L'effet anti-prolifératif de cette *p53* sauvage réside également dans sa capacité, quand elle est surexprimée, d'inhiber le phénomène de transformation cellulaire induit par les oncogènes (Agoff. *et al.* 1993). Une perte de la protéine sous sa forme suppressive s'accompagne ainsi d'une prolifération cellulaire, pouvant entraîner une progression tumorale (Milner *et al.* 1991).

En réponse à un stimulus de croissance cellulaire, on observe un changement de conformation de la *p53*, du type sauvage à un type muté réversible. Ce phénomène est, dans ce cas précis, sans conséquences néfastes ; il constitue, au contraire, une étape essentielle de la réponse normale de croissance cellulaire, qui s'accompagne d'une interruption transitoire de l'effet suppresseur de la *p53* sauvage (Milner *et al.* 1991).

L'inactivation de la *p53* par délétions ou mutations ponctuelles ou par interaction avec d'autres protéines cellulaires ou virales constitue une étape clé dans le développement de nombreux cancers humains (Fourie *et al.* 1997). La survenue de mutations et/ou de délétions au niveau d'un allèle du gène et de délétions au sein du second allèle sont les lésions génétiques les plus communes rencontrées dans les cancers (Fuller *et al.* 1994). Les mutations s'expriment au sein de régions conservées de la protéine et altèrent sa fonction de fixation spécifique à l'ADN, soit parce qu'elles touchent des résidus essentiels à cette activité, soit parce qu'elles désorganisent, dans son ensemble, la structure tertiaire de la molécule (Fourie *et al.* 1997).

Les protéines *p53* mutées, aux structures tertiaires altérées, présentent une demi-vie augmentée dans la plupart des cas, par rapport à la demi-vie de 20 minutes que l'on observe pour le type sauvage, ainsi qu'une plus grande stabilité (Fuller *et al.* 1994).

b) Interactions entre HSP70, *p53* mutée, *p53* sauvage

L'oncogène nucléaire *p53* s'exprime souvent à des taux élevés au sein des lignées cellulaires tumorales, mais également au sein de cellules transformées par des virus ou chimiquement. A l'inverse, les taux de *p53* au sein de cellules non transformées sont relativement faibles et la demi-vie de la protéine est courte. Au niveau de cellules transformées par le virus simiesque 40 ou SV40, l'élévation des taux de *p53* participe au processus de transformation virale. Cette élévation résulte d'une stabilisation de la protéine par interaction avec l'antigène T du virus SV40, au sein d'un complexe protéique oligomérique (Finlay *et al.* 1987). En ce qui concerne

les cellules tumorales, les altérations conformationnelles de la protéine p53 mutée favorisent la survenue d'interactions entre la protéine et des protéines du choc thermique de type HSP70. Les complexes HSP70/p53 mutée sont relativement stables, contrairement aux complexes qui se forment entre les HSP70 et les p53 sauvages, dont la dissociation rapide autorise l'oligomérisation des p53 sauvages entre elles. La formation d'un complexe HSP70/p53 mutée augmente la durée de vie de la p53 mutée et favorise une présentation de cette p53 (assimilée à un antigène tumoral) au système immunitaire. Cependant, du fait de sa longue durée de vie, la p53 mutée s'accumule, ce qui contribue au phénomène de transformation des cellules (Bensaude 1992).

Les interactions entre p53 mutées et HSP70 ont fait l'objet d'études (Fourie *et al.* 1997) dans le but de déterminer les principaux sites de fixation d'HSP70 au niveau de la protéine p53.

La protéine p53 renferme trois principaux domaines fonctionnels :

- le domaine N-terminal, responsable de la fonction de transactivation transcriptionnelle,
- le domaine «core» central, nécessaire à l'activité de fixation spécifique à l'ADN,
- le domaine C-terminal, qui renferme les séquences de localisation nucléaire, le domaine d'oligomérisation, et les sites régulateurs de la phosphorylation.

Les sites de fixation pour les chaperons moléculaires de type HSP70 sont exposés quand la p53 adopte une conformation mutée. Il a été démontré que la plupart de ces sites de fixation de haute affinité correspondaient à des éléments structuraux secondaires de type feuillets β , situés au niveau du core hydrophobe du domaine central de fixation à l'ADN, où une grande majorité des mutations surviennent. Bien que des peptides, localisés au niveau de la région C-terminale de la protéine, aient été identifiés comme présentant des sites de fixation potentiels, il apparaît que des protéines p53, comportant des délétions C-terminales, sont malgré tout capables de fixer les HSP70. Ceci indique que cette région n'est pas indispensable à la formation des complexes. Ainsi, il a été proposé que les mutations survenant au sein de la protéine p53 pouvaient altérer la structure tertiaire du domaine central de fixation à l'ADN, permettant une exposition de sites de haute affinité pour l'HSP70, normalement cachés au sein de la molécule de type sauvage.

Une formation de complexes entre les protéines p53 sauvages et mutées a été mise en évidence au sein de certaines cellules transformées. En effet, la p53 mutée, du fait de sa longue durée de vie, s'accumule au sein de la cellule et s'associe à la p53 sauvage. Cette interaction entre les deux protéines inhibe le fonctionnement de la p53 sauvage, et favorise un passage de la protéine sous une forme mutée, prévenant ainsi toute possibilité de fixation à l'ADN. La capacité de la p53 mutée à affecter le phénotype conformationnel de la p53 sauvage pourrait, *in vivo*, contribuer à l'effet promoteur de tumeurs de la ou des mutation(s). En interférant avec la capacité qu'a la p53 de type sauvage de maintenir une activité «suppressive» de la prolifération cellulaire, les mutants p53 activés exercent un effet négatif dominant sur le contrôle de la croissance cellulaire (Milner *et al.* 1991).

L'importance que revêt l'inhibition de la p53 sauvage par la p53 mutée est réduite par une surexpression d'HSP70. En effet, la surproduction d'HSP70 pourrait défavoriser la

dissociation des complexes HSP70/p53 mutée et donc la formation de complexes p53 mutée/p53 sauvage, ce qui protégerait la fonction normale de la p53 sauvage et supprimerait l'activité oncogène des p53 mutées (voir figure 31) (Fuller *et al.* 1994 ; Bensaude 1992).

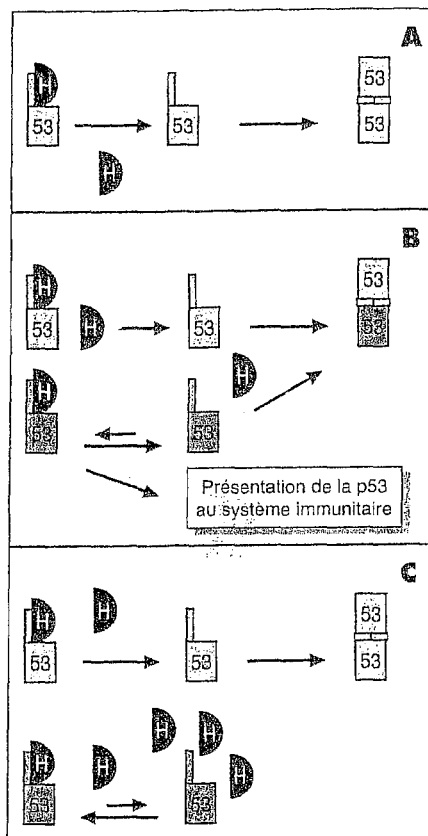


Figure 31 : Interaction entre les protéines de choc thermique HSP70 et l'antigène tumoral p53. En A, la protéine p53 sauvage qui vient d'être synthétisée forme un complexe instable avec les HSP70 (H). En B, une protéine p53 mutée (grisée) est synthétisée en même temps que la p53 sauvage. Le complexe HSP70/p53 mutée est relativement stable, ce qui augmente la durée de vie de la p53 et favorise la présentation de la p53 mutée au système immunitaire. Du fait de sa longue durée de vie, cette p53 mutée s'accumule et s'associe à la p53 sauvage en l'inactivant, d'où le phénotype oncogène dominant des p53 mutées. En C, la surproduction d'HSP70 défavoriserait la dissociation des complexes HSP70/p53 mutée et donc la formation de complexes p53 mutée/p53 sauvage d'où restauration du phénotype non transformant de la p53 sauvage endogène (Bensaude 1992).

c) Propriétés régulatrices de la protéine p53 vis-à-vis du gène *HSP70* (Agoff *et al.* 1993).

La protéine p53 suppressive de tumeur est une phosphoprotéine nucléaire qui possède deux propriétés caractéristiques d'un facteur de transcription : la capacité de fixation à l'ADN et l'activation transcriptionnelle. Ainsi, la p53 pourrait stimuler la transcription de gènes dont les produits suppriment la prolifération cellulaire. Bien que ces cibles potentielles n'aient pas encore été précisément identifiées, on sait que la p53 est capable de réprimer la transcription de différents gènes régulateurs de croissance, ce qui est cohérent avec une implication de la protéine dans un arrêt de la croissance, lors du passage des cellules de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.

Agoff *et al.* (1993) ont étudié les effets des p53 sauvage et mutée sur le gène *HSP70* humain régulateur de croissance. Ce gène s'exprime en fin de phase G1 et en début de phase S, un mode d'expression semblable à celui de la p53.

Ainsi, l'expression du gène *HSP70* fait intervenir, au niveau de la région promotrice du gène, la fixation d'un facteur CBF (pour «CCAAT Binding Factor»), dont la régulation repose sur une intervention de la protéine p53. Par contre, seule la forme sauvage de la p53 est capable de réguler l'expression du gène *HSP70* par interaction avec le CBF, la forme mutée s'étant révélée dépourvue de cette activité.

La capacité qu'a la p53 de s'associer avec le CBF et de réguler son activité implique que la protéine, en plus de son rôle en tant que facteur de transcription (c'est-à-dire par interaction directe avec l'ADN), peut également fonctionner par interactions de type protéine/protéine dans le contrôle de la transcription à partir des promoteurs, donc sans nécessité de fixation à l'ADN.

d) HSP70, p53 et réponse immunitaire humorale (Davidoff *et al.* 1992).

Des taux intracellulaires augmentés de la protéine p53, résultant de mutations au niveau du gène qui augmentent la stabilité de la protéine, ont été détectés, lors d'une étude, chez plus de 25 % de cancers primaires du sein. De plus, environ 10 % des patients étudiés possédaient des anticorps circulants dirigés contre cette protéine p53.

Dans une de leurs études, Davidoff *et al.* (1992) ont mis en évidence que cette réponse humorale, dirigée contre la protéine p53 mutée, dépendait à la fois des taux de protéine et des types de mutations exprimés par la tumeur. De plus, il s'est révélé que toutes les tumeurs qui induisaient une réponse anticorps dépendante renfermaient des complexes p53 mutée/HSP70, tandis que toutes les tumeurs dépourvues d'anticorps ne contenaient pas non plus de complexes.

Ceci démontre à nouveau la possibilité d'un rôle pour HSP70 dans la présentation antigénique de la p53 mutée : la protéine du choc thermique pourrait ainsi accompagner la protéine p53 mutée dans sa translocation du noyau jusqu'à la surface cellulaire, où cette dernière pourrait soit être relarguée dans l'espace extracellulaire, soit jouer un rôle immunitaire.

IV – HSP70 et HSP27 : facteurs pronostiques ?

Le taux d'expression d'HSP70 s'est révélé utile en tant que facteur pronostique du devenir de certains cancers du sein. Cependant, la protéine du choc thermique la plus importante dans ce domaine qu'est la prévision de l'évolution des cancers semble être HSP27. Des taux augmentés d'HSP27 ont été mis en évidence dans un certain nombre de cancers, tels que le cancer d'ascite Ehrlich, le cancer du sein ou certaines leucémies. Les HSP27 présentes au sein des cellules tumorales et celles observées au sein des cellules normales sont identiques, à l'exception parfois de leur degré de phosphorylation. Une expression élevée d'HSP27 dans le cancer du sein s'accompagne d'un taux de survie médiocre. A l'inverse, des patients porteurs d'un histiocytome fibreux malin, qui expriment des taux élevés d'HSP27, ont de meilleures chances de guérison.

IV.1 L'HSP70 comme facteur pronostique dans le cancer du sein : cas d'un cancer du sein sans ganglions lymphatiques axillaires (Ciocca *et al.* 1993).

Au sein d'une population cellulaire tumorale, les cellules cancéreuses sont exposées à différentes situations de stress (par exemple une insuffisance de l'apport sanguin responsable d'une anoxie, des changements de pH cellulaires, etc...) qui peuvent entraîner une stimulation de la synthèse d'HSP telles que les HSP70. Il est ainsi possible que des tumeurs, exprimant des taux élevés d'HSP70, présentent une plus grande capacité de résistance vis-à-vis de conditions susceptibles d'induire des dommages cellulaires, ou bien une plus grande capacité de prolifération.

Une étude de Ciocca *et al.* (1993) a mis en évidence, au sein de tumeurs du sein, la présence de taux élevés d'HSP70 qui semblent refléter les différents stress biologiques subis par les cellules. Ainsi, cette étude met en avant la possibilité d'une utilisation d'HSP70 en tant que facteur pronostique, vis-à-vis de ces tumeurs.

Il a été démontré que des patientes, dont les tumeurs présentaient des taux d'expression d'HSP70 élevés, avaient une survie sans maladie, ou DFS pour «Disease-Free Survival», significativement plus courte. Cependant, une interprétation de ces taux d'expression d'HSP70, en relation avec la survie générale des patientes, présente, quant à elle, certaines limites. En effet, avec un suivi des patientes à long terme, les causes de décès peuvent être tout à fait variées, et ces décès pourront être, malgré tout, attribués de manière erronée au cancer d'origine. Il est également possible qu'en cas de récurrence de la maladie, l'expression d'HSP70 ne soit plus significativement représentative du comportement futur de la tumeur.

Enfin, pour des patientes ayant reçu une thérapeutique adjuvante, HSP70 est le seul facteur indépendant de prédiction de la récurrence de la maladie.

Ainsi, la mesure de l'expression d'HSP70, au sein de tumeurs primaires issues de patientes porteuses d'un cancer du sein sans ganglions, pourrait être utile à l'identification de patientes à haut risque de récurrence, et donc affecter le choix d'un traitement après intervention chirurgicale.

IV.2 L'HSP27 comme facteur pronostique

IV.2.1 HSP27 et cancer du sein

* Bien qu'HSP27 soit une protéine largement distribuée au sein de l'organisme, son taux basal dans la plupart des tissus humains (dont le tissu mammaire normal) est faible, par rapport aux taux élevés présents dans de nombreux cancers du sein, ou au niveau de cellules tumorales d'ascite Ehrlich (EAT).

Au sein de ces cellules EAT, l'expression d'HSP27 dépend de la phase de croissance de la tumeur : les cellules en pleine croissance exponentielle renferment de faibles taux d'HSP27, tandis que les cellules en phase stationnaire possèdent des quantités augmentées de la protéine (Benndorf *et al.* 1997). De plus, à l'inverse de l'expression des HSP de haut poids moléculaire (telles qu'HSP70), qui est positivement corrélée à la prolifération cellulaire, l'expression de la petite protéine HSP27 est fonctionnellement impliquée dans l'inhibition de la croissance des cellules EAT (Knauf *et al.* 1992).

* L'un des intérêts de cette HSP27 réside dans son implication vis-à-vis de l'action oestrogénique. En effet, au sein de différentes lignées cellulaires sensibles aux oestrogènes et

de cancers primaires du sein, la protéine est qualitativement et quantitativement rattachée à ces marqueurs pronostiques que sont les récepteurs oestrogéniques. HSP27 est impliquée dans l'action oestrogénique en tant que protéine régulée par les oestrogènes, et comme une protéine capable d'interagir avec des formes spécifiques de récepteurs oestrogéniques (formes activées mais non natives). La régulation de l'expression d'HSP27 par les oestrogènes s'effectue à la fois au niveau de la protéine et de son ARNm. Elle permet, au sein de cellules stimulées par les oestrogènes, l'obtention de taux d'HSP27 approximativement doublés.

Comme les récepteurs oestrogéniques, HSP27 est prédictrice de la sensibilité hormonale de certains cancers du sein avancés : il a été démontré que des patientes, porteuses de cancers du sein qui coexpriment récepteurs oestrogéniques et HSP27, présentaient une meilleure réponse clinique à la thérapie hormonale que les patientes n'exprimant que les récepteurs oestrogéniques (Love *et al.* 1994 ; Benndorf *et al.* 1997).

Cependant, il a également été rapporté que des taux élevés d'HSP27 étaient annonciateurs d'une récurrence précoce pour le cancer du sein (Thor *et al.* 1991), ce qui est en contradiction avec la notion de corrélation positive entre HSP27 et récepteurs oestrogéniques, dont les taux élevés sont plutôt le signe d'une longue survie sans maladie.

Une étude de Love *et al.* (1994) a permis de comparer les valeurs pronostiques des récepteurs oestrogéniques et d'HSP27. La présence de récepteurs oestrogéniques s'est ainsi révélée synonyme d'évolution favorable pour les deux paramètres étudiés : la survie sans maladie (DFS) et la survie après la première rechute (SR). L'expression d'HSP27 s'est, quant à elle, plutôt présentée comme annonciatrice d'une courte DFS avec, malgré tout, une SR prolongée. Les raisons de ces influences divergentes d'HSP27 sur la DFS et la SR demeurent encore actuellement inconnues. La corrélation observée entre des taux élevés d'HSP27 et une longue SR illustre parfaitement la participation de la protéine à l'activité des récepteurs oestrogéniques, et la capacité de ces facteurs de prédire de la réponse hormonale des cancers du sein avancés. En effet, des femmes, dont le cancer du sein répond à un traitement hormonal, présentent une survie après la première rechute qui est bien plus longue que celle de femmes dont la tumeur est non répondante. A l'inverse, la mise en évidence d'une corrélation entre des taux élevés d'HSP27 et une DFS courte a plutôt tendance à se rapprocher des observations effectuées par Thor *et al.*, à propos de la relation entre HSP27 et risque élevé de récurrence précoce d'un cancer du sein.

L'analyse de l'influence des différents phénotypes HSP27 et récepteurs oestrogéniques (RE), sur la DFS, a mis en évidence des différences significatives, en fonction du phénotype considéré. Ainsi, des tumeurs de phénotype RE⁺ HSP27⁺ présentent un risque de rechute précoce significativement plus élevé que celui des tumeurs RE⁺ HSP27⁻, ce qui suggère l'existence d'une corrélation positive entre HSP27 et prolifération tumorale. Enfin, la raison pour laquelle cette corrélation s'est révélée restreinte à un groupe de patientes dépourvues de ganglions demeure encore inexplicée.

Ces données, qui permettent d'établir un lien entre HSP27, la croissance tumorale et la sensibilité hormonale, présentent un certain intérêt biologique ; mais, plus que ça, l'identification de groupes de bon ou de mauvais pronostic, parmi des patientes porteuses d'une tumeur RE⁺ et notamment parmi celles dépourvues de ganglions, présente des répercussions cliniques non négligeables. En effet, la possibilité d'une identification, dès les toutes premières étapes de la maladie, des patientes à haut ou à faible risque représente une

avancée de première importance, et notamment en ce qui concerne le choix du nombre et de la nature des traitements adjuvants.

Etant donné l'abondance des HSP27 et le fait qu'elles puissent être détectées et dosées de manière simple et peu onéreuse, leur utilisation en tant que facteurs pronostiques, pour des cancers du sein sans ganglions, peut être envisagée. Dans des cas de cancers du sein avancés, des taux élevés d'HSP27 sont révélateurs d'une longue survie, probablement du fait de l'existence d'un lien avec la réponse hormonale oestrogènes dépendante. Actuellement, des dosages des récepteurs oestrogéniques sont utilisés pour prédire ce caractère (une longue survie). Un dosage des HSP27 permettrait-il d'atteindre le même objectif? Enfin, étant donné l'abondance d'HSP27, l'absence d'influence de l'âge et des régimes traitants sur les quantités de la protéine, et la simplicité de réalisation des mesures, les dosages d'HSP27 présentent certains avantages par rapport à ceux des récepteurs oestrogéniques. Ainsi, lorsque les valeurs des récepteurs oestrogéniques et des récepteurs à la progestérone ne sont pas disponibles, une évaluation d'HSP27 pourrait constituer une méthode efficace, pour l'obtention d'une information clinique équivalente.

IV.2.2 HSP27 et leucémie lymphoblastique aiguë (Strahler *et al.* 1990).

En ce qui concerne la leucémie lymphoblastique aiguë ou LLA, les caractères cliniques et l'issue du traitement varient énormément en fonction des sous-types immunologiques. Une meilleure appréciation de l'étendue et de la nature des différences observées entre les sous-types pourrait aider à l'établissement d'une base moléculaire, à l'origine de cette variabilité clinique observée au sein de la LLA.

La plupart des marqueurs cellulaires de différenciation, qui s'expriment au sein des leucémies, sont des antigènes de surface. Cependant, une analyse des constituants polypeptidiques de populations cellulaires lymphoïdes a mis en évidence la présence d'un certain nombre de polypeptides de différenciation au sein du cytoplasme des cellules.

Dans une de leurs études, Strahler *et al.* (1990) se sont intéressés à deux de ces polypeptides, désignés par les sigles L2 et L4. Leur association privilégiée avec l'un des sous-types de LLA, caractérisé par l'expression de l'antigène CALLA pour «Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen», et leur engagement dans le processus de différenciation des populations de cellules B ont été mis en évidence au cours de cette étude. Ces deux polypeptides sont apparentés sur un plan structural et représentent de nouveaux marqueurs pour la LLA commune. Il s'agit de deux isoformes d'HSP27, non exprimés de manière constitutive, et qui ne diffèrent que par leur degré de phosphorylation : L4 est le produit primaire, non phosphorylé, issu de la traduction de l'ARNm HSP27, L2 est une forme phosphorylée de L4.

L'identification d'HSP27 comme marqueur de la LLA commune présente un nouvel aperçu du programme de différenciation des cellules lymphoïdes, et apporte de nouvelles précisions concernant les implications physiologiques des protéines du choc thermique. Ces nouvelles données suggèrent l'existence d'un modèle de régulation d'HSP27, indépendant de la réponse au choc thermique, et qui fait partie de la voie de différenciation des cellules B.

IV.2.3 HSP27 et histiocytome fibreux malin (Têtu *et al.* 1992).

L'histiocytome fibreux malin est une forme de sarcome, qui se caractérise par sa très grande agressivité. Après que la tumeur ait disséminé, la chimiothérapie n'a que peu d'influence sur

l'évolution de la maladie, du fait du développement d'une résistance à la plupart des traitements chimiothérapeutiques.

L'identification de sous-groupes moins agressifs de la tumeur est une opération délicate, de par l'existence d'un nombre limité de facteurs pronostiques. La phase, la localisation, la taille de la tumeur, les sous-types histologiques et l'étendue de la nécrose tumorale, sont considérés comme les facteurs pronostiques les plus significatifs.

Têtu *et al.* (1992) ont démontré qu'une expression d'HSP27, au sein de la tumeur, était associée à un pronostic beaucoup plus favorable. Une corrélation positive et significative a pu être observée entre les taux d'HSP27 et les paramètres de «survie générale» et de «survie sans métastases». Ainsi, l'expression d'HSP27 se présente comme un facteur pronostique des plus intéressants, et d'autant plus qu'elle est indépendante des autres facteurs pronostiques.

Ile PARTIE

EXPRESSION DES HSP ET THERAPIE ANTICANCEREUSE

I – Hyperthermie cytotoxique et HSP

* L'utilisation de l'hyperthermie comme thérapeutique anticancéreuse consiste en une exposition des tissus cancéreux à une température cytotoxique, dans le but d'éradiquer les cellules malignes et de permettre un meilleur contrôle de la maladie (Benndorf *et al.* 1997).

* Une température élevée est capable de provoquer la mort de cellules, d'une manière dépendante de sa valeur absolue et de la durée d'exposition. Ainsi, le taux de mort cellulaire au sein de cellules humaines augmente de façon exponentielle, en fonction de la durée d'exposition à des températures données et situées au dessus de 42 °C.

Le phénomène de mort cellulaire se produit par l'intermédiaire de deux mécanismes distincts, qui dépendent de la sévérité du traitement. Une hyperthermie modérée, telle qu'une exposition de 1 heure à 43°C, favorise la survenue de la mort cellulaire par le mécanisme d'apoptose. Une augmentation de la température, de la durée d'exposition ou des deux conduit à l'obtention d'une mort cellulaire par nécrose.

L'effet cytotoxique de l'hyperthermie résulte d'un ensemble complexe de perturbations, touchant les fonctions vitales de la cellule. Un mécanisme connu, par lequel une température élevée est susceptible de provoquer le phénomène de mort cellulaire, consiste en une induction du catabolisme des polyamines. En effet, un choc thermique est capable de favoriser la synthèse de diverses enzymes, dont certaines sont responsables de ce catabolisme. Parmi les sous-produits de ces réactions, on observe la formation d'espèces réactives de l'oxygène, telles que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, qui pourrait, au moins en partie, expliquer le caractère cytotoxique du catabolisme des polyamines. D'autres produits de ce catabolisme, tels que l'ammoniac, pourraient également contribuer à la cytotoxicité observée.

Enfin, les cellules tumorales pourraient se révéler plus sensibles à une exposition thermique que les cellules normales, non pas, comme on a pu le croire dans un premier temps, du fait de leur caractère transformé, mais plutôt de part la nature de leur environnement physique, souvent déficient en nutriments, hypoxique et de bas pH (Benndorf *et al.* 1997 ; Fuller *et al.* 1994).

* Il est possible que l'efficacité d'une hyperthermie anticancéreuse ne repose pas uniquement sur un mécanisme de destruction des cellules tumorales par la chaleur, mais également sur l'induction d'une réponse immunitaire. Multhoff *et al.* (1998) ont démontré qu'un choc thermique non léthal était capable d'induire une augmentation de l'expression de surface d'HSP70, au sein de lignées cellulaires de type sarcomateuses et lymphomateuses, et qu'une quantité élevée d'HSP70 au niveau de la membrane plasmique était corrélée à une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales à la lyse induite par les lymphocytes T et les cellules NK. A l'inverse, des cellules, issues d'individus en bonne santé (qu'elles soient de type fibroblastes, lymphocytes du sang périphérique ou monocytes), n'ont présenté aucune expression de surface d'HSP70, quelle que soit la température à laquelle elles étaient exposées. Ainsi, il est possible qu'une hyperthermie, utilisée à des fins thérapeutiques, puisse potentialiser les effets cytotoxiques des cellules T et NK, en augmentant l'expression d'HSP à la surface des cellules tumorales.

* L'hyperthermie n'est actuellement plus recommandée en tant qu'unique modalité thérapeutique. Par contre, une association entre les techniques d'hyperthermie, d'irradiation, et l'utilisation de molécules anticancéreuses (telles que le cis-platine, les nitroso-urées, les

anthracyclines, les antimétabolites, les interférons, le facteur de nécrose tumoral et d'autres), présente un caractère hautement bénéfique en matière de thérapeutique anticancéreuse. En effet, depuis plusieurs années, de nombreuses études ont pu mettre en évidence une diminution ou une stabilisation de la croissance tumorale, notamment dans le cas de tumeurs superficielles, à la suite d'une utilisation combinée de l'hyperthermie avec des radiations et/ou une chimiothérapie, chez des patients porteurs de cancers même à un stade avancé (Benndorf *et al.* 1997 ; Fuller *et al.* 1994).

II – Les HSP peuvent être utilisées dans le traitement en cancérologie

II.1 Vaccination–thérapie génique

Lors du développement d'un cancer chez un individu, une période importante de coexistence entre l'hôte et la tumeur précède habituellement le diagnostic et le traitement ; cependant, ses conséquences sur le système immunitaire n'ont pas encore été totalement élucidées. D'une part, la persistance et la progression de la tumeur indiquent que le système immunitaire est incapable de contrôler la malignité. D'autre part, l'identification d'antigènes tumoraux spécifiques et l'isolement, à partir du sang périphérique du patient, de lymphocytes CTL réactifs à ces antigènes ont permis de démontrer qu'une réponse antitumorale limitée se développait au sein de l'organisme hôte. L'idée que le système immunitaire de l'hôte devait être mobilisé pour détruire une tumeur a fait l'objet de mises en application par administration d'immunogènes, à type de cellules tumorales génétiquement modifiées. Le principal objectif de telles manipulations génétiques est de convertir une tumeur faiblement immunogène, ne pouvant induire qu'une réponse immunitaire mineure, en une tumeur hautement immunogène, capable de provoquer son propre rejet (Schweighoffer 1996 ; Lukacs *et al.* 1996).

II.1.1 L'utilisation de cellules tumorales exprimant un antigène «de rappel», de type HSP65 mycobactérien, comme cible pour le système immunitaire chez la souris, constitue une première illustration des possibilités de stimulation d'une réponse immunitaire antitumorale (Schweighoffer 1996).

Des cellules tumorales sont transfectées pour exprimer un antigène «de rappel» spécifique, qui est facilement reconnu par une réponse immunitaire mémoire, préexistante chez l'hôte. Cette réponse permettrait non seulement la destruction de l'immunogène, mais également l'induction d'une reconnaissance efficace et d'une présentation augmentée d'autres antigènes présents au sein des cellules tumorales modifiées, tels que les antigènes tumoraux. Elle pourrait donc, au bout du compte, favoriser le développement d'une immunité antitumorale spécifique.

Cette approche antigénique particulière, dite «de rappel», a été développée sur la base d'une immunité anti-mycobactérienne particulière : l'immunité anti-*Mycobacterium bovis* ou BCG. Une immunisation avec le *Mycobacterium bovis* favorise l'obtention d'une immunité lymphocytes T dépendante stable et de longue durée, à la fois chez la souris et chez les humains. Parmi les nombreuses protéines impliquées en tant que cibles antigéniques dans la réponse anti-mycobactérienne, l'HSP65 fait partie des plus communément reconnues par les cellules T de la réponse immunitaire. Pour exprimer un tel antigène au sein de cellules eucaryotes, une protéine hybride, appelée «heat 1» et comportant la portion potentiellement antigénique d'HSP65 BCG, a été créée, puis utilisée comme antigène «de rappel». Pour ce faire, le vecteur ADN codant pour la protéine a été transfecté à l'intérieur de cellules M-3 de

mélanome de souris, dans le but de générer une sorte de vaccin anticancéreux. Au sein d'une souris pré-immunisée avec le BCG en entier, ou avec la seule protéine recombinante purifiée, l'administration de ce «vaccin» a permis l'induction d'une immunité, capable de faire face à un apport de cellules M-3 de type sauvage.

Ainsi, une réponse initialement dirigée contre un antigène étranger, introduit au sein d'un organisme, est capable d'évoluer en une réponse spécifique, dirigée contre les antigènes tumoraux, et permettant un rejet de la tumeur parentale. Ceci suggère qu'une fois qu'un épitope antigénique particulier a été reconnu, des épitopes voisins peuvent être, à leur tour, orientés vers une reconnaissance par les cellules T, et avec une efficacité nettement augmentée. Ces épitopes voisins peuvent correspondre non seulement à des épitopes du même antigène, mais également à des épitopes d'autres antigènes issus de la même cellule tumorale, tels que des antigènes tumoraux, qui doivent être préalablement reconnus puis présentés par une cellule de type APC aux lymphocytes T. Ceci démontre qu'une réponse immunitaire existante peut être réorientée dans le but de contrôler une croissance tumorale.

Enfin, avec une population mondiale majoritairement vaccinée contre des pathogènes divers et variés, il est possible d'envisager qu'une stratégie de ce type, somme toute assez générale, puisse trouver matière à application au sein de la thérapeutique humaine.

II.1.2 Des cellules tumorales, transfectées avec le gène HSP65 mycobactérien, perdent leur tumorigénicité et induisent le développement d'une immunité dirigée contre les cellules tumorales d'origine.

a) Illustration d'une transfection réalisée *in vitro* (Lukacs *et al.* 1996).

Une lignée de cellules J 774 de type macrophages a été transfectée avec le gène mycobactérien *HSP65*. La lignée J 774 est constituée de cellules tumorales faiblement immunogènes, issues de souris BALB/c.

Des souris, ayant reçu une injection intra-péritonéale de cellules J 774 non transfectées, ont développé d'importantes tumeurs de type néoplasmes lymphoréticulaires hautement malins et comportant de nombreuses métastases. A l'inverse, des souris ayant reçu une injection de cellules J 774, transfectées *in vitro* avec le gène *HSP65*, n'ont présenté aucune formation de tumeur. Les cellules J 774 transfectées présentent une perte de leur tumorigénicité, qui pourrait être due à une interaction de la protéine HSP65 avec des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs ou leurs produits protéiques. L'expression de la protéine p53 suppressive de tumeur a ainsi été évaluée au sein de cellules tumorales transfectées et de contrôle. La mise en évidence de taux augmentés de la protéine chez les cellules transfectées laisse envisager la possibilité d'une action, même partielle, d'HSP65, au niveau de cette protéine. Ainsi, l'hypothèse suivante a été proposée : une augmentation de l'activité de type chaperon, au sein des cellules transfectées, pourrait favoriser un repliement correct de la p53 mutée inactive, en une p53 sauvage de conformation «normale», corrigeant ainsi la perte de la fonction suppressive de tumeur.

De plus, des souris, immunisées par des injections intra-péritonéales de cellules J 774 transfectées, se sont révélées totalement protégées vis-à-vis d'une mise en contact avec des cellules J 774 non transfectées, et n'ont donc pas développé de tumeur.

Ces résultats indiquent que l'expression de la protéine HSP65 augmente considérablement la reconnaissance immunitaire des cellules transfectées et que des souris, immunisées par

l'injection de ces cellules, sont capables de développer une réponse cytotoxique dirigée contre les cellules tumorales d'origine.

b) Illustration d'une transfection réalisée *in vivo*

Lukacs *et al.* (1996) ont démontré que des cellules tumorales, exprimant un gène *HSP* mycobactérien à la suite d'un transfert de gène réalisé *in vitro*, perdaient leur capacité à former des tumeurs, et induisaient le développement d'une réponse immunitaire antitumorale préventive. Dans une autre étude (Lukacs *et al.* 1997), ils ont mis en relief l'efficacité d'un transfert *in vivo* du gène *HSP65*, dans le traitement de tumeurs existantes.

Des souris BALB/c immunocompétentes et des souris SCID, déficientes en cellules T, ont fait l'objet d'une injection intra-péritonéale de cellules J 774. Quatre jours plus tard, des complexes ADN *HSP65*/liposomes ont, à leur tour, été injectés dans la cavité péritonéale de ces souris, et le traitement a été répété deux fois par semaine pendant deux semaines. La progression tumorale chez les souris traitées a alors été comparée à celle de souris non traitées et à celle de souris contrôles, traitées avec un vecteur ADN nul/liposome. Les résultats obtenus ont révélé que la thérapie génique à l'aide des complexes ADN *HSP65*/liposome permettait une réduction hautement significative de la taille de la tumeur, chez les animaux immunocompétents ; à la suite de la thérapie génique, des tumeurs palpables n'ont été détectées que chez trois des vingt souris BALB/c immunocompétentes traitées. Les souris SCID, ayant reçu les complexes ADN *HSP65*/liposome, ont également développé des tumeurs plus petites que celles des souris non traitées et des souris contrôles, mais chez 80 % d'entre elles, des tumeurs palpables ont pu être détectées.

Pour évaluer les effets d'un transfert de gène *HSP65* sur des tumeurs avancées, des expérimentations semblables ont été menées sur des souris BALB/c, deux semaines après l'implantation de la tumeur. Les résultats obtenus ont mis en évidence une rapide régression des tumeurs, chez les souris traitées avec les complexes ADN *HSP65*/liposome, suggérant que le transfert de gène *HSP65* pouvait être un traitement tout à fait efficace des cancers évolués, chez la souris immunocompétente.

Les injections intra-péritonéales du gène *HSP65* complexé à des liposomes, chez des souris porteuses d'une tumeur, se sont également révélées capables d'induire la production d'anticorps spécifiques. Ces nouveaux résultats confirment le développement d'une reconnaissance accrue de certaines structures spécifiques de la tumeur, à la suite du transfert de gène *HSP65*.

Ces différentes expériences mettent en évidence la capacité de régression que présentent certaines tumeurs à type de sarcomes, à la suite d'une thérapie génique utilisant le gène *HSP65* mycobactérien, et s'effectuant *in vivo*. Cependant, un rejet complet de la tumeur n'a pu être obtenu qu'au sein des souris BALB/c possédant une immunité cellules T dépendante intacte. Le fait qu'une réduction de taille de la tumeur ait pu être observée chez les souris SCID traitées laisse entrevoir la possibilité d'une intervention de mécanismes immunitaires indépendants des cellules T, tels que des cellules NK, des macrophages, ou des changements dans la régulation du cycle cellulaire.

c) L'expression du gène *HSP65* transfecté pourrait induire le développement d'une réponse immunitaire par différents mécanismes (Lukacs *et al.* 1997).

Bien que les HSP soient des protéines hautement conservées, certaines de leurs séquences sont spécifiques à chaque espèce et peuvent être reconnues comme épitopes étrangers par le système immunitaire. L'HSP65 mycobactérienne est ainsi capable d'induire le développement de réponses immunitaires cellulaires et humorales efficaces.

D'autre part, des «vaccins» peptidiques, renfermant des HSP mycobactériennes complexées à de petits épitopes antigéniques, présentent une réelle capacité d'induction de réponses immunitaires puissantes, spécifiquement dirigées contre les peptides antigéniques. Ainsi, plutôt que de se comporter elle-même comme un antigène tumoral, HSP65 pourrait, grâce à son caractère hautement immunogène, favoriser une meilleure reconnaissance de certains antigènes tumoraux, avec lesquels elle est capable de s'associer. De plus, des cellules J 774, transfectées avec le gène *HSP65* mycobactérien, se sont montrées bien plus performantes comme cellules présentatrices de l'antigène, que des cellules non transfectées ou des cellules transfectées avec le vecteur ADN nul/liposome. Ceci suggère qu'une meilleure présentation des antigènes tumoraux pourrait jouer un rôle dans l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale.

Enfin, les protéines du choc thermique sont des chaperons moléculaires impliqués dans le transport et le repliement des antigènes protéiques, lors du phénomène de processing. Ainsi, l'activité de type chaperon, qui est augmentée au sein des cellules transfectées avec le gène *HSP65*, pourrait favoriser un processing et une présentation plus efficaces de l'antigène tumoral, et donc une augmentation de l'immunogénicité des cellules.

II.1.3 Applications possibles du transfert de gène HSP65 dans le traitement de tumeurs

Les résultats obtenus avec les cellules J 774 montrent que la transfection de cellules tumorales avec le gène *HSP65* bactérien peut abolir leur capacité à former des tumeurs, et favorise l'induction d'une immunité dirigée contre les cellules tumorales d'origine. Si cette nouvelle approche thérapeutique peut s'appliquer à la réduction de la tumorigénicité et à l'augmentation de l'immunogénicité d'autres cellules, il est possible d'envisager une utilisation plus générale de la thérapie génique impliquant le gène *HSP65*, dans le traitement de différents types de tumeurs (voir figure 32).

- Pour une application *in vitro*, les cellules tumorales, obtenues à partir de biopsies, devront être transfectées *in vitro* avec le gène *HSP*, puis réinjectées à l'intérieur de l'organisme hôte. Des cellules T cytotoxiques, stimulées par les cellules tumorales exprimant l'HSP, pourront alors reconnaître et lyser les cellules tumorales d'origine (figure 32, A).

- Pour une application *in vivo*, le plasmide ADN codant pour la protéine HSP65 pourra être directement injectée dans la tumeur et avoir un double effet : d'une part, les cellules tumorales, qui expriment *in vivo* le gène, perdent leur tumorigénicité potentielle, d'autre part, la génération de lymphocytes T cytotoxiques, capables de lyser à la fois les cellules tumorales transfectées et non transfectées, permet une élimination de la tumeur.

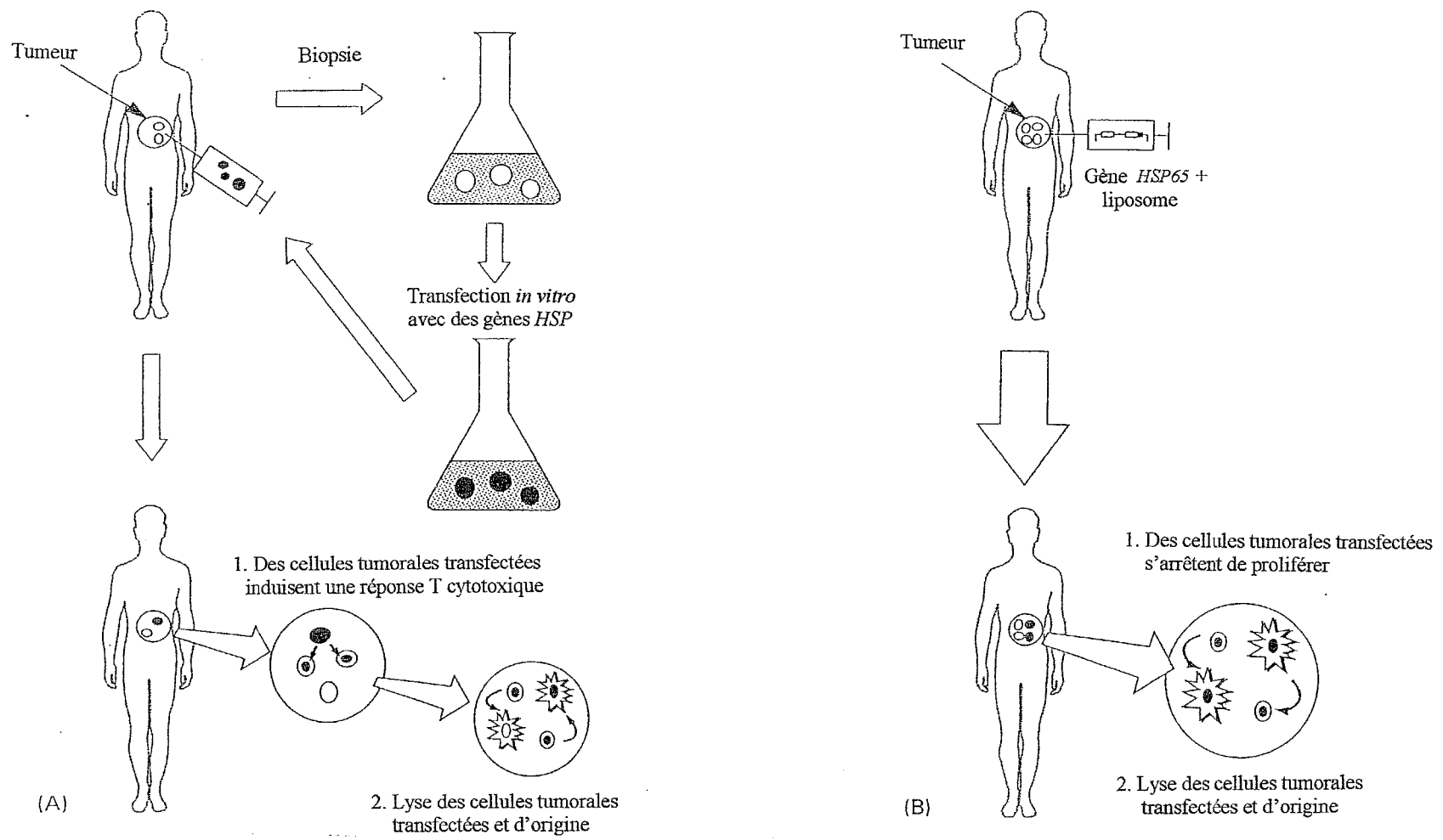


Figure 32 : Perspective thérapeutique utilisant le gène *HSP65* (Lukacs *et al.* 1997)

II.2 Des complexes HSP/peptides antigéniques tumoraux offrent une nouvelle approche de l'immunothérapie antitumorale (Srivastava 1996 ; Srivastava 1994).

* L'une des principales difficultés de l'immunothérapie anticancéreuse réside dans la possibilité qu'ont les cancers humains d'exprimer des caractères antigéniques distincts, à l'image des cancers expérimentaux induits chez les animaux. La nécessité d'une identification des antigènes immunogènes de chaque tumeur individuelle constitue un obstacle majeur à une utilisation simple et efficace de l'immunothérapie dans le traitement des cancers. De ce fait, la capacité qu'ont les HSP de chaperonner le répertoire entier des peptides antigéniques des cellules, au sein desquelles elles sont synthétisées, présente un intérêt pratique non négligeable. Ainsi, des patients peuvent être «vaccinés» avec des préparations de complexes HSP/peptide, issues de leur propre tumeur ou de lignées cellulaires dérivées de leur propre tumeur, sans nécessiter l'identification des épitopes antigéniques de la tumeur en question.

* Cependant, l'hypothèse que les tumeurs humaines, comme leurs homologues de souris, sont distinctes sur un plan antigénique est actuellement en cours de reconsidération. En effet, la mise en évidence que les épitopes des lymphocytes CTL d'un certain nombre de mélanomes humains étaient des antigènes de différenciation non mutés et communs à ces différents mélanomes a permis d'envisager la possibilité d'une réactivité croisée entre les antigènes tumoraux.

Considérant que les tumeurs humaines pouvaient être interactives sur le plan antigénique, il a été proposé que des vaccins, dirigés contre un mélanome, pouvaient être élaborés sur la simple base des épitopes peptidiques des antigènes tumoraux précisément identifiés et de réactivité croisée, plutôt qu'à partir de complexes HSP/peptide isolés de mélanomes individuels, et représentant l'ensemble du répertoire antigénique. Cependant, cette alternative n'a pu être retenue pour différentes raisons :

1) La notion de réactivité antigénique croisée parmi les mélanomes humains suggère qu'une fois qu'un certain nombre d'antigènes communs a été identifié, les patients peuvent être immunisés avec des peptides synthétiques correspondant aux épitopes de ces antigènes et que ces patients sont capables de développer une réponse CTL CD8⁺ dépendante. En fait, une vaccination avec des peptides nécessite le respect de certaines conditions expérimentales, telles que l'utilisation d'un adjuvant de Freund incomplet et de grandes quantités de peptides ($\approx 100 \mu\text{g}$ de peptide pour 20 g de souris), ceci étant totalement incompatible avec une application en thérapeutique humaine. D'autres tentatives, telles que l'ajout d'une queue lipophile aux chaînes peptidiques, ont été réalisées, mais la vaccination à l'aide de complexes reconstitués entre des HSP humaines et des peptides antigéniques reste la méthode la plus économique et la plus simple sur un plan technologique. D'ailleurs, il a récemment été démontré que des complexes HSP/peptide, administrés en solution saline et sans adjuvant, étaient capables de générer des lymphocytes CTL CD8⁺ natifs, *in vivo*.

2) D'autre part, pour un antigène donné, une vaccination avec un peptide donné n'est efficace que pour des patients porteurs d'un caractère HLA donné. Une simple vaccination nécessite donc, pour un épitope antigénique donné, l'apport du peptide en de multiples exemplaires pouvant être reconnus par des allèles HLA distincts, de manière à ce que l'organisme receveur puisse réagir à au moins l'un d'entre eux. Une alternative plus efficace et plus simple consiste en un isolement de complexes HSP/peptide, à partir de lignées cellulaires humaines transfectées avec le gène recherché. Les complexes HSP/peptide, purifiés à partir de ces transfectants, correspondent alors au répertoire complet des peptides antigéniques dérivés de

la protéine particulière. Comme l'interaction HSP/peptide est proche de celle survenant entre la molécule HLA et le peptide, lors du processing de l'antigène, les peptides fixés aux HSP ne font l'objet d'aucune restriction HLA. Ainsi, des peptides capables d'être reconnus par tous les allèles HLA possibles, sont représentés parmi les complexes HSP/peptide.

3) Enfin, la méthodologie utilisée pour l'identification des épitopes CTL des cancers humains semble favoriser une sélection biaisée de ces épitopes, qui pourraient alors constituer un échantillon non représentatif du répertoire antigénique des cancers humains. En effet, la génération de lignées cellulaires est une démarche essentielle à l'isolement des lymphocytes CTL, et seule une très petite proportion de cancers humains s'y prête. De plus, parmi les tumeurs à partir desquelles les lignées cellulaires ont pu être développées, seule une petite proportion permet la génération de CTL.

* Ainsi, l'immunogénicité d'un cancer représente la somme totale des immunogénicités d'un grand nombre d'épitopes. Un vaccin anticancéreux, pour être efficace, doit donc posséder cette multiplicité antigénique. Les complexes HSP/peptide font partie de cette catégorie de vaccins multivalents et renfermant de multiples composants. Si les antigènes tumoraux sont représentés par des molécules communes à différents cancers, l'utilisation de complexes HSP/peptide isolés à partir de tumeurs n'en devient que plus simple, puisque ces complexes n'ont alors plus besoin d'être isolés de cancers individuels de patients. En fait, ils pourraient être purifiés à partir d'un mélange de mélanomes humains et utilisés dans le but de vacciner contre des mélanomes allogéniques. L'absence de restriction HLA pour les peptides fixés aux HSP est un avantage clé de l'utilisation des complexes HSP/peptide. Enfin, l'utilisation d'un vaccin renfermant un grand nombre de composants est nécessaire à l'obtention d'une protection vis-à-vis d'un éventuel échappement antigénique, ou vis à vis d'une hétérogénéité antigénique pouvant préexister au sein des cancers humains.

* Remarque : l'immunogénicité des tumeurs semble en fait résulter de l'existence d'un certain nombre d'immunogènes, appartenant à l'une des trois catégories suivantes :

- les antigènes «uniques» : ils sont générés par des mutations qui accompagnent la transformation tumorale, mais qui ne sont pas responsables de celle-ci ;
- les antigènes «communs» ou «partagés» : ce sont des antigènes de différenciation, non mutés, vis-à-vis desquels il semble habituellement exister une tolérance de l'organisme. Ainsi, les tumeurs pourraient être elles-mêmes responsables d'une modulation de cette tolérance, conduisant au développement d'une réponse immunitaire dirigée contre les antigènes de différenciation.
- des protéines oncogènes mutées ou exprimées de manière inappropriée, responsable de la transformation maligne.

III – Les HSP, présentes au sein des cellules tumorales, limitent la portée de certains traitement anticancéreux

Des cellules, exposées à un choc thermique non léthal, acquièrent une capacité de résistance vis à vis d'expositions ultérieures à des températures normalement létales. Cette propriété, appelée thermotolérance, possède de nombreuses implications dans le traitement des cellules tumorales par la technique de l'hyperthermie. Le phénomène de résistance croisée ou «Multi-

Drug Resistance» (MDR), par lequel des cellules, traitées avec une molécule de chimiothérapie, deviennent résistantes à cette molécule et à d'autres qui ne lui sont pas nécessairement apparentés, présente, dans son principe, une certaine homologie avec le phénomène de thermotolérance. En effet, ces phénomènes résultent, tout au moins en partie, de l'induction de certains membres de la famille des HSP, dans le but de protéger les cellules contre d'éventuelles agressions ultérieures. Enfin, la thermotolérance et la «multi-drug resistance» sont toutes deux induites par une exposition des cellules à une température élevée, et s'opposent aux effets thérapeutiques de l'hyperthermie.

III.1 Hyperthermie anticancéreuse et thermotolérance

* Sur un plan clinique, l'un des principaux obstacles à la thérapie hyperthermique anticancéreuse consiste en un développement d'une thermotolérance. Ce phénomène de thermotolérance apparaît lors d'une exposition prolongée à une température modérée, inférieure à une valeur critique, ou entre deux traitements hyperthermiques sévères. Il présente la particularité d'être diminué en présence d'un pH abaissé, d'être hautement dépendant du type de cellules ou de tissus et d'être lié à une augmentation des taux intracellulaires des protéines du choc thermique (Benndorf *et al.* 1997 ; Vernon 1992).

* Il existe de nombreux témoignages prouvant que la thermotolérance peut être induite au sein des tumeurs et qu'elle modifie leur réponse à un traitement hyperthermique fractionné. Cependant, peu d'informations sont actuellement disponibles concernant l'induction d'une synthèse HSP, à la suite d'une exposition des tumeurs *in vivo* à une température élevée.

Brustad *et al.* (1988) ont étudié le développement de la thermotolérance, au sein d'une variété de xenogreffes de mélanomes humains, exposées *in vitro* ou *in vivo* à une température élevée. Les réponses thermiques des cellules de mélanomes, traitées *in vitro* ou *in vivo*, ont présenté des différences significatives selon les lignées tumorales considérées, dérivées de patients différents. Au delà d'un point d'inflexion de $42,5 \pm 0,5$ °C, l'énergie d'activation nécessaire au développement d'une thermotolérance ne s'est pas montrée significativement différente pour les divers mélanomes exposés *in vitro* ou *in vivo*. Cependant, pour des températures inférieures au point d'inflexion, l'énergie d'activation s'est révélée plus élevée pour les tumeurs traitées *in vitro* que pour les autres, probablement du fait de l'existence, *in vivo*, de conditions physiologiques particulières, favorables au développement d'une thermotolérance. Mais, d'une façon générale, toutes les cellules de mélanomes ont développé une thermotolérance à la suite du traitement thermique initial. Cette thermotolérance a atteint sa valeur maximale au bout de 24 heures, et des différences d'amplitudes significatives ont alors été observées entre les différents mélanomes. Puis, elle a fait l'objet d'un déclin progressif, au sein de tous les mélanomes testés. Il est apparu que si les températures étaient maintenues au delà de 42,5 °C, pendant au moins 30 minutes, une disparition totale de la thermotolérance nécessitait une durée de plus de sept jours.

Rhee *et al.* (1987) ont, de leur côté, examiné les cinétiques de développement de la thermotolérance, au sein de cellules tumorales de carcinomes mammaires de souris. Ils ont comparé les cinétiques de cellules traitées *in vivo* et maintenues *in situ*, avec celles des mêmes cellules traitées et maintenues *in vitro*. Il a été observé que les cinétiques de développement d'une thermotolérance étaient différentes, selon qu'il s'agissait de cellules traitées *in vivo* ou *in vitro*. Le délai d'obtention d'une thermotolérance maximale était de 116 minutes pour les cellules tumorales exposées et maintenues *in vivo*, et de 170 minutes pour des cellules

exposées *in vivo* et conservées *in vitro*. Parallèlement, ce délai atteignait les 306 minutes pour les mêmes cellules exposées *in vitro* et maintenues *in vitro*. A nouveau, ces résultats indiquent que le développement d'une thermotolérance est influencé par divers facteurs environnementaux, au contact desquels les tumeurs sont maintenues *in vivo*.

* Etant donné que les HSP contribuent de manière substantielle à l'acquisition de la thermotolérance, des efforts semblent devoir être entrepris pour éviter une induction d'HSP en cours de thérapie hyperthermique, au sein des tumeurs.

L'un des moyens dont disposent les thérapeutes est de respecter des intervalles de 5 à 6 jours entre les traitements, pour permettre aux taux d'HSP de revenir à des valeurs normales. Ainsi, les protocoles thérapeutiques élaborés ne devraient pas proposer plus d'un traitement hyperthermique par semaine (Vernon 1992).

Une autre possibilité consiste en une intervention pharmacologique à l'aide d'inhibiteurs de la synthèse HSP, tels que la quercétine, dans le but de favoriser une inhibition de l'acquisition de la thermotolérance.

La quercétine est un bioflavonoïde largement représenté dans le domaine végétal, incluant de nombreuses variétés de fruits et de légumes. Koishi *et al.* (1992) ont décrit les effets de la quercétine sur l'induction d'une thermotolérance, au sein d'une lignée cellulaire issue d'un carcinome humain du colon. En l'absence de quercétine, les cellules sont devenues résistantes à un traitement thermique à 45 °C, après avoir été prétraitées à 42 °C pendant 1heure 30 minutes ou à 45 °C pendant 10 minutes. Un apport continu de 100µM de quercétine, lors des deux expositions thermiques et durant l'intervalle entre les deux, a permis une inhibition presque complète de l'induction de la thermotolérance. Cet effet inhibiteur de la quercétine s'est révélé dose dépendant, au sein d'une fourchette de concentrations comprise entre 50 et 200 µM. Enfin, la présence de quercétine lors de la première exposition thermique, dite «de conditionnement», s'est révélée beaucoup plus efficace à inhiber le développement d'une thermotolérance, que sa présence lors de la seconde exposition.

La quercétine est responsable d'une inhibition de la synthèse des HSP110, HSP90, HSP70 et HSP27, sans affecter celle des autres protéines cellulaires. Cette inhibition s'effectue au niveau de l'accumulation de l'ARNm : la quercétine s'oppose à la transcription de l'ADN en ARNm, en empêchant l'activation des facteurs HSF du choc thermique. Ainsi, la quercétine, en inhibant spécifiquement la synthèse de toutes les protéines du choc thermique précédemment citées, est responsable d'une inhibition de l'induction de la thermotolérance, qui pourrait améliorer l'efficacité de l'utilisation thérapeutique de l'hyperthermie fractionnée.

* HSP70 comme indicateur de thermotolérance (Li *et al.* 1995).

Une évaluation prédictive de la réponse tumorale aux traitements thermiques présente un certain intérêt en matière de thérapie hyperthermique anticancéreuse. D'une part, certaines expériences pourraient permettre de prédire l'issue du traitement, et favoriser une identification des patients susceptibles de tirer un bénéfice de l'utilisation de l'hyperthermie dans leurs protocoles thérapeutiques (= détermination de la sensibilité thermique intrinsèque). D'autre part, dans le cadre de traitements par hyperthermie, certaines mesures pourraient permettre aux cliniciens de surveiller le degré de thermotolérance et de déterminer les protocoles appropriés pour un traitement hyperthermique fractionné (= détermination du degré de thermotolérance). Enfin, certaines observations pourraient jouer un rôle indicateur

des dommages induits par la chaleur, et pourraient permettre d'envisager beaucoup plus rapidement la nécessité d'une alternative thérapeutique, lorsque l'exposition thermique se révèle inadéquate.

Parmi les nombreuses HSP synthétisées à la suite d'un choc thermique, HSP70 est la protéine dont la concentration semble être la plus étroitement corrélée au phénomène de résistance thermique, qu'il soit permanent ou transitoire, et à la survie cellulaire. Ceci suggère la possibilité d'une utilisation des taux d'HSP70, comme moyen de prédire la sensibilité thermique intrinsèque et/ou le degré de thermotolérance des tumeurs et des tissus, au cours d'un traitement hyperthermique fractionné.

Par ailleurs, des expérimentations ont été effectuées dans le but d'examiner la possibilité d'une utilisation du taux de synthèse d'HSP70, après un second choc thermique, comme approche alternative pour une quantification de la thermotolérance, au cours d'une exposition hyperthermique fractionnée. Ainsi, il a été démontré que la capacité des cellules à réinitier la synthèse d'HSP70, en réponse à un deuxième choc thermique, était inversement corrélée au degré de thermotolérance. Ceci suggère que les taux d'HSP70 au sein des cellules thermotolérantes régulent la synthèse d'HSP70 supplémentaires, en réponse à une nouvelle exposition thermique. Ces résultats démontrent que le taux de réinduction de la synthèse d'HSP70, après un choc thermique, peut être utilisé pour une évaluation rapide du degré de thermotolérance.

Enfin, une étude a été effectuée pour déterminer si HSP70 pouvait être utilisée comme moyen de prédire le degré de thermotolérance, dans le cas de tumeurs humaines (Marquez *et al.* 1993). Dans un premier temps, il a été démontré qu'il était possible de prélever des échantillons tissulaires, de manière simple et inoffensive, chez des patients bénéficiant d'un traitement hyperthermique fractionné, et que le taux de synthèse d'HSP70 pouvait donc être mesuré au sein de différents types de tumeurs humaines. Puis, la possibilité d'une évaluation de la thermotolérance par la mesure des taux d'HSP70, lors d'une utilisation de l'hyperthermie en thérapeutique humaine a en effet été suggérée. Cependant, dans ce cas, il semble qu'il ne faille pas négliger l'existence d'un microenvironnement intra-tumoral hétérogène, et le fait que les profils HSP puissent ne pas être homogènes, au sein de l'ensemble de la tumeur. Ainsi, de nouvelles méthodes devraient être envisagées pour maîtriser l'hétérogénéité de ce microenvironnement tumoral, en cas d'utilisation d'HSP70 comme facteur prédictif.

III.2 Notion de «multi-drug resistance» et de résistance vis-à-vis de certaines molécules de chimiothérapie anticancéreuse

* Depuis un certain temps déjà, des études ont permis de démontrer que des actifs anticancéreux étaient moins efficaces sur les cellules tumorales, lorsque celles-ci avaient été préalablement exposées à une hyperthermie.

Dans une de leurs études, Ciocca *et al.* (1992) se sont intéressés aux relations pouvant exister entre l'expression des protéines du choc thermique et la résistance vis-à-vis des molécules anticancéreuses. Ainsi, il a été démontré que des cellules tumorales, issues de cancer du sein et exprimant des taux élevés d'HSP27 et d'HSP70, étaient plus résistantes à un traitement par la doxorubicine. La présence d'isoformes phosphorylés d'HSP27 semblait également intervenir dans le phénomène de résistance.

Les mécanismes de l'acquisition d'une résistance à la doxorubicine, grâce aux HSP, demeurent incertains. Des résultats contradictoires ont été obtenus, concernant une éventuelle association entre le développement d'une résistance induite par les HSP, et une accumulation réduite des molécules cancéreuses au sein des différents types de cellules. La protéine HSP70 est impliquée dans la translocation protéique à travers les membranes des différents compartiments cellulaires et dans la stabilisation des protéines dépliées, tandis qu'HSP27 interagit avec les protéines microfilamenteuses, et inhibe la polymérisation de l'actine. Il est actuellement difficile d'établir un lien entre ces rôles et la résistance à la doxorubicine, et d'autant plus que cette molécule utilise plusieurs mécanismes pour endommager les cellules.

L'étude de Ciocca *et al.* a également permis de démontrer que des taux élevés d'HSP27 et d'HSP70 n'étaient pas associés à un phénomène typique de résistance multimoléculaire : le choc thermique ne confère aucune résistance croisée vis-à-vis d'autres agents anticancéreux, tels que la colchicine, le 5-fluorouracile, le cis-platine, l'actinomycine D ou le méthotrexate. Sur ce point, il peut être intéressant de remarquer que les résultats de Ciocca *et al.* diffèrent de ceux d'autres équipes, qui présentent notamment des cas de résistance de cellules, surexprimant la protéine HSP27, vis-à-vis du cis-platine ou de la colchicine (Bielka *et al.* 1994).

Enfin, le phénomène de résistance associé aux HSP pourrait revêtir un caractère permanent (en cas de surexpression due à des altérations génétiques) ou transitoire, il semble être spécifique de certaines molécules anticancéreuses, et pourrait être déclenché non seulement par un choc thermique, mais également par d'autres stress qui surviennent habituellement au sein des tumeurs humaines.

* Oesterreich *et al.* (1993) ont étudié le rôle de la protéine HSP27 dans la résistance à la doxorubicine. Pour cela, ils ont utilisé des lignées cellulaires issues de tumeurs mammaires, ayant été transfectées avec le gène *HSP27* dans une orientation correcte ou anti-sens, et présentant donc des taux d'expression différents d'HSP27. La transfection, dans une orientation correcte, du gène *HSP27*, au sein de cellules MDA-MB 231 présentant une faible expression endogène d'HSP27, a permis une augmentation de l'expression de la protéine, et une augmentation de la résistance à la doxorubicine. A l'inverse, des cellules MCF-7/MG, possédant une expression endogène élevée d'HSP27, ont présenté une augmentation de leur sensibilité à la doxorubicine, après transfection du gène *HSP27* dans une orientation anti-sens. Ceci confirme l'implication d'HSP27 dans le phénomène de résistance à la doxorubicine de cellules tumorales issues de cancers du sein, et suggère qu'une manipulation des taux d'HSP27, soit génétiquement, soit peut-être même pharmacologiquement, pourrait être utilisée dans le but d'inverser le phénomène de résistance à la doxorubicine, au sein de ces cellules.

* Plus récemment, Ciocca *et al.* (1998) ont étudié l'implication éventuelle des protéines du choc thermique HSP27 et HSP70 dans la résistance clinique au tamoxifène, chez des patientes présentant un cancer du sein.

HSP27 est une protéine régulée par les oestrogènes et présente, en ce sens, un intérêt particulier en matière de thérapeutique hormonale. C'est également le cas pour HSP70, du fait de son interaction avec les récepteurs oestrogéniques et de son rôle, en tant que chaperon moléculaire, dans l'assemblage et le transport des récepteurs stéroïdiens.

Le tamoxifène est utilisé pour traiter des patientes porteuses d'un cancer du sein précoce ou avancé. La sélection des patientes susceptibles de répondre à un traitement par le tamoxifène passe par une évaluation des quantités de récepteurs aux oestrogènes (RE) et de récepteurs à la progestérone (RP), au sein du tissu tumoral. Cependant, seuls 60 % des patientes porteuses d'une tumeur RE⁺ et 70 % des patientes présentant une tumeur RE⁺ et RP⁺ répondent à une thérapie par le tamoxifène. Ainsi, même chez des patientes dont les tissus tumoraux renferment des quantités non négligeables de récepteurs, la résistance au tamoxifène constitue un problème majeur.

L'étude de Ciocca *et al.* a finalement révélé qu'une expression augmentée des protéines HSP27 et HSP70 (nucléaires ou cytoplasmiques) n'était pas significativement associée à une résistance au tamoxifène, et qu'une détermination de ces protéines ne présentait aucune valeur clinique prédictive d'une réponse au tamoxifène.

* L'influence d'une expression HSP27 sur la réponse à une chimiothérapie a été évaluée par Têtu *et al.* (1992), chez des patients porteurs d'un histiocytome fibreux malin (HFM) et ayant développé des métastases. Les tumeurs des patients présentant un HFM disséminé et exprimant HSP27 ne se sont pas montrées plus résistantes à la chimiothérapie que les tumeurs n'exprimant pas la protéine. En fait, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre HSP27, la réponse immédiate de la tumeur à la chimiothérapie ou la survie suivant le début de la chimiothérapie.

* Un autre aspect du phénomène de résistance des cellules tumorales à certains traitements de chimiothérapie a été mise en évidence par Bielka *et al.* (1994) : certaines molécules cytostatiques, utilisées à des concentrations efficaces, sont capables d'induire une synthèse d'HSP27, au sein de cellules carcinomateuses d'ascite Ehrlich (EAC).

Un traitement des cellules EAC avec des concentrations efficaces de cis-platine, de daunomycine, de doxorubicine, de cytosine arabinoside, de 3'-fluorodéoxythymidine, de colchicine ou de vincristine permet, en effet, une augmentation significative des taux d'HSP27. Cependant, aucune induction de la protéine n'a pu être détectée, à la suite d'un traitement des cellules tumorales avec du 5-fluorouracile, de l'aminoptérine, de la mithramycine ou du cyclophosphamide. Aucune de ces molécules n'a permis une induction d'HSP70. Ainsi, la réponse des cellules EAC aux différentes molécules anticancéreuses diffère en ce qui concerne l'expression d'HSP27 et celle d'HSP70 : des molécules, capables d'induire une expression d'HSP27, se sont révélées incapables de stimuler celle d'HSP70.

Il a également été démontré que certaines molécules étaient capables d'induire HSP27, mais que d'autres en étaient incapables, et que la capacité de stimulation de l'expression d'HSP27 était liée aux mécanismes d'action biochimiques des molécules anticancéreuses. Ainsi, il s'avère que les molécules, capables de stimuler une synthèse d'HSP27, interfèrent soit directement avec certains processus de la réplication de l'ADN, lors de la phase S du cycle cellulaire (cis-platine, doxorubicine, daunomycine, cytosine arabinoside, 3'-fluorodéoxythymidine), soit avec le système des microtubules, autorisant ainsi un arrêt des cellules en phase M (colchicine, vincristine). De leur côté, les molécules non inductrices d'une synthèse d'HSP27 agissent préférentiellement en interférant avec le métabolisme des nucléotides, lors de la phase G1 du cycle cellulaire (5-fluorouracile, aminoptérine, améthoptérine).

Au final, il apparaît donc que l'induction de la petite protéine HSP27, par des molécules anticancéreuses cytostatiques, fait partie du mécanisme responsable du développement de la résistance des cellules, vis à vis de ces molécules anticancéreuses.

CONCLUSION

Deux fonctions principales sont attribuées aux HSP : celle de chaperons moléculaires (plus étudiée pour HSP70 mais également présente chez HSP27) et celle de dégradation protéique (HSP70). La fonction de chaperon des HSP favorise un repliement correct des peptides naissants et protège la structure d'autres protéines. Elle est également impliquée dans la translocation des protéines à travers les membranes et dans l'assemblage de complexes protéiques. Elle permet enfin, dans des conditions de stress, un repliement correct des protéines partiellement dénaturées. La dégradation protéique s'effectue en coopération avec une classe particulière de molécules, les ubiquitines. Elle permet une élimination de protéines irréversiblement dénaturées et hautement toxiques pour la cellule. Une autre fonction, attribuée plus spécifiquement à HSP27, consiste en une capacité d'interaction avec l'actine ; elle permet une participation active de la protéine à la dynamique des microfilaments du cytosquelette cellulaire.

En ce qui concerne la maladie cancéreuse, de nombreuses notions abordées dans cette étude confirment que les HSP sont impliquées dans différents aspects du processus cancéreux et dans la thérapie anticancéreuse.

Au niveau cellulaire, l'interaction des HSP avec un certain nombre de protéines impliquées dans le phénomène de prolifération tumorale engendre des effets pouvant être bénéfiques ou délétères. D'une part, la formation de complexes réversibles, entre une HSP70 et l'oncoprotéine p53 sous sa forme mutée, augmente la durée de vie de la protéine. Du fait de cette longue durée de vie, la p53 mutée s'accumule et s'associe à une p53 sauvage en l'inactivant, ce qui contribue au phénomène de transformation tumorale des cellules. D'autre part, en cas de surproduction d'HSP70, la dissociation des complexes HSP70/p53 mutée est défavorisée. La p53 mutée se retrouve indisponible pour une interaction avec la p53 sauvage, dont l'activité protectrice est alors maintenue. Ainsi, les protéines du choc thermique pourrait contribuer, dans certains cas, à la transformation tumorale en favorisant la stabilisation de certaines protéines oncogènes. Mais, dans d'autres cas, la formation de complexes avec les protéines du choc thermique pourrait, au contraire, défavoriser la transformation.

En matière de prévision de l'évolution de certains cancers, les taux d'expression des protéines HSP70 et HSP27 semblent finalement présenter un certain intérêt pronostique. En effet, l'existence d'un lien entre les taux d'HSP et la croissance tumorale semble autoriser une identification de groupes de patients de bon ou de mauvais pronostic, à la fois en ce qui concerne le risque de récurrence et la réponse à divers traitements anticancéreux ; ceci pourrait affecter le choix de la ou des thérapie(s) anticancéreuse(s) et permettre un suivi de l'évolution sous thérapie.

Ainsi, les HSP sont intimement impliquées dans divers processus biologiques et immunologiques et semblent pouvoir être utilisées dans de nombreuses applications thérapeutiques. La reconnaissance des HSP comme antigènes tumoraux, mais également comme une nouvelle forme de molécules présentatrices de l'antigène, constitue un nouvel outil en matière de thérapie anticancéreuse. Ceci représente une nouvelle direction pour le développement d'une immunothérapie anticancéreuse ou «vaccin» anticancéreux, basée sur le caractère conservé des HSP et sur les principales caractéristiques des peptides qu'elles transportent ou présentent.

L'hyperthermie et/ou les HSP présentent un intérêt thérapeutique en matière de cancer, et d'autant plus que l'hyperthermie est utilisée en association avec d'autres agents anticancéreux. Cependant, si l'on considère les phénomènes de thermotolérance et de

«multidrug resistance», susceptibles de compromettre l'issue de la thérapie, l'hyperthermie ne devrait être utilisée que dans le cadre de protocoles bien définis.

Bien que leur utilisation puisse s'accompagne d'effets indésirables potentiellement toxiques pour l'organisme traité et non encore totalement maîtrisés, les HSP bénéficient d'un certain intérêt dans le cadre de thérapies impliquant le système immunitaire de l'hôte et concernant des pathologies dans lesquelles la vie du patient est en jeu.

Ainsi, les protéines du choc thermique offrent de nouvelles perspectives en matière de prévention et/ou de traitement d'un certain nombre de pathologies. La découverte de molécules, cliniquement inoffensives, capables d'induire une accumulation d'HSP chez des patients porteurs de pathologies chroniques apparaît donc d'un grand intérêt thérapeutique.

Il a été démontré (Vigh *et al.* 1997) qu'une nouvelle molécule, le bimoclomol, de formule [2-hydroxy-3-(1-pipéridinyl) propoxy]-3-pyridinecarboximidoilchloride maléate, présentait des propriétés bénéfiques au sein de modèles expérimentaux de pathologies ischémiques et de complications diabétiques. Le bimoclomol possède la capacité de stimuler les réponses homéostatiques cytoprotectrices naturelles, en augmentant la résistance des cellules aux différentes conditions physiopathologiques. Le bimoclomol ne développe aucune activité en l'absence de stress, mais il agit en synergie avec une exposition à des températures peu élevées, un état d'hypoxie-réoxygénation, ou une irradiation UVB. Il facilite alors la formation de chaperons moléculaires de type HSP60, HSP70, et HSP90, au sein des cellules eucaryotes, en induisant ou en amplifiant l'expression des gènes *du choc thermique*.

Bien que tous les détails concernant le mécanisme d'action du bimoclomol dans l'induction des protéines de stress n'aient pas encore été élucidés, il semble qu'il puisse exercer ses effets par interaction avec des composants lipidiques spécifiques de la membrane cellulaire. Il pourrait stimuler l'un des mécanismes de transmission des signaux impliqués dans la réponse au choc thermique, qui se présente sous la forme d'une cascade de réactions en chaîne, située au niveau de la membrane plasmique.

Un effet cytoprotecteur, associé à une absence de toxicité et d'effets indésirables, place le bimoclomol en tête d'une nouvelle génération de molécules, impliquées dans une protection générale des cellules vis à vis du phénomène de stress. Une grande priorité devrait ainsi être donnée à la poursuite d'études plus poussées sur le bimoclomol et ses applications dans le traitement ou la prévention de pathologies associées à une altération des mécanismes homéostatiques cellulaires. Enfin, cette molécule ouvre la voie à de nouvelles opportunités d'utilisation des HSP en thérapeutique (atteintes cardio-vasculaires, pathologies cardiaques, transplantations, dysfonctionnement rénal, complications diabétiques, cancers...).

THESE SOUTENUE PAR : Mélanie POMMIER

TITRE : PROTEINES DU CHOC THERMIQUE (HSP70, HSP27) ET TUMEURS

CONCLUSIONS

Les protéines du choc thermique exercent des fonctions essentielles à la vie cellulaire et plus encore à la survie lors de stress, qu'ils soient physiques, chimiques ou métaboliques. Synthétisées en réponse à une élévation de température ou, plus généralement, en réponse à une perturbation de l'état physiologique de la cellule, les HSP assurent une protection cellulaire efficace. Deux fonctions principales leur sont attribuées : celle de chaperons moléculaires (plus étudiée pour HSP70 mais également présente chez HSP27) et celle de dégradation protéique (HSP70). La fonction de chaperon des HSP favorise un repliement correct des peptides naissants et protège la structure d'autres protéines. Elle est également impliquée dans la translocation des protéines à travers les membranes et dans l'assemblage de complexes protéiques. Elle permet enfin, dans des conditions de stress, un repliement correct des protéines partiellement dénaturées. La dégradation protéique s'effectue en coopération avec une classe particulière de molécules, les ubiquitines. Elle permet une élimination de protéines irréversiblement dénaturées et hautement toxiques pour la cellule. Une autre fonction, attribuée plus spécifiquement à l'HSP27, consiste en une capacité d'interaction avec l'actine ; elle permet une participation active de la protéine à la dynamique des microfilaments du cytosquelette cellulaire.

Les HSP sont impliquées dans différents aspects du processus cancéreux et dans la thérapie anticancéreuse.

Au niveau cellulaire, l'interaction des HSP avec un certain nombre de protéines impliquées dans le phénomène de prolifération tumorale engendre des effets pouvant être bénéfiques ou délétères. D'une part, la formation de complexes réversibles, entre une HSP70 et l'oncoprotéine p53 sous sa forme mutée, augmente la durée de vie de la protéine. Du fait de cette longue durée de vie, la p53 mutée s'accumule et s'associe à une p53 sauvage en l'inactivant, ce qui contribue au phénomène de transformation tumorale des cellules. D'autre part, en cas de surproduction d'HSP70, la dissociation des complexes HSP70/p53 mutée est défavorisée. La p53 mutée se retrouve indisponible pour une interaction avec la p53 sauvage, dont l'activité protectrice est alors maintenue. Ainsi, les protéines du choc thermique pourraient contribuer, dans certains cas, à la transformation tumorale en favorisant la stabilisation de certaines protéines oncogènes. Mais, dans d'autres cas, la formation de complexes avec les protéines du choc thermique pourrait, au contraire, défavoriser la transformation.

En matière de prévision de l'évolution de certains cancers, les taux d'expression des protéines HSP70 et HSP27 semblent présenter un certain intérêt pronostique.

En effet, l'existence d'un lien entre les taux de HSP et la croissance tumorale semble autoriser une identification de groupes de patients de bon ou de mauvais pronostic, à la fois en ce qui concerne le risque de récurrence et la réponse à divers traitements anticancéreux ; ceci pourrait affecter le choix de la ou des thérapie(s) anticancéreuse(s) et permettre un suivi de l'évolution sous thérapie.

Ainsi, les HSP sont intimement impliquées dans divers processus biologiques et immunologiques et semblent pouvoir être utilisées dans de nombreuses applications thérapeutiques. La reconnaissance des HSP comme antigènes tumoraux, mais également comme une nouvelle forme de molécules présentatrices de l'antigène, constitue un nouvel outil en matière de thérapie anticancéreuse. Ceci représente une nouvelle direction pour le développement d'une immunothérapie anticancéreuse ou «vaccin» anticancéreux, basée sur le caractère conservé des HSP et sur les principales caractéristiques des peptides qu'elles transportent ou présentent.

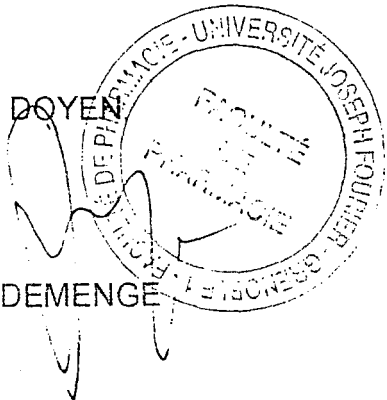
Enfin, les HSP, présentes au sein des cellules tumorales, sont capables de limiter la portée de certains traitements anticancéreux. L'hyperthermie peut être limitée par une synthèse HSP et le développement d'une thermotolérance. De même, des taux intracellulaires élevés de HSP favorisent le développement d'une résistance des cellules vis-à-vis des effets cytotoxiques de certaines molécules anticancéreuses.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

LE DOYEN

P. DEMENGE



LE PRESIDENT DE THESE,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Guiraud".

Docteur P. GUIRAUD

*Mémoire de Thèse de Mélanie POMMIER
Sujet : Protéines du choc thermique (HSP70, HSP27) et tumeurs.*

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Agoff S.N., Hou J., Linzer D.I.H., Wu B. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science*, 1993, **259** : 84-87.
- 2 Arrigo A.P., Landry J. Expression and fonction of the low-molecular-weight heat shock proteins, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994 : 335-363.
- 3 Arrigo A.P. Small stress proteins : chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol. Chem.*, 1998, **379** : 19-26.
- 4 Benndorf R., Bielka H. Cellular stress response : stress proteins physiology and implications for cancer. *Recent Results in Cancer Research*, 1997, **143** : 129-144.
- 5 Bensaude O. Protéines de choc thermique, transport des protéines dans le noyau et oncogénèse. *Médecine/sciences*, 1992, **8** : 710-713.
- 6 Bielka H., Hoinkis G., Oesterreich S., Stahl J., Benndorf R. Induction of the small stress protein, hsp25, in Ehrlich ascites carcinoma cells by anticancer drugs. *FEBS Letters*, 1994, **343** : 165-167.
- 7 Brodsky J.L., Schekman R. Heat shock cognate proteins and polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994 : 85-103.
- 8 Brustad T., Rofstad E.K. Effects of heat treatment *in vitro* and *in vivo* on human melanoma xenografts. *Recent Results in Cancer Research*, 1988, **109** : 183-197.
- 9 Carper S.W., Rocheleau T.A., Cimino D., Storm F.K. Heat shock protein 27 stimulates recovery of RNA and protein synthesis following a heat shock. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1997, **66** : 153-164.
- 10 Ciocca D.R., Fuqua S.A.W., Lock-Lim S., Toft D., Welch W.J., McGuire W.L. Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer research*, 1992, **52** : 3648-3654.
- 11 Ciocca D.R., Clark G.M., Tandon A.K., Fuqua S.A.W., Welch W.J., McGuire W.L. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer : pronostic implications. *Journal of the national cancer institute*, 1993, **85** : 570-574.
- 12 Ciocca D.R., Green S., Elledge R.M. *et al.* Heat shock proteins hsp27 and hsp70 : lack of correlation with response to tamoxifen and clinical course of disease in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 1998, **5** : 1263-1266.
- 13 Davidoff A.M., Iglehart J.D., Marks J.R. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, **89** : 3439-3442.
- 14 Dice J.F., Agarraberes F., Kirven-Brooks M., Terlecky L.J., Terlecky S.R. Heat shock 70-kD proteins and lysosomal proteolysis, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994 : 137-149.
- 15 Fernandes M., O'Brien T., Lis J.T. Structure and regulation of heat shock gene promoters, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994 : 375-389.
- 16 Ferrarini M., Heltai S., Zocchi M.R., Rugarli C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int. J. Cancer*, 1992, **51** : 613-619.
- 17 Finlay C.A., Hinds P.W., Tan T.H., Elyahu D., Oren M., Levine A.J. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and Cellular Biology*, 1988, **8** : 531-539.
- 18 Finlay C.A. P53 loss of function : implications for the processes of immortalization and tumorigenesis. *Bioessays*, 1992, **14** : 557-560.

- 19 **Fourie A.M., Hupp T.R., Lane D.P. et al.** HSP70 binding sites in the tumor suppressor protein p53. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272** : 19471-19479.
- 20 **Frydman J., Hartl F.-U.** Molecular chaperone functions of hsp70 and hsp60 in protein folding, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994, 251-267.
- 21 **Fuller K.J., Issels R.D., Slosman D.O., Guillet J.-G., Soussi T., Polla B.S.** Cancer and the heat shock response. *European Journal of Cancer*, 1994, **30A** : 1884-1891.
- 22 **Hartman D., Gething M.J.** Normal protein folding machinery, *In* : Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B., eds. *Stress-Inducible Cellular Response*, 1996 : 3-19.
- 23 **Hendrick J.P., Hartl F.-U.** Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, **62** : 349-384.
- 24 **Holbrook N.J., Udelsman R.** Heat shock protein gene expression in response to physiologic stress and aging, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994 : 577-591.
- 25 **Huot J., Houle F., Spitz D.R., Landry J.** HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Research*, 1996, **56** : 273-279.
- 26 **Imani F., Shinnick T.M., Soloski M.J.** Major histocompatibility complex class II molecules, *In* : Van Eden W., Young D.B., eds. *Stress Proteins in Medicine*, Marcel Dekker, New York, 1996 : 547-553.
- 27 **Jäättelä M., Wissing D., Bauer P.A., Li G.C.** Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *The EMBO Journal*, 1992, **11** : 3507-3512.
- 28 **Jäättelä M., Wissing D.** Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity : possible mechanism of self-protection. *J. Exp. Med.*, 1993, **177** : 231-236.
- 29 **Jacquier-Sarlin M.R., Polla B.S.** Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂ : role of thioredoxin. *Biochem. j.*, 1996, **318** : 187-193.
- 30 **Jakob U., Gaestel M., Engel K., Buchner J.** Small heat shock proteins are molecular chaperones. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268** : 1517-1520.
- 31 **Kaufmann S.H.E., Schoel B.** Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994 : 495-521.
- 32 **Kingston R.E., Baldwin Jr A.S., Sharp P.A.** Regulation of heat shock protein 70 gene expression by *c-myc*. *Nature*, 1984, **312** : 280-282.
- 33 **Knauf U., Bielka H., Gaestel M.** Over-expression of the small heat-shock protein, hsp25, inhibits growth of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Letters*, 1992, **309** : 297-302.
- 34 **Koishi M., Hosokawa N., Sato M. et al.** Quercetin, an inhibitor of heat shock protein synthesis, inhibits the acquisition of thermotolerance in a human colon carcinoma cell line. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1992, **83** : 1216-1222.
- 35 **Langer T., Neupert W.** Chaperoning mitochondrial biogenesis, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994 : 53-77.
- 36 **Lavoie J.N., Lambert H., Hickey E., Weber L.A., Landry J.** Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, **15** : 505-516.

- 37 Leppä S., Sistonen L.** Heat shock response-pathophysiological implications. *Annals of Medicine*, 1997, **29** : 73-78.
- 38 Li G.C., Mivechi N.F., Weitzel G.** Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia*, 1995, **11** : 459-488.
- 39 Liu A.Y.-C, Lee Y.-K., Manalo D., Huang L.E.** Attenuated heat shock transcriptional response in aging : molecular mechanism and implication in the biology of aging, *In* : Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B., eds. *Stress-Inducible Cellular Responses*, 1996 : 394-408.
- 40 Love S., King R.J.B.** A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br. J Cancer*, 1994, **69** : 743-748.
- 41 Lukacs K.V., Lowrie D.B., Colston M.J.** Protection against tumors by stress protein gene transfer, *In* : Van Eden W., Young D.B., eds. *Stress Proteins in Medicine*, Marcel Dekker, New York, 1996 : 249-261.
- 42 Lukacs K.V., Nakakes A., Atkins C.J., Lowrie D.B., Colston M.J.** *In vivo* gene therapy of malignant tumours with heat shock protein-65 gene. *Gene Therapy*, 1997, **4** : 346-350.
- 43 Marquez C.M., Sneed P.K., Li G.C., Mak J.Y., Phillips T.L.** HSP70 synthesis in clinical hyperthermia patients : preliminary results of a new technique. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 1993, **28** : 425-430.
- 44 McKay D.B., Wilbanks S.M., Flaherty K.M., Ha J.-H., O'Brien M.C., Shirvanee L.L.** Stress-70 proteins and their interaction with nucleotides, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C., eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994 : 153-173.
- 45 Milner J., Medcalf E.A.** Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell*, 1991, **65** : 765-774.
- 46 Morimoto R.I.** Heat shock : the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer cells*, 1991, **3** : 295-301.
- 47 Morimoto R.I., Jurivich D.A., Kroeger P.E. et al.** Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors, *In* : Morimoto R.I., Tissières A., Georgopoulos C. eds. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994 : 417-451.
- 48 Morimoto R.I., Kroeger P.E., Cotto J.J.** The transcriptional regulation of heat shock genes : a plethora of heat shock factors and regulatory conditions, *In* : Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B., eds. *Stress-Inducible Cellular Responses*, 1996 : 139-159.
- 49 Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Denis-Larose C., Massie B.** Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, **17** : 5317-5327.
- 50 Multhoff G., Botzler C., Jennen L., Schmidt J., Ellwart J., Issels R.** Heat shock protein 72 on tumor cells. *The Journal of Immunology*, 1997, **158** : 4341-4350.
- 51 Multhoff G., Botzler C., Issels R.** The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. *Biol. Chem.*, 1998, **379** : 295-300.
- 52 Oesterreich S., Weng C.-N., Qiu M., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Fuqua S.A.W.** The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Research*, 1993, **53** : 4443-4448.
- 53 Pelham H.R.B.** Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*, 1986, **46** : 959-961.
- 54 Pierce S.K.** Molecular chaperones in the processing and presentation of antigen to helper T cells. *Experientia* **50**, 1994 : 1026-1030.
- 55 Polla B.S., Kantengwa S., François D. et al.** Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93** : 6458-6463.

- 56 Polla B.S., Banzet N., Dall'Ava J., Arrigo A.P., Vignola A.M.** Les mitochondries, carrefour entre vie et mort cellulaire : rôles des protéines de stress et conséquences sur l'inflammation. *Médecine/sciences*, 1998, **14** : 18-25.
- 57 Rhee J.G., Schuman V.C., Song C.W., Levitt S.H.** Difference in the thermotolerance of mouse mammary carcinoma cells *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Research*, 1987, **47** : 2571-2575.
- 58 Schweighoffer T.** Tumor cells expressing a recall antigen are powerful cancer vaccines. *Eur. J. Immunol.*, 1996, **26** : 2559-2564.
- 59 Sherman M.Y.S., Goldberg A.L.** Involment of molecular chaperones in intracellular protein breakdown, *In* : Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B., eds. *Stress-Inducible Cellular Responses*, 1996 : 57-73.
- 60 Srivastava P.K., Maki R.G.** Stress-induced proteins in immune response to cancer. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1991, **167** : 109-123.
- 61 Srivastava P.K.** Heat shock proteins in immune response to cancer : the fourth paradigm. *Experientia* 50, 1994 : 1054-1060.
- 62 Srivastava P.K.** Heat shock proteins as chaperones of unique and shared antigenic epitopes of human cancers, *In* : Van Eden W., Young D.B., eds. *Stress Proteins in Medicine*, Marcel Dekker, New York, 1996 : 519-527.
- 63 Strahler J.R., Kuick R., Eckerskorn C. et al.** Identification of two related markers for common acute lymphoblastic leukemia as heat shock proteins. *J. Clin. Invest*, 1990, **85** : 200-207.
- 64 Têtu B., Lacasse B., Bouchard H.-L., Lagacé R., Huot J., Landry J.** Pronostic influence of HSP-27 expression in malignant fibrous histiocytoma : a clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Research*, 1992 ; **52** : 2325-2328.
- 65 Thor A., Benz C., Moore D. et al.** Stress response protein (srp-27) determination in primary human breast carcinomas : clinical, histologic, and prognostic correlations. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1991, **83** : 170-178.
- 66 Vaux D.L., Strasser A.** The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93** : 2239-2244.
- 67 Vernon C.** Hyperthermia in cancer growth regulation. *Biotherapy*, 1992, **4** : 307-315.
- 68 Vigh L., Literati P.N., Horvath I. et al.** Bimoclomol : a nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. *Nature Medicine*, 1997, **3** : 1150-1154.
- 69 Wu C.** Heat shock transcription factors : structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1995, **11** : 441-469.





Serment des Apothicaïres

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

