



HAL
open science

Les effets de l'hyperthermie sur la production de protéines de choc thermique et les récepteurs bêta-adrénergiques cardiaques

Marie Joyeux

► **To cite this version:**

Marie Joyeux. Les effets de l'hyperthermie sur la production de protéines de choc thermique et les récepteurs bêta-adrénergiques cardiaques. Sciences pharmaceutiques. 1995. dumas-02177617

HAL Id: dumas-02177617

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02177617>

Submitted on 9 Jul 2019

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 SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.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



D 115 017080 2

**UNIVERSITE Joseph FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE
DE GRENOBLE**

Domaine de la Merci, La Tronche

1995

n° 7041

***LES EFFETS DE L'HYPERTHERMIE
SUR LA PRODUCTION DE PROTEINES
DE CHOC THERMIQUE ET LES RECEPTEURS
BETA-ADRENERGIQUES CARDIAQUES***

THESE

présentée à l'Université Joseph FOURIER, GRENOBLE I,
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE.

Par

Marie JOYEUX

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 6 octobre 1995 devant :
Monsieur le Professeur Pierre DEMENGE, Président du Jury
Monsieur le Docteur Christophe RIBUOT
Madame le Docteur Diane GODIN-RIBUOT
Monsieur le Docteur Charles ARVIEUX



**UNIVERSITE Joseph FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE
DE GRENOBLE**

Domaine de la Merci, La Tronche

1995

***LES EFFETS DE L'HYPERTHERMIE
SUR LA PRODUCTION DE PROTEINES
DE CHOC THERMIQUE ET LES RECEPTEURS
BETA-ADRENERGIQUES CARDIAQUES***

THESE

présentée à l'Université Joseph FOURIER, GRENOBLE I,
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE.

Par

Marie JOYEUX

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 6 octobre 1995 devant :
Monsieur le Professeur Pierre DEMENGE, Président du Jury
Monsieur le Docteur Christophe RIBUOT
Madame le Docteur Diane GODIN-RIBUOT
Monsieur le Docteur Charles ARVIEUX



A mes parents,

A Alexandre

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire Expérimentale Biomolécules de la Faculté de Pharmacie de Grenoble, sous la responsabilité de Monsieur le professeur Pierre DEMENGE. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son équipe et d'avoir encouragé ce projet dès les premiers jours. Il me fait aujourd'hui un grand honneur en acceptant la présidence du jury de cette thèse.

Je remercie vivement Monsieur le Docteur Christophe RIBUOT ainsi que Madame le Docteur Diane GODIN-RIBUOT pour m'avoir dirigée dans cette étude. Leurs qualités humaines, leur indulgence, ainsi que leur passion pour la recherche ont rendu ce travail très agréable. Qu'il me soit permis de leur témoigner ma sincère reconnaissance et ma gratitude pour avoir accepté de siéger à ce jury.

Je suis également sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Docteur Charles ARVIEUX, de la Faculté de médecine, en acceptant de juger ce travail. Je le remercie de l'intérêt qu'il a porté à cette étude.

Je profite enfin de l'occasion pour dire un grand MERCI à tous les membres du laboratoire de Pharmacologie, pour leur accueil chaleureux ainsi que pour leur aide précieuse.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	6
1. LES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE	
1.1. LA REPOSE HEAT SHOCK	
1.1.1. Les différents inducteurs de la réponse heat shock	9
1.1.2. Régulation de l'expression des gènes heat shock	12
1.1.3. Modifications biochimiques intracellulaires dues au stress	13
1.1.4. Les inhibiteurs de synthèse des HSP	13
1.2. STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES HSP	14
1.3. LES FONCTIONS DES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE	18
1.4. INTERET DES PROTEINES DE STRESS EN PATHOLOGIE	
1.4.1. Un marqueur de lésion cellulaire	19
1.4.2. La thermotolérance	19
1.4.3. Rôle des HSP dans la réponse immunitaire	21
1.4.4. Rôle des HSP en oncogénèse	22
1.4.5. Rôle des HSP en toxicologie	23
1.5. CONCLUSION SUR LES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE	24
2. MISE AU POINT DU MODELE D'HYPERTHERMIE	
2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE UTILISE	25
2.2. LES DIFFERENTES METHODES D'INDUCTION DE L'HYPERTHERMIE	25
2.3. MISE AU POINT DU MODELE D'HYPERTHERMIE	26

	Pages
3. EFFET DE L'HYPERTHERMIE SUR LA PRODUCTION DE HSP AU NIVEAU DU COEUR	
3.1. REALISATION D'UNE EXTRACTION PROTEIQUE PREPARATIVE	
3.1.1. Prélèvement du coeur	29
3.1.2. Préparation du tampon de lyse	29
3.2. SEPARATION DES PROTEINES DE STRESS PAR ELECTROPHORESE	
3.2.1. Préparation du gel d'acrylamide	30
3.2.2. Migration des extraits protéiques	32
3.3. IDENTIFICATION DES HSP PAR WESTERN BLOTTING	
3.3.1. Réalisation du transfert des HSP sur nitrocellulose	33
3.3.2. Révélation des HSP 73, 72 et 27 par ECL Western blotting	34
3.4. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF DES HSP	
3.4.1. Dosage des protéines cardiaques par la méthode de Bradford	36
3.4.2. Révélation du profil protéique de chaque extrait par un gel coloré au bleu de Coomassie	37
3.4.3. Dosage semi-quantitatif des HSP par densitométrie	37
3.5. ANALYSE DES RESULTATS ET CONCLUSION	38
 4. EFFET DE L'HYPERTHERMIE SUR LES RECEPTEURS BETA-ADRENERGIQUES CARDIAQUES	
4.1. QUANTIFICATION DES RECEPTEURS BETA-ADRENERGIQUES PAR FIXATION D'UN LIGAND RADIOACTIF IN VITRO	
4.1.1. Préparation du tissu cardiaque	40
4.1.2. Fixation d'un ligand radioactif sur les récepteurs β -adrénergiques	42
4.2. RESULTATS OBTENUS ET LEUR ANALYSE	
4.2.1. Résultats obtenus chez les rats hyperthermiés et chez les rats témoins	45
4.2.2. Analyse des résultats précédents	46
4.3. CONCLUSION ET DEVELOPPEMENT	47

CONCLUSION	Pages 49
ANNEXES	51
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AMP : adénosine monophosphate

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

GRP : glucose regulated protein

HSE : heat shock element

HSF : heat shock factor

HSP : heat shock protein

LISTE DES FIGURES

Numéro de la figure	Titre	Pages
1	Classification des différents inducteurs de la réponse cellulaire au stress.	11
2	Principe de l'ECL Western Blotting.	35
3	Fixation du [³ H]CGP 12177 sur les récepteurs β ₁ -adrénergiques ventriculaires d'un rat témoin.	45
4	Fixation du [³ H]CGP 12177 sur les récepteurs β ₁ -adrénergiques cardiaques, chez le rat témoin.	55
5	Représentation de Scatchard de la fixation de [³ H]CGP 12177 sur les récepteurs β ₁ -adrénergiques d'un coeur de rat témoin.	55
6	Fixation du [³ H]CGP 12177 sur les récepteurs β ₁ -adrénergiques cardiaques, chez le rat hyperthermié.	56
7	Représentation de Scatchard de la fixation de [³ H]CGP 12177 sur les récepteurs β ₁ -adrénergiques d'un coeur de rat hyperthermié.	56

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La synthèse des protéines de choc thermique ou HSP (heat shock proteins) a été décrite pour la première fois en 1962, à la suite d'une hyperthermie (Ritossa, 1962). Depuis, il est apparu que cette réponse "heat shock" est un moyen de défense généralisé, développé par la cellule pour faire face à la grande diversité des agressions auxquelles elle peut être soumise (Jacquier-Sarlin et Polla, 1994).

Les HSP, plus généralement appelées protéines de stress, ont été extrêmement conservées à travers l'évolution et sont de plus ubiquitaires, ce qui suggère leur rôle essentiel dans la vie cellulaire.

En effet, les protéines de choc thermique sont des **chaperons moléculaires** qui s'associent à d'autres protéines dénaturées ou en cours de biosynthèse, pour prévenir leur agrégation, éliminer les protéines anormales, ou encore faciliter leur transfert vers différents organites intracellulaires. Enfin, plusieurs études ont montré le caractère indispensable des HSP à la croissance, à la maturation et à la survie de la cellule (Schlesinger, 1990).

Il est donc logique que ces protéines soient impliquées dans divers processus physiopathologiques.

Le rôle protecteur des protéines de stress, qui fait actuellement l'objet de très nombreuses recherches, s'étend à différents domaines comme la physiologie cardiovasculaire (tout particulièrement le phénomène d'ischémie-reperfusion), l'immunologie, l'oncologie et même la toxicologie (Currie et coll., 1988; Bensaude, 1992b; Welch, 1992).

Le but de cette étude est de mettre au point un modèle d'hyperthermie chez le rat. Nous testerons ensuite la capacité de ce modèle à induire une synthèse de protéines de choc thermique, en identifiant ces protéines au niveau du coeur, par électrophorèse couplée à une immunodétection.

Nous analyserons, par ailleurs, l'effet de l'hyperthermie sur les récepteurs β -adrénergiques cardiaques *via* un effet sur le système nerveux sympathique. Nous quantifierons ces récepteurs par fixation d'un ligand radioactif, pour mettre en évidence une éventuelle modification de leur nombre et/ou de leur affinité vis-à-vis de leurs agonistes, les catécholamines.

Enfin, nous envisagerons différentes études complémentaires qu'il serait intéressant de réaliser à la suite de ces travaux.

1. LES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE

1. LES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE

En 1962, Ritossa fut le premier à observer une réponse heat shock chez le *Drosophile*. Il mit en évidence une modification morphologique des chromosomes, dans les glandes salivaires isolées de *Drosophila Melanogaster*, exposées à de hautes températures. Ces chromosomes comportaient des sites transcriptionnels spécifiques de la synthèse des HSP. Par la suite, les principales protéines de choc thermique furent découvertes par Tissières et ses collaborateurs (1974). Une réponse heat shock similaire à celle observée chez le *Drosophile* a ensuite été observée dans de nombreux organismes, aussi bien chez des bactéries que chez l'Homme (Schlesinger et coll., 1982).

Depuis, nous savons que les protéines de stress sont ubiquitaires puisqu'elles sont exprimées par tous les procaryotes, les eucaryotes et les plantes (Lindquist et Craig, 1988; Kochevar et coll., 1991). Par ailleurs, l'extrême conservation des HSP à travers l'évolution suggère l'implication de ces protéines dans des fonctions cellulaires vitales.

1.1. LA REPONSE HEAT SHOCK

L'exposition cellulaire à une élévation de température ou à d'autres agressions induit, dans toute cellule, une réponse instantanée et transitoire appelée **heat shock**.

Cette réponse se traduit tout d'abord par une phase d'altération cellulaire caractérisée par la diminution de la traduction des ARN messagers et de la synthèse des protéines cellulaires normales. Des altérations morphologiques ainsi que des modifications de la chromatine et du cytosquelette se produisent. De plus, certaines activités enzymatiques sont inhibées. Cependant, d'autres enzymes, comme les protéines kinases, sont activés lors de

cette première phase. Ce processus, qui ne requiert pas de synthèse protéique, permettrait à la cellule de s'adapter, en limitant la synthèse de protéines anormales.

Presque simultanément, la cellule met en place un système de protection par induction de la transcription d'une famille de gènes spécifiques qui aboutit à la synthèse puis à l'accumulation intracellulaire des HSP. Ces protéines vont restaurer les fonctions cellulaires normales (Knowlton, 1994).

Enfin, la cellule recouvre une morphologie ainsi qu'une transcription génique et une traduction des ARN messagers normales. Les activités enzymatiques cellulaires retournent à leur valeur initiale (Burel et coll., 1992).

En fait, les protéines de choc thermique sont induites par des stress modérés, dans le but de protéger l'organisme de stress encore plus sévères (Lindquist et Craig, 1988).

1.1.1. Les différents inducteurs de la réponse heat shock

Ce type de réponse peut être engendré par différents facteurs regroupés en trois catégories (Figure 1, page 11), (Jacquier-Sarlin et Polla, 1994) :

- **Certaines conditions physiologiques** comme la croissance cellulaire ou le développement. En effet, des HSP constitutives sont exprimées par les cellules, en l'absence de toute agression. Ces protéines interviennent durant le cycle cellulaire normal.

Par exemple, ce phénomène a été observé lors de la gamétogénèse chez la souris (Burel et coll., 1992).

- **Certains états physiopathologiques.**

Chez les mammifères, la fièvre et l'inflammation sont capables d'induire une synthèse de protéines de stress (Lindquist et Craig, 1988). Au cours de la phagocytose, une



augmentation de la production des HSP a été observée, probablement en réponse à la production intracellulaire de radicaux libres de l'oxygène par la cellule hôte (Jacquier-Sarlin et Polla, 1994). Les infections virales engendrent aussi une synthèse intracellulaire de ces protéines (Bensaude, 1992a; Welch, 1992). De même, l'hypertrophie, l'ischémie-reperfusion ou l'hypoxie sont des inducteurs de ce type de réponse (Currie, 1987; Mehta et coll., 1988; Iwaki et coll., 1993; Das et coll., 1995).

- Les agressions de l'environnement.

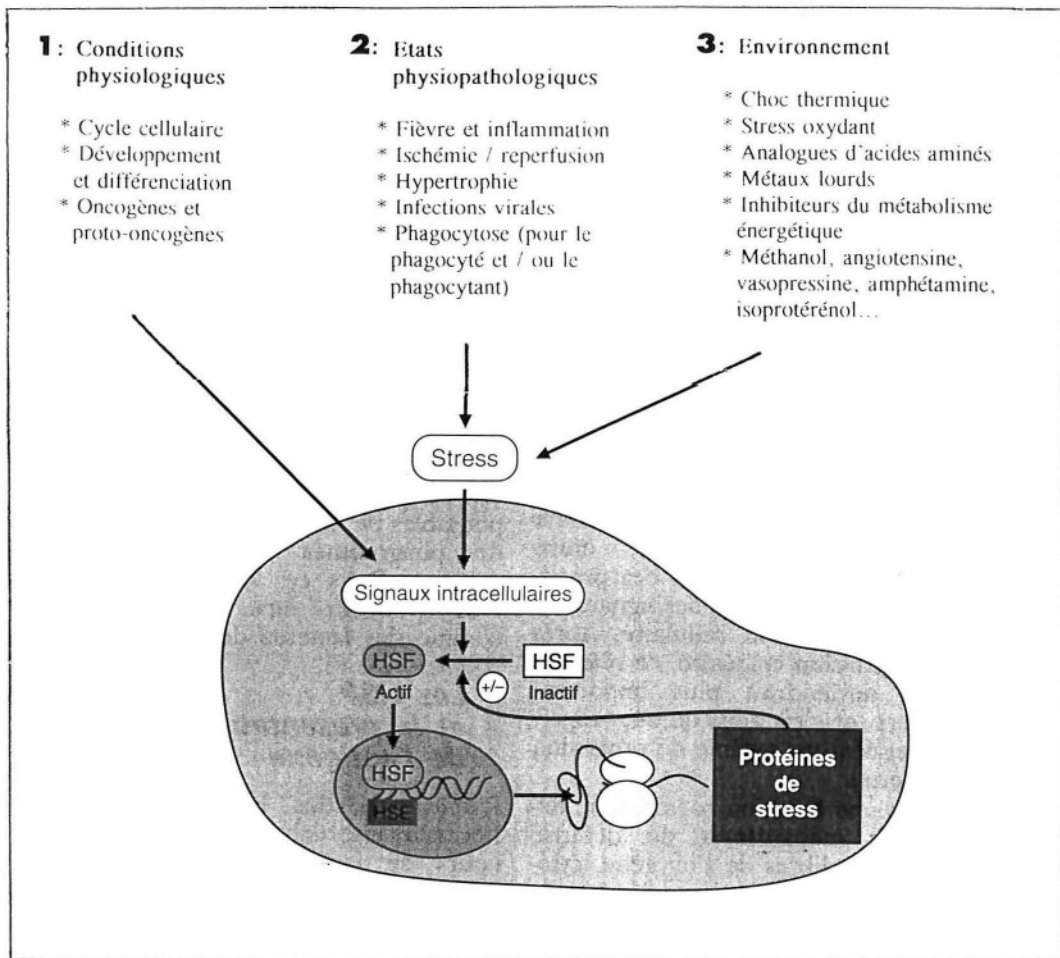
Parmi ces facteurs environnementaux, l'hyperthermie fut le premier inducteur d'une réponse heat shock, observé par Ritossa (1962). Ce stress thermique est susceptible de se produire dans l'environnement naturel de chaque organisme (Lindquist et Craig, 1988).

Nous pouvons ensuite citer le choc osmotique (Petronini et coll., 1993), les radicaux libres de l'oxygène (qui dénaturent les protéines cellulaires), ainsi que de nombreux autres stress métaboliques comme les analogues d'acides aminés, l'arsénite, différents métaux lourds, des agents modifiant les groupements sulfhydriles protéiques, des inhibiteurs du métabolisme énergétique, certains ionophores (du calcium), etc. (Currie et White, 1981; Van Rijn et coll., 1992; Welch, 1992).

Différentes substances comme l'éthanol, l'angiotensine, la vasopressine, l'isoprotérénol, l'amphétamine... sont aussi capables d'induire la synthèse de protéines de stress (Kochevar et coll., 1991; Lu et Das, 1993; Maulik et coll., 1994).

Il en est de même pour certains anesthésiques comme la kétamine ou l'halothane (Lin et coll., 1994; Renis et coll., 1994).

Certaines protéines de stress sont même induites par l'exercice physique, qui augmente la température des muscles et la production de radicaux libres de l'oxygène (Salo et coll., 1991).



HSF : heat shock factor
HSE : heat shock element

Figure 1. Classification des différents inducteurs de la réponse cellulaire au stress (d'après Jacquier-Sarlin et Polla, 1994).

1.1.2. Régulation de l'expression des gènes heat shock

La compréhension des mécanismes par lesquels l'agression est détectée par la cellule et l'information transmise au système transcriptionnel reste un des objectifs majeurs de la recherche.

L'activation transcriptionnelle des gènes heat shock fait intervenir, chez l'Homme, deux facteurs heat shock (HSF) ayant des rôles fonctionnels distincts. L'affinité de HSF1 pour l'ADN nécessite une agression cellulaire alors que celle de HSF2 est constitutive. Ces HSF sont synthétisés et stockés sous une forme latente en l'absence d'agression.

Malgré une homologie totale inférieure à 40%, tous les HSF conservent en commun deux domaines : le site de liaison à l'ADN et la séquence hydrophobe impliquée dans leur oligomérisation (Morimoto et coll., 1992).

La capacité de liaison à l'ADN est acquise après activation des HSF par l'accumulation cytoplasmique de protéines dénaturées (par le choc thermique), ce qui induit l'oligomérisation de HSF1 qui pénètre alors dans le noyau pour se lier à des sites spécifiques HSE (heat shock elements) situés dans la région promotrice des gènes heat shock. Ces HSE sont composés de 3 modules de 5 paires de bases (nGAAn) agencés selon le modèle nGAAnnTTCnnGAAn.

La liaison des HSF aux HSE conduit à l'induction de l'expression des gènes heat shock et à la synthèse des HSP (Jacquier-Sarlin et Polla, 1994) (Figure 1, page 11).

Les protéines de stress participent au contrôle de leur propre synthèse. Cette autorégulation est basée sur l'association des HSP aux facteurs HSF, ainsi maintenus dans leur forme inactive. Quand les HSP se lient aux protéines cellulaires dénaturées (par un stress), le pool des HSP libres diminue et les complexes HSP-HSF vont se dissocier. Les facteurs HSF libérés pourront alors s'oligomériser, d'où l'induction d'une réponse heat shock (Didomenico et coll., 1982; Beckmann et coll., 1992).

1.1.3. Modifications biochimiques intracellulaires dues au stress

Dans les cellules des mammifères, plusieurs mécanismes biochimiques sont modifiés après un stress thermique. Les premiers effets de l'hyperthermie sont l'abaissement du pH intracellulaire, la diminution du taux d'ATP, et l'augmentation du taux cytosolique du calcium.

Il semblerait que la déplétion intracellulaire d'ATP, couplée à l'accumulation de protéines dénaturées, induise la synthèse des HSP (par diminution du nombre de HSP libres d'où activation de la réponse heat shock) (Iwaki et coll., 1993; Mestril et Dillmann, 1995).

Par ailleurs, les fonctions mitochondriales, et en particulier le métabolisme aérobie, sont très affectées par l'élévation de température. L'adaptation du métabolisme anaérobie est donc essentielle pour la survie des cellules stressées (Welch, 1992).

1.1.4. Les inhibiteurs de synthèse de HSP

L'induction de la synthèse des protéines de stress est dépendante de la transcription *de novo* des ARN. En effet, les HSP ne sont pas synthétisées quand de l'actinomycine D (qui bloque la synthèse des ARN) est administrée avant le choc thermique (Mestril et Dillmann, 1995).

D'autre part, certains flavonoïdes, comme la quercétine, sont capables d'inhiber l'expression des HSP chez des lignées cellulaires humaines (HELA, COLO320 DM et HT-29) (Hosokawa et coll., 1990; Nakata et coll., 1993; Lee et coll., 1994).

1.2. STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES HSP

Les HSP sont habituellement classées en familles selon leur poids moléculaire apparent sur gel d'électrophorèse, leurs principaux agents inducteurs et leurs fonctions (Tableau 1, page 15) (Morimoto et coll., 1992; Jacquier-Sarlin et Polla, 1994).

Il existe cinq groupes majeurs : 110, 90, 70, 60 et 20-30kD .

- **HSP110** est une protéine qui reste peu connue, et uniquement étudiée dans les cellules de mammifères. Cette protéine de choc thermique migre dans le noyau au cours d'un stress. HSP110 est constitutive, cependant son taux augmente lorsque la cellule est agressée. Elle est localisée dans le nucléole (contenant la chromatine). Il semblerait que cette protéine de stress soit impliquée dans la transcription ARN ribosomale, sensible à la chaleur (Kochevar et coll., 1991; Welch, 1992).

- **La famille des HSP90** comprend une protéine de 90kD (HSP90) et une protéine contrôlée par le glucose (GRP94).

HSP90 existe sous deux isoformes (α et β). Cette protéine de stress facilite le transfert des récepteurs activés des glucocorticoïdes vers le noyau. Elle interagirait aussi avec différentes protéines kinases, ainsi qu'avec d'autres protéines cellulaires comme l'actine et la tubuline (Lindquist et Craig, 1988; Edwards et coll., 1992).

GRP94 est localisée dans le réticulum endoplasmique, et semble réguler l'activité d'autres protéines présentes dans cet organite (Welch, 1992).

- **La famille des HSP70** est la plus importante famille de HSP produites. Elle comprend des formes constitutives, induites par un stress, ou régulées par le glucose. Ces HSP ont la propriété commune de se lier à l'ATP pour l'hydrolyser. Elles sont distribuées dans différents compartiments intracellulaires (Welch, 1992).

HSP73 (ou HSC) est synthétisée **constitutivement** par toutes les cellules de mammifères.

HSP72, qui est **inductible**, migre dans le noyau au cours d'un stress.

Ces deux protéines, présentes dans le cytoplasme et le noyau, sont impliquées dans la maturation des protéines cellulaires (Welch, 1992). Leur rôle de chaperon moléculaire sera détaillé dans la partie 1.3., page 18.

GRP75, localisée dans les mitochondries, interviendrait aussi dans la maturation protéique.

GRP78, présente dans le réticulum endoplasmique, a tout d'abord été nommée BiP (binding immunoglobulin protein). Cette protéine de stress est capable de s'associer aux chaînes lourdes des immunoglobulines, ainsi qu'à de nombreux polypeptides.

Ces deux dernières protéines de stress sont des formes constitutives, contrôlées par le glucose (Deshaies et coll., 1988; Kochevar et coll., 1991; Welch, 1992).

- **HSP60** est une protéine codée par des gènes nucléaires, synthétisée dans le cytoplasme, puis transportée dans les mitochondries où elle facilite l'assemblage de complexes macromoléculaires (Welch, 1992; Mestril et Dillmann, 1995). Certains cofacteurs, comme une HSP10 ou GRP75, seraient impliqués dans ces interactions moléculaires (Wynn et coll., 1994).

- Les protéines de **bas poids moléculaire**, de **22 à 32kD**, ont été moins étudiées que les autres. Certaines sont induites par l'hyperthermie, ainsi que par des agents mitogènes, des oestrogènes..., alors que d'autres seraient impliquées dans la différenciation cellulaire (Welch, 1992; Mestril et Dillmann, 1995).

- **L'ubiquitine**, de poids moléculaire 8kD, n'est pas classée parmi les HSP car ses caractéristiques structurelle et fonctionnelle sont différentes. Cependant, elle peut être considérée comme une protéine de stress, puisque sa synthèse est augmentée lors de différentes agressions comme le choc thermique. Cette protéine a pour fonction de dégrader les protéines dénaturées. De plus, l'ubiquitine pourrait participer à la régulation de la réponse heat shock (Kochevar et coll., 1991; Welch, 1992).

L'expression constitutive ainsi que l'extrême conservation des protéines de choc thermique suggèrent leur rôle essentiel dans la vie cellulaire.

1.3. LES FONCTIONS DES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE

La synthèse des protéines de stress est un moyen de défense généralisé, développé par la cellule pour faire face à la grande diversité des agressions auxquelles elle peut être soumise.

Ces HSP sont aussi appelées **chaperons moléculaires** car elles sont indispensables à la croissance, la survie et la régulation de la cellule, par interaction avec les protéines cellulaires (Schlesinger, 1990; Wynn et coll., 1994).

En effet, les protéines de choc thermique s'associent à d'autres protéines dénaturées ou en cours de biosynthèse, c'est-à-dire ayant perdu ou n'ayant pas encore acquis leur configuration tridimensionnelle. Ces interactions moléculaires ont différents rôles.

Parmi ceux-ci nous trouvons tout d'abord la prévention de l'agrégation des protéines altérées ou en cours de biosynthèse. Les HSP stabilisent ces protéines dans leur forme dépliée, puis elles participent à leur repliement correct. Ces interactions semblent ATP dépendantes (Welch, 1992; Jakob et coll., 1993).

D'autre part, les protéines de stress participent au transfert des protéines cellulaires, du cytoplasme vers la membrane plasmique ou vers des organites tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique, les lysosomes ou le noyau. Les HSP préviennent ainsi le repliement prématuré des protéines avant la fin de leur translocation (Bensaude, 1992b; Welch, 1992). Au cours de ces transferts protéiques, il semblerait que les HSP70 permettent la liaison des protéines au réseau de microfilaments d'actine (c'est-à-dire au cytosquelette) (Tsang, 1993).

Enfin, les protéines de stress participent à l'élimination des protéines anormales, reconnues comme étrangères par le système immunitaire (Jacquier-Sarlin et Polla, 1994).

Ainsi le rôle des protéines de choc thermique, en tant que chaperons moléculaires, est fondamental pour l'adaptation de la cellule envers différentes agressions, mais aussi pour sa maturation, sa croissance et sa différenciation (Wynn et coll., 1994).

1.4. INTERET DES PROTEINES DE STRESS EN PATHOLOGIE

En considérant que la réponse heat shock représente un mécanisme de défense cellulaire essentiel, développé par toute cellule agressée, il est naturel que cette réponse soit impliquée dans divers phénomènes pathologiques.

1.4.1. Un marqueur de lésion cellulaire

La réponse heat shock peut servir d'outil diagnostique pour déterminer l'extension de lésions de tissu ou d'organe. En effet, cette réponse est particulièrement étudiée sur différents organes ayant subi une ischémie-reperfusion. Au niveau du coeur, une synthèse supérieure de HSP est observée durant une ischémie-reperfusion transitoire ou après une surcharge hémodynamique.

Les cliniciens commencent à utiliser l'expression des HSP comme marqueur sensible pour le diagnostic de lésions in vivo (Welch, 1992).

1.4.2. La thermotolérance

Une hyperthermie préalable permet à des cellules, tissus ou animaux de résister à un chauffage ultérieur. Ce phénomène, appelé **thermotolérance**, est transitoire et dépend de la sévérité du stress thermique initial (Moseley, 1994).

De plus, un prétraitement par la chaleur induit une tolérance vis-à-vis d'autres stress, et d'autres formes de stress peuvent induire une thermotolérance (Lindquist et Craig, 1988).

Bien que la thermotolérance soit associée à une production de protéines de choc thermique, il est évident que d'autres mécanismes, distincts de la synthèse des HSP, sont aussi impliqués dans ce phénomène (Moseley, 1994).

La réponse heat shock possède donc un potentiel thérapeutique très intéressant. La thermotolérance de tissus ou d'organes par hyperthermie ou par des moyens pharmacologiques peut être exploitée chez l'animal entier pour réduire les lésions dues à des traumatismes tels que l'ischémie-reperfusion, accompagnant souvent la chirurgie électorive et/ou la transplantation d'organes (Welch, 1992; Mestril et coll., 1994).

Différentes équipes ont tout d'abord vérifié, sur plusieurs modèles animaux, qu'une ischémie transitoire induit une synthèse rapide de protéines de choc thermique, essentiellement la forme inductible HSP70. Currie (1987) ainsi que Knowlton et ses collaborateurs (1991) ont étudié ce phénomène sur coeur isolé de rat et lapin, respectivement. D'autres travaux ont porté sur l'ischémie cérébrale (Nowak et coll., 1990; Binienda et Scallet, 1994). Le métabolisme anaérobie ainsi que le stress oxydatif sont donc des stimuli de la transcription des HSP (Myrmel et coll., 1994; Aucoin et coll., 1995).

Il a alors été observé qu'un prétraitement ischémique (in vitro, sur organe isolé) ou hyperthermique (in vivo) confère une résistance myocardique contre une ischémie-reperfusion (Yellon et Latchman, 1992; Marber et coll., 1993; Cornelusen et coll., 1994). Cette augmentation du rétablissement de la fonction ventriculaire post-ischémique ne serait associée à aucun changement du métabolisme énergétique (Currie et Karmazyn, 1990).

D'autres travaux ont mis en évidence une corrélation directe entre l'augmentation de la quantité de HSP induites et le degré de protection myocardique (Donnelly et coll., 1992; Hutter et coll., 1994). Lors de cette réponse heat shock, il a été observé une augmentation de l'activité de la catalase myocardique, un enzyme antioxydant (Currie et coll., 1988; Karmazyn et coll., 1990). Ce phénomène ne serait pas dû à une transcription supérieure de cet enzyme. Il semblerait plutôt que les HSP70 fixent et protègent les différentes sous-unités de la catalase lors de leur assemblage, ce qui rendrait cet enzyme plus stable durant la reperfusion du coeur. Ainsi, ces deux familles de protéines collaborent à la protection des cellules contre un stress oxydatif (Mestril et Dillmann, 1991; Mocanu et coll., 1993).

Certaines études ont même établi que la réponse heat shock permet de limiter la nécrose tissulaire (la taille de l'infarctus) après occlusion-reperfusion d'une artère coronaire

(Yellon et coll., 1992; Currie et coll., 1993; Walker et coll., 1993).

Par ailleurs, le phénomène de tolérance au stress peut être étendu à d'autres mécanismes pathologiques. Par exemple, un prétraitement hyperthermique réalisé sur des rats permet de protéger ces animaux contre un choc endotoxique (par injection d'un lipopolysaccharide bactérien) (Ryan et coll., 1992).

Enfin, des études sur le rôle protecteur des HSP vis-à-vis de la toxicité d'un cryoprotecteur sont en cours. Il semblerait qu'une hyperthermie préalable, réalisée sur animal entier, permette de protéger des cellules (vasculaires) contre la toxicité du 1,2-propanediol (un cryoprotecteur préservant les organes en vue d'une transplantation). L'application potentielle du rôle protecteur des HSP au domaine des greffes d'organes est à l'étude (Poussin et coll., 1995).

1.4.3. Rôle des HSP dans la réponse immunitaire

Les protéines de choc thermique ont aussi un rôle fondamental dans un tout autre domaine : l'immunologie. En effet, elles sont impliquées dans différents aspects de la réponse immune.

Les protéines de stress, exprimées de façon importante à la surface des cellules présentatrices de l'antigène ou des cellules tumorales, pourraient intervenir dans la réponse immune spécifique, soit comme antigène et l'immunité serait alors dirigée contre l'HSP, soit en présentant l'antigène (par fixation d'un peptide dérivant de cet antigène), soit enfin comme molécule intermédiaire nécessaire aux interactions entre les différentes cellules immunitaires (Jacquier-Sarlin et Polla, 1994).

D'autre part, une augmentation de la production des HSP a été observée après transformation cellulaire ou lors de la phagocytose. Ces protéines de stress constituent des antigènes potentiels pour l'activation des différentes populations lymphocytaires. La stimulation des lymphocytes T spécifiques des HSP pourrait amplifier la réponse immunitaire et participer à la surveillance immune, à l'élimination des cellules infectées, à la protection de l'organisme par immunité de vaccination, mais aussi intervenir dans des phénomènes d'auto-immunité par mimétisme moléculaire entre les HSP des pathogènes et celles de l'hôte. Des auto-anticorps dirigés contre leurs propres HSP ont été observés chez des patients atteints de maladies auto-immune comme la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux disséminé (Jacquier-Sarlin et Polla, 1994; Wynn et coll., 1994).

La stimulation de la réponse immune par les HSP interviendrait aussi dans la protection précoce au niveau des épithéliums.

Même si différentes questions concernant le rôle des protéines de stress dans la réponse immunitaire restent ouvertes, l'immunogénicité des HSP présente un intérêt thérapeutique non négligeable, aussi bien pour la vaccination que pour le traitement des cancers (Welch, 1992; Jacquier-Sarlin et Polla, 1994).

1.4.4. Rôle des HSP en oncogénèse

Nous avons vu (dans la partie 1.3., page 18) que les protéines de stress interviennent dans le transfert de polypeptides, du cytoplasme vers le noyau. De plus, différents oncogènes (comme l'antigène T du virus SV40 ou l'antigène tumoral p53) interagissent avec les HSP70. Certaines protéines de stress sont donc impliquées dans le transport nucléaire de protéines liées à la prolifération. Cependant, la surexpression des protéines de choc thermique peut avoir différentes conséquences. Dans certains cas, cela peut contribuer à la transformation de la cellule, en facilitant le transport nucléaire d'oncogènes. Dans d'autres cas, la formation de

complexes entre les HSP et les oncogènes pourrait, au contraire, défavoriser la transformation de la cellule (Bensaude, 1992b; Zhang et coll., 1992; Wynn et coll., 1994).

D'autres études ont révélé que certaines prostaglandines (A1, A2 et J2), douées d'une activité antiproliférative reconnue, induisent la synthèse des HSP dans les cellules humaines (Ohno et coll., 1988; Santoro et coll., 1989). Il a été démontré que l'effet antiprolifératif de ces prostaglandines est médié par les HSP70, après activation des facteurs HSF (Amici et coll., 1992; Holbrook et coll., 1992). Ces observations ont permis d'étendre les connaissances sur le mécanisme d'action des HSP qui ont un rôle régulateur dans de nombreux phénomènes physiologiques, notamment sur le contrôle de la production de fièvre.

1.4.5. Rôle des HSP en toxicologie

La réponse heat shock commence à être considérée comme un outil toxicologique, soit en utilisant des cultures cellulaires, soit sur des organismes entiers. En effet, il est logique que de nombreuses agressions environnementales (comme les polluants) induisent l'augmentation de l'expression d'une ou plusieurs protéines de stress.

Ainsi, le suivi de l'induction de HSP exprimées uniquement par des cellules lésées (exemple HSP72) peut être exploité dans le développement de nouveaux et rapides essais toxicologiques. Par exemple, un grand nombre de produits chimiques, cosmétiques ou agents tératogènes pourraient être testés sur des lignées cellulaires spécifiques, pour déterminer leur capacité à induire une réponse heat shock. De même, certains animaux (par exemple des poissons) pourraient être utilisés pour savoir si le taux de pollution d'un environnement particulier (comme un lac) est suffisant pour activer une réponse heat shock (Welch, 1992).

1.5. CONCLUSION SUR LES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE

La réponse heat shock représente un mécanisme évolutif conservé, par lequel les cellules réagissent et se défendent contre des changements brusques et hostiles de leur environnement.

Bien qu'elles soient exprimées en quantité relativement élevée dans les cellules lésées, la plupart des protéines de stress sont en fait synthétisées au cours de la croissance cellulaire normale et sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires vitaux. De plus, ces HSP ont un rôle central en facilitant la maturation cellulaire.

Même si certains soutiennent encore que la séquence primaire des acides aminés d'une protéine dicte sa structure tridimensionnelle, les nouvelles études sur les HSP montrent que le repliement et l'assemblage d'une protéine nécessitent la participation de composants supplémentaires : les chaperons moléculaires. Quand le chaos est introduit au niveau du processus de repliement, comme c'est le cas pour des cellules stressées, cela induit une augmentation de l'expression de ces chaperons moléculaires.

En fait, les protéines de choc thermique, qui ont un rôle cellulaire vital, présenteraient un large potentiel thérapeutique. Beaucoup d'espoirs reposent sur l'application du pouvoir protecteur des HSP en pathologie, par exemple lors d'une ischémie-reperfusion ou par régulation de l'activité antitumorale. Déjà considérées comme de nouveaux outils diagnostics, ces protéines font l'objet de nombreuses investigations, notamment en ce qui concerne leur implication dans la réponse immunitaire et les maladies auto-immunes.

2. MISE AU POINT DU MODELE D'HYPERTHERMIE

2. MISE AU POINT DU MODELE D'HYPERTHERMIE

2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE UTILISE

Pour cette étude nous avons utilisé des rats mâles, de souche Wistar, pesant de 250 à 350g. Les femelles ayant une trop importante variabilité hormonale n'ont pas été retenues.

2.2. LES DIFFERENTES METHODES D'INDUCTION DE L'HYPERTHERMIE

Il a été démontré par plusieurs travaux, qu'une synthèse appréciable de protéines de stress thermique est induite chez le rat chauffé à une **température interne** de **42°C**, maintenue pendant au minimum **15 minutes** (Currie et coll., 1988).

Différents modèles sont proposés dans la littérature pour atteindre la température interne souhaitée :

- Une enceinte chauffante est le moyen le plus utilisé pour réaliser une hyperthermie. Le rat est anesthésié par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50mg/kg de poids corporel). Il est muni d'une sonde thermique rectale permettant de contrôler sa température interne (Currie et coll., 1988). Un cathéter peut être placé dans sa veine fémorale ou pénienne, permettant d'effectuer des injections de sérum physiologique afin d'éviter une déshydratation lors du chauffage (Donnelly et coll., 1992).

- Dans d'autres études, l'hyperthermie est réalisée sur des animaux vigiles (non anesthésiés), placés de la même façon dans une enceinte chauffante (Kregel et coll., 1993).

- Des toxines virales ou bactériennes induisent aussi une hyperthermie, mais celle-ci s'accompagne de changements pathologiques et compensatoires non souhaitables. Cette

technique ne peut donc être utilisée dans notre étude (Damanhoury et Tayeb, 1992).

- Différentes substances comme l'amphétamine, l'atropine, la cocaïne, les phénothiazines et les agonistes calciques entraînent une augmentation de la température corporelle. Mais de nombreux facteurs affectent la biodisponibilité de la substance administrée, faisant varier l'augmentation de la température. De plus, l'induction d'une hyperthermie par une drogue s'accompagne d'autres effets liés à cette substance, qui peuvent affecter le processus d'induction de HSP.

Malgré tout, l'injection sous-cutanée d'amphétamine (10mg/kg) est utilisée pour atteindre une température rectale de 42°C pendant 60 minutes, induisant l'expression des gènes des HSP dans différents tissus (Lu et Das, 1993).

- L'exercice physique constitue aussi un moyen de développer une hyperthermie. L'augmentation de température dépend, dans ce cas, des mécanismes physiologiques de contrôle de la température ainsi que de la température environnante (Salo et coll., 1991; Damanhoury et Tayeb, 1992).

2.3. MISE AU POINT DU MODELE D'HYPERTHERMIE

Après avoir essayé différentes méthodes d'hyperthermie chez le rat, nous avons mis au point un modèle de chauffage adapté à notre étude.

Nous avons tout d'abord appliqué une méthode d'hyperthermie chez le rat anesthésié par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50mg/kg de poids corporel) et placé dans une enceinte chauffante. L'animal se trouve en position de décubitus dorsal et sa veine pénienne est cathétérisée pour les injections de sérum physiologique.

Cependant, nous avons constaté une mortalité très élevée suivant l'hyperthermie (60% des rats sont morts après chauffage).

Nous avons alors essayé de placer le rat, toujours anesthésié, en position latérale, et sans cathétérisme veineux. La mortalité restait élevée puisque 40% des rats chauffés sont morts.

L'activité dépressive sur le système respiratoire du pentobarbital sodique pourrait être à l'origine de cette forte mortalité. De plus, le risque d'une action potentielle de l'anesthésique sur l'induction de HSP, nous a conduit à abandonner cette méthode d'hyperthermie.

Le modèle d'hyperthermie que nous avons retenu utilise des rats non anesthésiés. L'animal vigile, muni d'une sonde thermique rectale (Testo Term, type 1100/7200/9200), est placé dans une couveuse infantile de type isolette de chez Narco, chauffée par l'intermédiaire d'une ampoule avicole de 100W.

Quand la température rectale de l'animal atteint 42°C, elle est maintenue pendant 20 minutes. L'utilisation d'une couveuse comme moyen de chauffage permet d'obtenir une température corporelle homogène, ainsi qu'une humidification suffisante.

Une injection intrapéritonéale de sérum physiologique est réalisée dès que la température rectale s'élève au-dessus de 42,2°C, car nous avons constaté que cette température est proche du seuil léthal.

Une fois le chauffage terminé, le rat est remplacé dans sa cage avec eau et nourriture.

La mortalité par ce modèle d'hyperthermie est acceptable : elle est proche de 6%.

Les animaux témoins, nécessaires à l'étude, sont munis de la même sonde thermique rectale et sont placés dans la couveuse non chauffée pendant 30 minutes.

**3. EFFET DE L'HYPERTHERMIE
SUR LA PRODUCTION DE HSP
AU NIVEAU DU COEUR**

3. EFFET DE L'HYPERTHERMIE SUR LA PRODUCTION DE HSP AU NIVEAU DU COEUR

Après avoir mis au point un modèle d'hyperthermie, nous avons étudié la capacité de ce modèle à induire une augmentation de synthèse de HSP au niveau du coeur, en comparaison avec des témoins non chauffés. En effet, un rat hyperthermié répond à ce stress par une synthèse accrue de HSP au niveau de ses différents organes, et nous avons tenté de visualiser ce phénomène au niveau du coeur.

Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à deux protéines de la famille des HSP70 (la famille la plus importante) : une protéine **constitutive**, **HSP73** et une protéine **induite**, **HSP72**. Ainsi qu'à une protéine de stress de **bas poids moléculaire** : **HSP27**.

Une électrophorèse, suivie d'une révélation par un western blot, a été utilisée pour mettre en évidence ces trois HSP au niveau du coeur (Lin et coll., 1994).

Cette étude a été réalisée sur cinq rats ayant subi une hyperthermie, ainsi que sur deux rats témoins (non chauffés).

3.1. REALISATION D'UNE EXTRACTION PROTEIQUE PREPARATIVE

3.1.1. Prélèvement du coeur

Vingt-quatre heures après avoir subi une hyperthermie, le rat est anesthésié par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50mg/kg), puis son coeur est prélevé (Hutter et coll., 1994). Ce prélèvement n'est effectué que 24h après l'hyperthermie car à ce moment l'augmentation de synthèse des HSP due au stress est maximale. Le taux de HSP décroît ensuite rapidement ce qui fait que cette réponse est transitoire.

Le coeur, lavé au sérum physiologique, est conservé à -80°C .

3.1.2. Préparation du tampon de lyse

50mg de coeur sont broyés dans l'azote avant d'être mis en suspension dans 10ml de tampon de lyse.

Ce tampon de lyse est préparé de la façon suivante :

Pour 100ml :

- NaCl, (PM=58,44),	à 150mM,	soit 0,880g
- EDTA, (PM=372,24),	à 5mM,	soit 0,186g
- Tris, (PM=121,1),	à 50mM,	soit 0,605g
- Triton,	à 1%,	soit 1g

Le pH est amené à 9 avant d'ajouter :

- DTT, (PM=153,3),	à 5mM,	soit 0,077g
--------------------	--------	-------------

Le DTT (Dithiothréitol) protège les groupes SH en les maintenant à l'état réduit.

Les antiprotéases s'opposant à une dégradation protéique par les protéases, sont ajoutées extemporanément. On utilise :

- du PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride), à 1mM
- de l'Aprotinine, à raison de 0,1µl/ml
- de la Leupeptine, à 2µM.

La suspension de cellules cardiaques est maintenue à 4 °C, sous agitation pendant 12h. Puis elle est passée aux ultrasons trois fois 15s et centrifugée à 10 000 tours/min, à 4 °C.

Par ce traitement, nous avons obtenu un **extrait protéique**. Les cellules cardiaques ont été dénaturées, libérant ainsi leurs protéines que l'on retrouve dans le surnageant récupéré et conservé à -80 °C.

3.2. SEPARATION DES PROTEINES DE STRESS PAR ELECTROPHORESE

L'électrophorèse est une méthode d'analyse qui utilise la propriété des molécules ionisées (protéines) de se déplacer à des vitesses différentes sous l'influence d'un champ électrique. Pour séparer les HSP, nous avons utilisé une électrophorèse unidimensionnelle en gel de polyacrylamide, qui associe à la séparation des macromolécules en fonction de leur charge, une séparation en fonction de leur poids moléculaire (Andrews, 1986).

3.2.1. Préparation du gel d'acrylamide

Nous avons préparé tout d'abord le gel permettant la migration et la séparation des protéines (ou running gel) sur lequel nous avons déposé un gel visant à concentrer les protéines avant leur migration (ou stacking gel).

* Préparation du gel de séparation

Nous avons dû faire un compromis en ce qui concerne la concentration en acrylamide du gel. En effet, une forte concentration est nécessaire pour faire migrer les protéines de bas poids moléculaire; alors que le gel ne doit pas être trop concentré en acrylamide si l'on veut obtenir une bonne résolution entre la forme constitutive et la forme induite des HSP70. Nous avons choisi d'utiliser un gel de séparation à 12,5% en acrylamide, nous permettant de distinguer HSP27, HSP72 et HSP73.

Composition de ce gel :

Pour 30ml :

- Acrylamide 30%	12,5ml
- Bis-acrylamide 1%	3,0ml
- Tris-HCl, à 1 M, pH 8,8	11,2ml
- SDS 20%	150 μ l
- H ₂ O	3,0ml
- APS 10%	100 μ l
- TEMED	10 μ l

(voir solutions détaillées en annexe 1, page 51).

Après 1h, le gel de séparation est obtenu par polymérisation d'un monomère principal, l'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), et d'un monomère de liaison, le NN'méthylène bis acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). La gélification se produit en présence d'un catalyseur, le NNN'N'tétraméthyléthylènediamine ($[(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2]_2$ ou TEMED) et d'un antioxydant, le persulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ou APS).

* Préparation du gel de concentration

Ce gel, qui permet de concentrer les protéines avant qu'elles ne migrent dans le gel de séparation, comporte une concentration en acrylamide de 5%.

Composition du gel de concentration :

Pour 20ml :

- Acrylamide 30%	3,34ml
- Bis-acrylamide 1%	2,60ml
- Tris, à 1 M, pH 6,8	2,50ml
- SDS 20%	100 μ l
- H ₂ O	11,4ml
- APS 10%	200 μ l
- TEMED	10 μ l

(voir solutions détaillées en annexe 1, page 51)

Cette solution est versée directement sur le gel de séparation. Après mise en place du peigne, la polymérisation du gel de concentration s'effectue en 15 minutes.

La différence de pH entre le gel de séparation (pH 8,8) et le gel de concentration (pH 6,8) contribue à une meilleure concentration des protéines avant leur migration.

3.2.2. Migration des extraits protéiques

Quatre-vingts microlitres de l'extrait protéique obtenu au paragraphe 3.1.2. (Page 29) sont additionnés de vingt microlitres de SDS 20%, puis portés à ébullition pendant 15 minutes. Ce chauffage permet la dénaturation des protéines en oligomères qui migreront plus facilement.

Le gel d'acrylamide est installé dans une cuve où est ajouté le tampon de migration constitué de Tris-glycine et de SDS à 0,1%/l (annexe 1, page 51).

Dans la première fente du gel de concentration sont déposés des marqueurs qui sont extraits de cellules HELA et expriment HSP27 et HSP70. Ils serviront de contrôles. Dans les autres fentes, est déposé un extrait (100 μ l) provenant des cinq rats hyperthermiés et des deux rats témoins. Un courant électrique de 100V est alors appliqué au gel de séparation, puis de

40mA par gel.

La migration va commencer. Le dodécylsulfate de sodium ($C_{12}H_{25}NaSO_4$ ou SDS) permet aux oligomères d'être dissociés en leurs sous-unités, par ailleurs il s'ionise en $C_{12}H_{25}SO_4^-Na^+$. Les chaînes polypeptidiques lient $C_{12}H_{25}SO_4^-$ sur leur partie hydrophile, et Na^+ sur leur partie hydrophobe, formant ainsi des complexes protéine-SDS.

Dans le champ électrique appliqué, ces complexes migrent de la **cathode** (négative) vers l'**anode** (positive), en fonction de leur **poïds moléculaire**. Leur vitesse de migration étant inversement proportionnelle à leur poids moléculaire, les HSP27 migreront plus rapidement que les HSP70. La migration dure de 4 à 5h, puis le gel de concentration est éliminé.

3.3. IDENTIFICATION DES HSP PAR WESTERN BLOTTING

Un Western blot représente le transfert des protéines contenues dans le gel de séparation sur une feuille de nitrocellulose, suivi d'une immunodétection des différentes HSP.

3.3.1. Réalisation du transfert des HSP sur nitrocellulose

Le gel de séparation est préalablement trempé pendant 15min dans une solution de Tris-glycine à 20% de méthanol (annexe 1, page 51). Puis le transfert des protéines est réalisé dans une cassette de la façon suivante : sur une plaque chargée négativement (la cathode) sont superposées deux feuilles de papier Whatman (3mm), puis le gel, puis une feuille de nitrocellulose (Optitran BAS 85, $0,45\mu m$), et à nouveau deux feuilles de papier Whatman. Enfin, une plaque chargée positivement (l'anode) recouvre l'ensemble.

Le transfert des protéines (chargées négativement) sur la nitrocellulose se fera de la cathode vers l'anode, par l'application d'un courant de 30V, pendant 12h.

La nitrocellulose est ensuite récupérée et incubée pendant 2h, sous agitation, dans une solution de TBS-A (tampon salin, annexe 2, page 52) à 0,1 % de Tween (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) contenant 5% de lait en poudre. Le lait va saturer les sites non spécifiques de la nitrocellulose. Un rinçage par une solution de TBS-A à 0,1% de Tween dégraisse la nitrocellulose pour enlever l'excès de lait, deux fois 10min.

3.3.2. Révélation des HSP 73, 72 et 27 par ECL Western blotting

Un ECL (Enhanced Chemiluminescence) Western blot est une méthode de détection d'antigènes spécifiques, conjugués directement ou indirectement avec des anticorps marqués par une peroxydase, basée sur une émission de lumière (Johnstone et Thorpe, 1982).

Cette méthode nous a permis de révéler les différentes HSP qui sont reconnues comme des antigènes.

* La feuille de nitrocellulose est incubée avec le premier anticorps, pendant 1h :

- Pour les HSP72 et 73 on utilise un **anticorps anti-HSP70 monoclonal** de souris (SPA-810, Stress Gen Biotechnologie), qui est une immunoglobuline G1.
- Pour les HSP27 on utilise un **anticorps anti-HSP27 polyclonal** de lapin (SPA-801, SGB).

On lave la nitrocellulose pour éliminer l'excès d'anticorps, par une solution de TBS-A à 0,1% de Tween, une fois 15min puis trois fois 5min. Seuls subsistent les anticorps fixés sur les différentes HSP.

* La nitrocellulose est alors incubée avec le second anticorps, pendant 45min :

- Pour les HSP72 et 73 on utilise un **anticorps anti-souris**.
- Pour les HSP27 on utilise un **anticorps anti-lapin**.

Le second anticorps est en fait un anticorps anti-anticorps : il va se fixer sur le premier anticorps. De plus, il porte un enzyme : la peroxydase. De la même façon la nitrocellulose est lavée pour éliminer l'excès de second anticorps.

* Puis la feuille de nitrocellulose est mise à tremper dans une solution (Kit ELC, RPN 2106, Amersham), en agitant. Cette solution contient du luminol qui est un substrat de la peroxydase, un peracide, ainsi que du phénol.

La peroxydase, fixée sur le second anticorps, est sous sa forme oxydée par action du peracide. Elle transforme le luminol en produit oxydé qui est dans un état excité, et qui revient à son état fondamental en émettant de la lumière. Cette réaction chimique est potentialisée par le phénol (Figure 2).

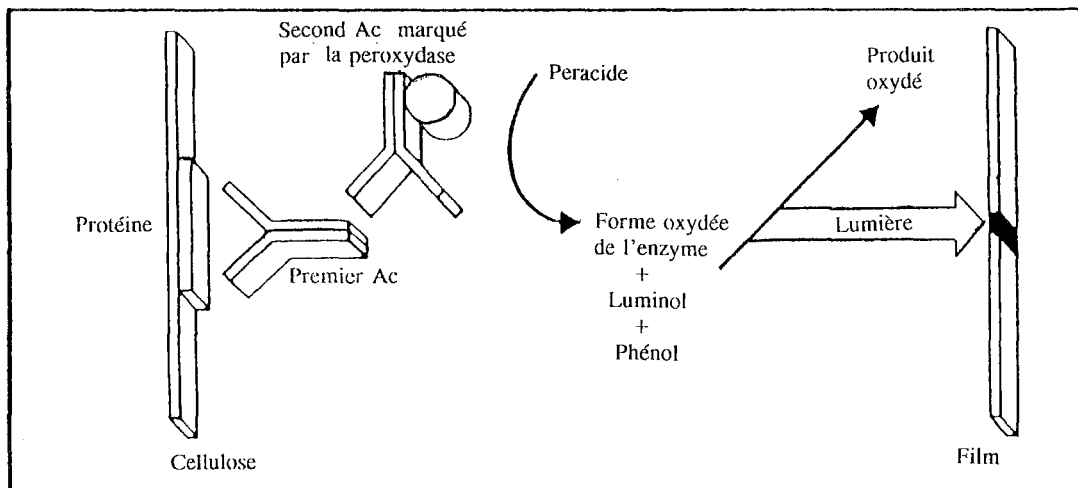


Figure 2. Principe de l'ECL Western blotting.

La chimioluminescence obtenue est maximale à la longueur d'onde de 428nm, après 10min, puis elle décroît avec une demi-vie de 60min.

Elle sera détectée par exposition d'un film autoradiographique, dans une chambre noire. Le temps d'exposition est de 1min pour les HSP70, et de 5min pour les HSP27. Le film sera ensuite révélé, rincé, puis fixé.

Par cette méthode, nous avons réalisé l'identification spécifique des HSP72, 73 et 27, qui apparaissent sous forme de raies sombres (annexe 3, page 53).

3.4. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF DES HSP

Après avoir identifié les différentes HSP, un dosage semi-quantitatif de ces protéines peut être réalisé, par comparaison avec le taux de protéines total contenu dans le coeur.

3.4.1. Dosage des protéines cardiaques par la méthode de Bradford

La totalité des protéines contenues dans chacun des extraits protéiques (obtenus au paragraphe 3.1.2., page 29) est dosée par la méthode de Bradford. Cette méthode utilise un colorant, le bleu brillant de Coomassie (de couleur brun orangé), qui a la propriété de changer de teinte quand il se lie aux groupes aminés protonés d'une protéine (il vire au bleu).

Après une digestion dans de la soude 1N, pendant 24h, les extraits protéiques sont additionnés d'une solution (Bio-rad) contenant :

- Bleu brillant de Coomassie	50mg
- Ethanol	25ml
- Acide phosphorique	50ml
- Eau	425ml

L'absorbance du bleu de Coomassie lié aux protéines est lue au spectrophotomètre ultra-violet à 595nm.

Par comparaison avec une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'albumine bovine, nous obtenons la valeur de la concentration protéique de chaque extrait.

3.4.2. Révélation du profil protéique de chaque extrait par un gel coloré au bleu de Coomassie

En parallèle avec l'électrophorèse permettant l'identification des HSP, nous réalisons une seconde électrophorèse, strictement dans les mêmes conditions, dans le but de révéler toutes les protéines contenues dans chaque extrait déposé, c'est-à-dire d'obtenir leur profil protéique complet.

Comme au paragraphe 3.2.2. (page 32), les extraits protéiques déposés migrent pendant cinq heures, puis le gel est trempé dans une solution contenant le bleu de Coomassie (Annexe 1, page 51). Ce colorant se fixe sur les protéines (il vire au bleu) puis son excès est éliminé par lavage du gel dans une solution d'acide acétique et de méthanol.

Nous obtenons ainsi un gel coloré au bleu de Coomassie révélant toutes les protéines contenues dans les cellules cardiaques (Annexe 4, page 54).

3.4.3. Dosage semi-quantitatif des HSP par densitométrie

Ce dosage n'a pas été effectué, car le gel au bleu de Coomassie n'a pu être exploité pour cause de mauvais séchage. Cependant, sa réalisation se déroule de la façon suivante :

Un densitomètre (relié à un intégrateur) permet d'obtenir l'intensité de coloration des

différentes HSP par rapport à celle de la totalité des protéines, pour chacun des extraits déposés. Cela est réalisé par balayage de chaque bande du gel au bleu de Coomassie.

Comme la totalité des protéines contenues dans chaque extrait a été dosée (paragraphe 3.4.1., page 36), cela permet d'exprimer le taux de HSP par rapport au taux de protéines total.

Des expériences en cours, réalisées sur aorte de rats hyperthermiés, ont montré que le taux de HSP70 est sept fois supérieur à celui obtenu sur aorte de rats témoins. De même, l'hyperthermie induit un taux de HSP27 aortiques trois fois supérieur à celui des animaux témoins (Poussin et coll., 1995).

3.5. ANALYSE DES RESULTATS ET CONCLUSION

Le gel coloré au bleu de Coomassie (Annexe 4, page 54) révèle le profil protéique contenu dans les cellules cardiaques. Malgré l'impossibilité d'exploiter ce gel, il permet de vérifier que l'extraction protéique à partir des cellules cardiaques a bien été réalisée (contrairement aux cellules aortiques, dont les protéines n'ont presque pas été extraites).

D'autre part, le film obtenu au paragraphe 3.3.2. (Annexe 3, page 53) révèle la présence des HSP73 (forme constitutive), HSP72 (forme induite), et des HSP27, au niveau du coeur.

Il apparaît nettement que la forme constitutive des HSP70 (HSP73) est présente dans les coeurs témoins ainsi que dans les coeurs ayant subi une hyperthermie. En revanche, la forme induite, HSP72, est absente des coeurs témoins, alors qu'elle est exprimée par les coeurs chauffés. L'hyperthermie a donc bien induit une synthèse de HSP72.

De plus, les HSP27 sont davantage visibles chez les rats chauffés que chez les rats témoins (toujours au niveau du coeur).

Même si nous n'avons pas dosé semi-quantitativement les différentes HSP cardiaques, nous pouvons conclure que le modèle d'hyperthermie utilisé (partie 2.3., page 26) a bien provoqué une augmentation de synthèse des protéines de choc thermique, vingt-quatre heures après.

**4. EFFET DE L'HYPERTHERMIE
SUR LES RECEPTEURS
BETA-ADRENERGIQUES
CARDIAQUES**

4. EFFET DE L'HYPERTHERMIE SUR LES RECEPTEURS BETA-ADRENERGIQUES CARDIAQUES

L'hyperthermie, comme de nombreux autres stress, entraîne une élévation du taux des catécholamines au niveau de différents tissus (notamment le coeur), chez le rat vigile. Cela provient de l'augmentation d'activité du système nerveux sympathique (Henry, 1993; Kregel et coll., 1993).

Partant de ces observations, nous avons émis l'hypothèse qu'une augmentation des catécholamines au niveau du coeur se traduirait par une désensibilisation de cet organe vis-à-vis de ces substances.

Nous avons quantifié les récepteurs β -adrénergiques cardiaques, dont les catécholamines sont agonistes, pour mettre en évidence une éventuelle modification de leur nombre et/ou de leur affinité vis-à-vis des catécholamines. Une méthode de fixation de ligand radioactif (ou binding) sur les récepteurs β -adrénergiques, in vitro, nous a permis de les quantifier.

4.1. QUANTIFICATION DES RECEPTEURS BETA-ADRENERGIQUES PAR FIXATION D'UN LIGAND RADIOACTIF IN VITRO

4.1.1. Préparation du tissu cardiaque

Pour explorer l'hypothèse d'une désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques cardiaques suite à une hyperthermie, nous avons choisi d'étudier ce phénomène 24h après l'hyperthermie car c'est à ce moment que l'augmentation de synthèse des HSP est maximale et que sont réalisées les études de thermotolérance.

Cette étude porte sur cinq rats hyperthermiés ainsi que sur cinq rats témoins n'ayant subi aucun chauffage.

Le prélèvement du coeur s'effectue donc 24h après l'hyperthermie, sur le rat anesthésié au pentobarbital sodique (50mg/kg, par voie intrapéritonéale).

Les oreillettes sont éliminées, dans le but d'obtenir sur les ventricules des résultats plus reproductibles.

* Les ventricules sont alors hachés en petits morceaux dans 20ml d'une solution tampon de Tris à 50mM préparée de la façon suivante :

- Préparation d'une solution de Tris acide (Chlorure de Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane) : 15,76g/2l d'eau,
- Préparation d'une solution de Tris base (Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane) : 3,03g/0,5l,
- Addition du Tris base au Tris acide jusqu'à l'obtention d'un pH de 7,4.

* La suspension obtenue est broyée au polytron, à vitesse 3, deux fois 10s, sur glace.

* Puis elle est centrifugée 10min, à 1500 tours/min, à 4 °C.

* Le surnageant est à nouveau centrifugé 10min, à 18 000 tours/min, à 4 °C.

* Le culot est décollé par 30ml de Tris puis passé au polytron, à vitesse 3, 10s.

* Après une dernière centrifugation de 10min, à 18 000 tours/min, le culot obtenu est décollé avec 15ml de Tris.

* Il sera passé au polytron, à vitesse 3, 10s.

* L'homogénat obtenu est complété à 20ml par du Tris puis conservé dans de la glace.

Ces différentes opérations permettent l'obtention d'un **homogénat de membranes cellulaires**, par lyse des cellules cardiaques. Car c'est au niveau membranaire que se trouvent les récepteurs β -adrénergiques que l'on veut quantifier.

4.1.2. Fixation d'un ligand radioactif sur les récepteurs β -adrénergiques

Nous avons choisi le [^3H]CGP 12177 (\pm)-4-(3-Ter-butylamino-2-hydroxypropoxy)-benzimidazol-2-one tritié) comme ligand radioactif des récepteurs β -adrénergiques. En effet, plusieurs travaux réalisés avec ce ligand ont montré qu'il remplit les caractéristiques essentielles d'un marqueur de récepteurs membranaires, à savoir :

- haute hydrophilie
- bonne sélectivité
- haute affinité avec une faible fixation non spécifique
- constante de dissociation (K_d) pour les membranes du coeur de l'ordre de 0,2 à 0,3nM, (Carpéné et coll. 1992).

Le [^3H]CGP 12177 est un agoniste β -adrénergique non sélectif, c'est-à-dire qu'il fixe aussi bien le sous-type β_1 que le β_2 . Mais, compte tenu du fait que ce ligand est plus spécifique des récepteurs β_1 , et sachant que 80% des récepteurs β ventriculaires sont de sous-type β_1 , nous considérons que nous dosons uniquement **les récepteurs β_1 -adrénergiques** (Watson-Wright et coll. 1989).

Le [^3H]CGP 12177 possède une radioactivité spécifique élevée (46 Ci/mmole), ce qui permet d'utiliser de faibles concentrations et de diminuer la fixation non spécifique.

* L'homogénat de membranes, obtenu précédemment, est incubé avec des concentrations croissantes de [^3H]CGP 12177 : 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1, et 1,5nM.

Le milieu d'incubation, pour chaque concentration de la gamme, se compose de :

- Tris	50 μ l
- Tris-MgCl ₂ , à 140mM	50 μ l
- [³ H]CGP 12177	100 μ l
- Homogénat	500 μ l

Le Tris-MgCl₂ (à 10mM finale) apporte du magnésium qui a pour rôle de modifier la conformation tridimensionnelle du récepteur, ce qui rend la liaison ligand-récepteur optimale.

* L'incubation est réalisée pendant 30min, à 37° C.

* Le complexe [³H]CGP 12177-récepteur β_1 est ensuite séparé du [³H]CGP 12177 libre, par filtration. Cette phase est accompagnée d'un rinçage du filtre (GF/B, diamètre 25mm, Whatman) par 15ml de Tris pour éliminer tout le ligand radioactif libre, c'est-à-dire non fixé aux récepteurs β_1 -adrénergiques.

Le filtre ayant retenu les complexes radioactifs ligand- récepteur, est plongé dans 10ml de scintillant (Insta-gel, Packard). Ce dernier a pour rôle de rendre quantifiable le rayonnement β^- émis par le CGP tritié. La radioactivité correspondant au nombre de récepteurs β_1 ayant fixé le [³H]CGP, est déterminée par un compteur Minaxa Tri-CARB Packard.

Cependant, cette radioactivité correspond à la fixation spécifique du [³H]CGP (sur les récepteurs β_1 -adrénergiques) ainsi qu'à sa fixation non spécifique (ailleurs que sur les sites étudiés).

L'évaluation de la fixation non spécifique du [³H]CGP se fera par ajout du **propranolol**, antagoniste spécifique des récepteurs β -adrénergiques, qui, à fortes concentrations (10 μ M), va déplacer uniquement la liaison spécifique du [³H]CGP aux récepteurs β .

* L'homogénat de membranes est incubé, de la même façon que précédemment, avec des concentrations croissantes de [³H]CGP 12177, mais en présence de propranolol à 10 μ M finale.

Pour chaque concentration de la gamme, le milieu d'incubation est composé de :

- Propranolol, à 140 μ M	50 μ l
- Tris-MgCl ₂ , à 140mM	50 μ l
- [³ H]CGP 12177	100 μ l
- Homogénat	500 μ l

* L'incubation est aussi réalisée pendant 30min, à 37 °C.

* Puis le complexe [³H]CGP 12177-récepteurs β_1 est séparé de la même façon du [³H]CGP libre, par filtration puis rinçage du filtre.

* La radioactivité présente sur le filtre est déterminée, elle correspond à la fixation non spécifique du [³H]CGP.

Par différence entre la radioactivité correspondant à la fixation spécifique et non spécifique du [³H]CGP (BT), et la radioactivité enregistrée en présence du propranolol (correspondant à la liaison non spécifique du [³H]CGP, ou BNS), nous pouvons déterminer la fixation spécifique du [³H]CGP 12177 (BS) sur les récepteurs β_1 -adrénergiques (Figure 3, page suivante).

Soit : $BS = BT - BNS$

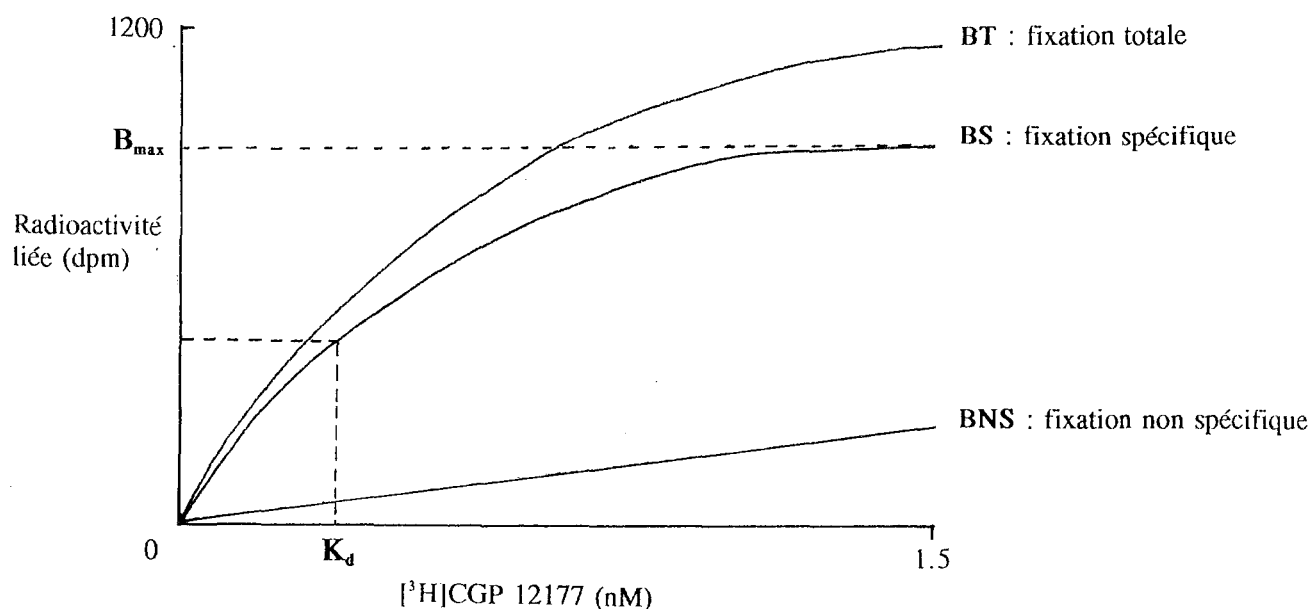


Figure 3. Fixation du [³H]CGP 12177 sur les récepteurs β_1 -adrénergiques ventriculaires d'un rat témoin.

4.2. RESULTATS OBTENUS ET LEUR ANALYSE

4.2.1. Résultats obtenus chez les rats hyperthermiés et chez les rats témoins

* Nous avons quantifié le nombre de récepteurs β_1 -adrénergiques ventriculaires (c'est-à-dire la capacité de fixation maximum du [³H]CGP ou B_{max}) chez cinq rats ayant subi une hyperthermie 24h auparavant, ainsi que sur cinq animaux témoins (Tableau 2, page suivante).

Ces résultats sont exprimés par rapport à la masse de protéines contenues dans les ventricules, pour les corrélérer entre eux en éliminant les différences de densité protéique d'un coeur à l'autre.

Pour cela, les protéines ventriculaires ont été dosées dans chaque homogénat de membranes, par la méthode de Bradford explicitée dans la partie 3.4.1. (page 36).

* La constante de dissociation apparente du ligand (K_d), dont l'inverse traduit son **affinité** pour le récepteur, a aussi été calculée (Tableau 2, ci-après).

	TEMOINS	HYPERTHERMIÉS
B_{max} (fmol/mg)	45,3 ± 12,9	59,4 ± 32,5
K_d (10^{-10} M)	3,3 ± 2,4	5,8 ± 4,6

Tableau 2. Effets d'une hyperthermie préalable sur le B_{max} et le K_d apparent du [3 H]CGP 12177 vis-à-vis des récepteurs β_1 -adrénergiques. Les résultats sont exprimés en variations moyennes (\pm S.E.M.).

Les graphes obtenus sont exposés en annexe 5 (Figures 4 et 5, page 55) pour les rats témoins, et en annexe 6 (Figures 6 et 7, page 56) pour les rats hyperthermiés.

4.2.2. Analyse des résultats précédents

* Par l'application d'un test non paramétrique de Mann et Whitney, nous constatons que les valeurs de B_{max} obtenues chez les rats hyperthermiés ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$) de celles obtenues chez les rats témoins.

* De même les valeurs de K_d obtenues chez les rats hyperthermiés ne diffèrent pas significativement ($p < 0,05$, test de Mann et Whitney) de celles obtenues chez les animaux témoins.

Cependant, nous considérons que nous ne pouvons tirer aucune conclusion relative aux effets d'une hyperthermie sur une variation éventuelle du nombre de récepteurs β_1 -adrénergiques cardiaques (B_{max}) ou sur une modification de leur affinité (inverse du K_d). En effet, les effectifs d'animaux stressés et témoins sont insuffisants et les résultats obtenus sont trop hétérogènes pour permettre leur analyse.

Il serait nécessaire d'approfondir cette étude en poursuivant les expériences sur rats hyperthermiés et sur rats témoins, pour pouvoir conclure.

4.3. CONCLUSION ET DEVELOPPEMENT

Même si les résultats obtenus ne sont que préliminaires, la réalisation de cette étude nous a permis de nous familiariser avec la technique de fixation de ligand radioactif sur les récepteurs bêta cardiaques, in vitro.

Par ailleurs, il serait intéressant de compléter cette étude par le dosage sanguin et tissulaire du taux de catécholamines, avant, pendant et après chauffage de l'animal.

Les prélèvements sanguins, pour le dosage des catécholamines circulantes, seraient effectués, chez le rat, au moyen de cathéters artériels et veineux chroniques (mis en place 24h avant l'hyperthermie). Les prélèvements tissulaires seraient effectués sur le coeur et le muscle.

Le dosage des catécholamines dans ces différents prélèvements pourrait être réalisé par chromatographie liquide haute pression (HPLC).

Le suivi de l'augmentation du taux de catécholamines due à l'hyperthermie pourrait nous renseigner sur le moment adéquat du prélèvement du coeur, pour l'observation d'une hypothétique désensibilisation de cet organe (par diminution du nombre de récepteurs β -adrénergiques membranaires et/ou par diminution de l'affinité de ces récepteurs vis-à-vis des catécholamines).

CONCLUSION

CONCLUSION

Le modèle d'hyperthermie mis au point dans cette étude s'est avéré efficace. En effet, l'identification spécifique des différentes HSP cardiaques a révélé la capacité de ce modèle à induire une augmentation de synthèse des protéines de choc thermique. La caractérisation de ce modèle pourrait être approfondie par le dosage semi-quantitatif des HSP produites.

Nous pouvons envisager d'utiliser une hyperthermie dans différentes études relatives aux protéines de choc thermique.

Par exemple, l'étude du pouvoir protecteur des HSP vis-à-vis de la toxicité de diverses substances (comme les cryoprotecteurs), ou encore la recherche d'inhibiteurs potentiels de la synthèse de HSP, nécessitent l'induction de protéines de stress par les cellules.

De plus, un préconditionnement hyperthermique pourrait être employé afin d'étudier l'effet protecteur des HSP lors de l'ischémie-reperfusion d'un organe, par analyse des arythmies de reperfusion dans le coeur, ou par mesure de la zone infarctée cardiaque ou cérébrale.

Comme nous l'avons signalé, l'étude des effets de l'hyperthermie sur les récepteurs β -adrénergiques cardiaques mériterait d'être poursuivie, et approfondie par le dosage des catécholamines circulantes et tissulaires, car il est certain que l'activation du système nerveux sympathique par choc thermique devrait se répercuter sur ces paramètres.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier les modifications du métabolisme cellulaire, induites par le choc thermique. Comme nous l'avons vu, il semblerait que la synthèse des HSP dépende essentiellement de la diminution du taux d'ATP intracellulaire. L'exploration de cette hypothèse impliquerait le dosage des taux d'ATP, d'ADP et d'AMP intracellulaires (par chromatographie liquide haute pression). De même, les dosages du calcium et du

glycogène intracellulaires pourraient être réalisés.

On comprend pourquoi les protéines de choc thermique font actuellement l'objet de multiples recherches. La compréhension des mécanismes par lesquels l'agression est détectée par la cellule et l'information transmise au système transcriptionnel demeure un objectif majeur.

Et si le rôle des HSP, impliquées dans différents phénomènes physiopathologiques, reste encore à éclaircir, beaucoup d'espoirs reposent sur l'application du pouvoir protecteur des protéines de choc thermique, dans divers domaines médicaux.

ANNEXES

ANNEXES

GEL STOCK SOLUTIONS

All gel stock solutions filtered through Millipore 0.45 μ m.

Separating Gel Buffer - 1M Tris pH 8.8 at 25°C

24.6g Tris-HCl (MW 158)
102.6g Tris-base (MW 121.1) Store at 4°C.

Make to 1 liter.

Stacking Buffer - 1M Tris pH 6.8 at 25°C

121.1g Tris-base
+ HCl adjust pH to 6.8 Store at 4°C.

Make to 1 liter.

20% SDS (sodium dodecyl sulfate)

20 grams of ultrapure SDS
dissolved in distilled water Store at room temperature.
and volume brought to 100 ml.

30% Acrylamide

300 grams of ultrapure acrylamide
dissolved in distilled water Store at 4°C in dark.
and the volume brought to 1 liter.

1% Bis-Acrylamide (N,N'-methylene bis-acrylamide)

5 grams of ultrapure bis-acrylamide dissolved in Store at 4°C in dark.
distilled water and the volume brought to 0.5l.

10x Electrode Buffer Stock (4 liters) \neq Tris-glycine

577g glycine
121.0g Tris-base Store at room temperature.
Make to 4 liters.

Electrode Buffer (made from 10x)

400ml 10x running buffer
20ml 20% SDS Final concentrations: 192mM glycine
Make to 4 liters with H₂O. 25mM Tris
pH ~8.3

Gel Stain-Coomassie Blue

1.5 gram Coomassie Blue
500 ml methanol (absolute) dissolve dye in methanol first
500 ml H₂O
100 ml acetic acid (glacial acetic acid)
stain 2-3 hr room temperature
Final concentrations: 0.15% Coomassie blue
50% methanol
10% acetic acid

Annexe 1. Solutions utilisées pour l'électrophorèse des HSP.

TBS-A 10X

pour 1 litre:

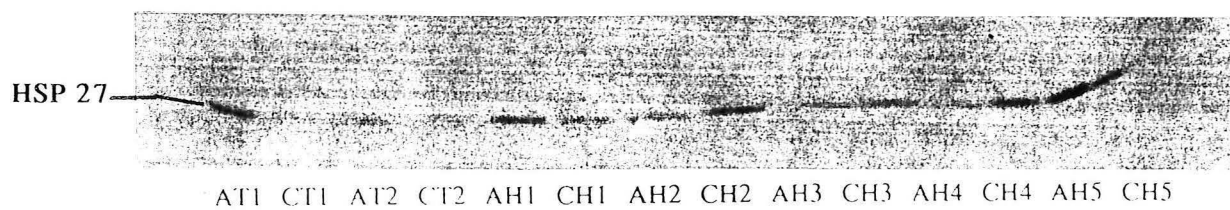
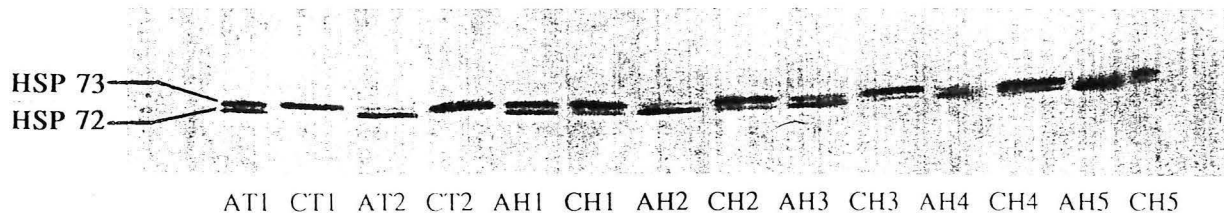
Tris	24,2 g	200 mM
NaCl	80 g	1,37 M

ajuster à pH 7,6 avec HCl 12 M.

compléter avec de l'eau U.P. à 1000 ml

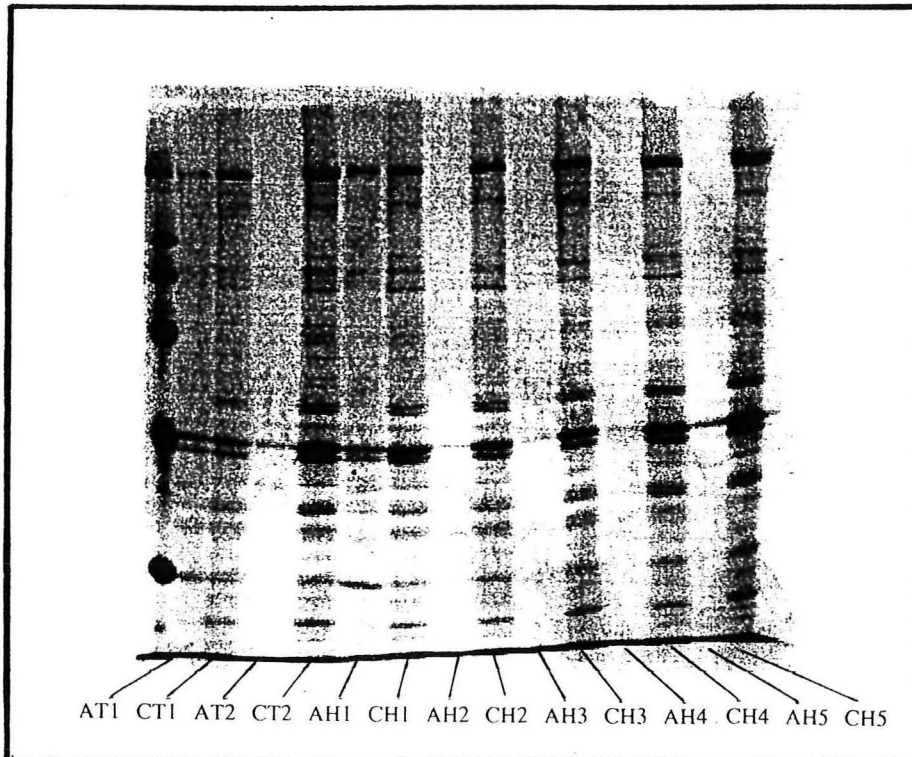
Solution de travail: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; NaCl 137 mM.

Annexe 2. Solution utilisée pour la révélation des HSP.



A : aorte
C : coeur
T : rat témoin
H : rat hyperthermié

Annexe 3. Film révélant la présence des HSP 73, 72 et 27 dans le coeur de rat



A : aorte
 C : coeur
 T : rat témoin
 H : rat hyperthermié

Annexe 4. Gel coloré au bleu de comassie révélant le profil protéique des cellules cardiaques chez le rat.

Annexe 5. Fixation du [^3H]CGP 12177 sur les récepteurs bêta cardiaques et représentation de Scatchard, chez le rat témoin.

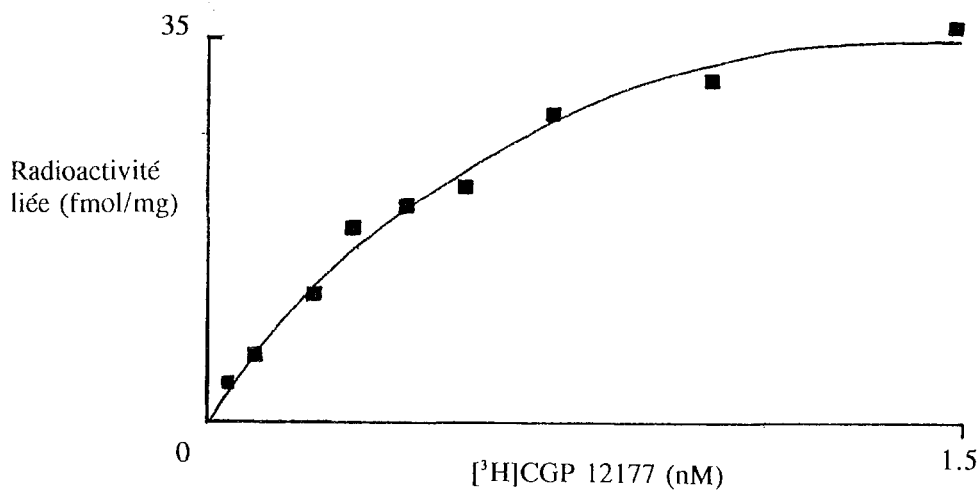


Figure 4. Fixation du [^3H]CGP 12177 sur les récepteurs β_1 -adrénergiques cardiaques, chez le rat témoin.

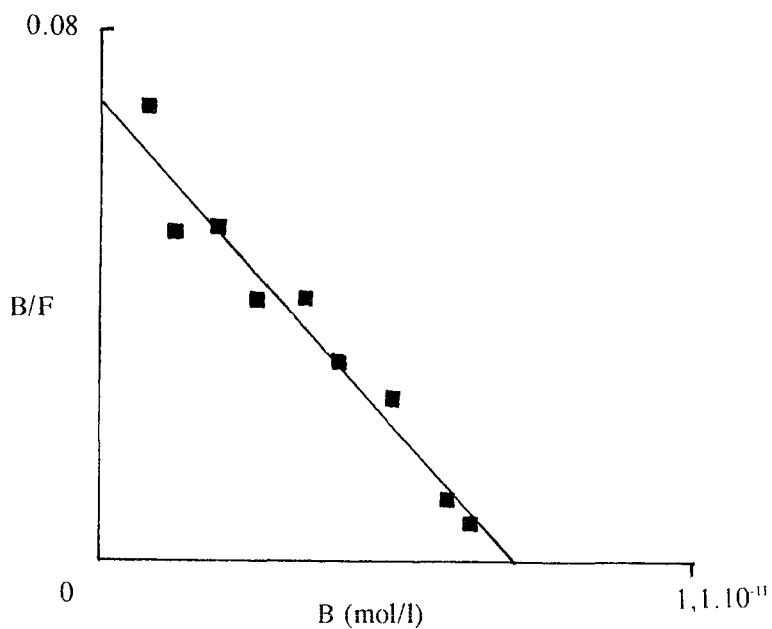


Figure 5. Représentation de Scatchard de la fixation de [^3H]CGP 12177 sur les récepteurs β_1 -adrénergiques d'un coeur de rat témoin.

Annexe 6. Fixation du [^3H]CGP 12177 sur les récepteurs bêta cardiaques et représentation de Scatchard, chez le rat hyperthermié.

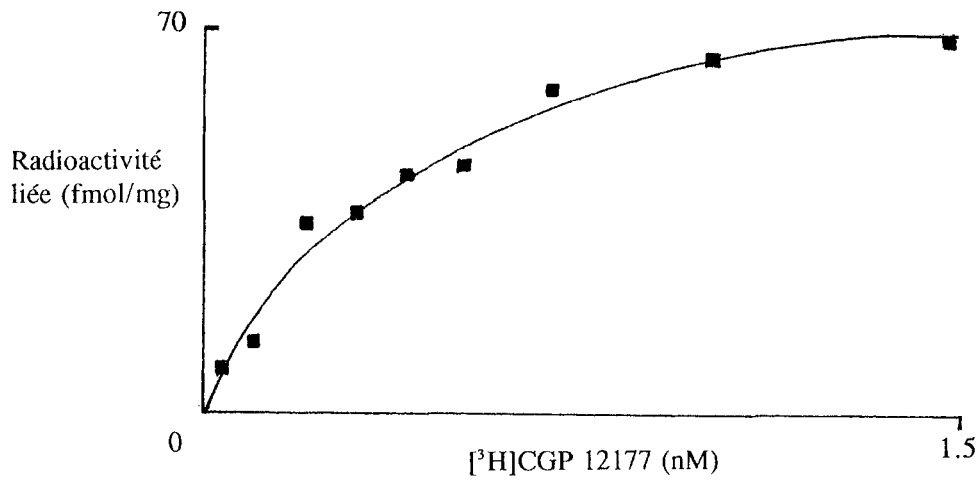


Figure 6. Fixation du [^3H]CGP 12177 sur les récepteurs β_1 -adrénergiques cardiaques, chez le rat hyperthermié.

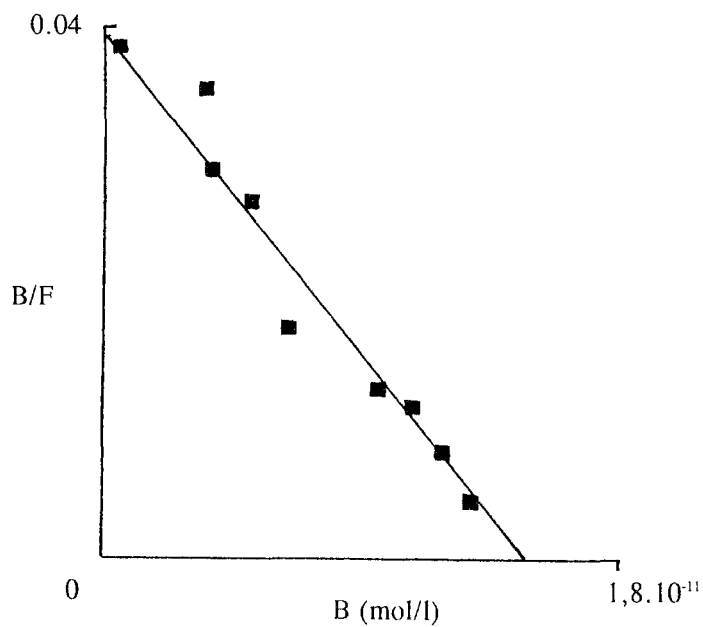


Figure 7. Représentation de Scatchard de la fixation de [^3H]CGP 12177 sur les récepteurs β_1 -adrénergiques d'un coeur de rat hyperthermié.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amici C., Sistonen L., Santoro M.G, Morimoto R.I. : Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, **89** : 6227-6231.

Andrews A.T. : Electrophoresis : theory, techniques and biochemical and clinical applications.

Second edition in Monographs on Physical Biochemistry, edited by Peacock AR and Harrington WR, *Oxford Science Publications*, 1986.

Aucoin M.M., Barhoumi R., Kochevar D.T., Granger H.J., Burghardt R.C. : Oxydative injury of coronary venular endothelial cells depletes intracellular glutathione and induced HSP 70 mRNA.

Am. J. Physiol., 1995, **268** : 1651-1658.

Beckmann R.P., Lovett M., Welch W.J. : Examining the function and regulation of hsp70 in cells subjected to metabolic stress.

J. Cell. Biol., 1992, **6** : 1137-1150.

Bensaude O. : Initiation interne de la traduction et stress cellulaire : des infections virales au choc thermique.

M./S., 1992a, **8** : 63-64.

Bensaude O. : Protéines de choc thermique, transport des protéines dans le noyau et oncogénèse.

M./S., 1992b, **8**, 710-713.

Binienda Z., Scallet A.C. : The effects of reduced perfusion and reperfusion on c-fos and HSP-72 protein immunohistochemistry in gestational day 21 rat brains.

Int. J. Devl. Neuroscience, 1994, **12** : 605-610.

Burel C., Mezger V., Pinto M., Rallu M., Trigon S., Morange M. : Mammalian heat shock protein families. Expression and functions.

Experientia, 1992, **48** : 629-634.

Carpéné C., Galitzky J., Collon P., Esclapez F., Dauzats M., Lafontan M. : Desensitization of beta-1 and beta-2, but not beta-3, adrenoceptor-mediated lipolytic responses of adipocytes after long-term norepinephrine infusion.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 1992, **265** : 237-247.

Cornelussen R., Spiering W., Webers J.H., De Bruin L., Reneman R.S., Van der Vusse G.J., Snoeckx L. : Heat shock improves ischemic tolerance of hypertrophied rat hearts.

Am. J. Physiol., 1994, **267** : 1941-1947.

Currie R.W., White F.P. : Trauma-induced protein in rat tissues : a physiological role for a "heat shock" protein?
Science, 1981, 214 : 72-73.

Currie R.W. : Effects of ischemia and perfusion temperature on the synthesis of stress-induced (heat shock) proteins in isolated and perfused rat hearts.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1987, 19 : 795-808.

Currie R.W., Karmazyn M., Kloc M., Mailer K. : Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery.
Circ. Res., 1988, 63 : 543-549.

Currie R.W., Karmazyn M. : Improved post-ischemic ventricular recovery in the absence of changes in energy metabolism in working rat hearts following heat-shock.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1990, 22 : 631-636.

Currie R.W., Tanguay R.M., Kingma J.G. : Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion / reperfusion in rabbit hearts.
Circulation, 1993, 87 : 963-971

Damanhoury Z.A., Tayeb O.S. : Animal models for heat stroke studies.
J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 1992, 28 : 119-127.

Das D.K., Maulik N., Moraru I.I. : Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1995, 27 : 181-193.

Deshaies R.J., Koch B.D., Werner-Washburne M., Craig E.A., Schekman R. : A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides.
Nature, 1988, 332 : 800-805.

Didomenico B.J., Bugaiski G.E, Lindquist S. : The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and post-transcriptional levels.
Cell, 1982, 31 : 593-603.

Donnelly T.J., Sievers R.E., Vissern F.L.J., Welch W.J., Wolfe C.L. : Heat shock protein induction in rat hearts, a role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion?
Circulation, 1992, 85 : 769-778.

Edwards D.P., Estes P.A., Fadok V., Bona B.J., Onate S., Nordeen S.K., Welch W.J. : Heat shock alters the composition of heteromeric steroid receptor complexes and enhances receptor activity in vivo.
Biochemistry, 1992, 31 : 2482-2491.

Henry J.P. : Biological basis of the stress response.
NIPS, 1993, **8** : 69-73.

Holbrook N.J., Carlson S.G., Choi A.M.K., Fargnoli J. : Induction of HSP70 gene expression by the antiproliferative prostaglandin PGA2 : a grow-dependent response mediated by activation of heat shock transcription factor.
Mol. Cell. Biol., 1992, **12** : 1528-1534.

Hosokawa N., Hirayoshi K., Nakai A., Hosokawa Y., Marui N., Yoshida N., Sakai T., Nishino H., Aoike A., Kawai K., Nagata K. : Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins.
Cell Structure and Function, 1990, **15** : 393-401.

Hutter M.M., Sievers R.E., Barbosa V., Wolfe C.L. : Heat-shock protein induction in rat hearts, a direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection.
Cardiovasc. Res., 1994, **89** : 355-360.

Iwaki K., Chi S.H., Dillmann W.H., Mestril R. : Induction of HSP70 in cultured rat neonatal cardiomyocytes by hypoxia and metabolic stress.
Circulation, 1993, **87** : 2023-2032.

Jacquier-Sarlin M.R., Polla B.S. : Protéines de stress : soi, non-soi et réponse immune.
M./S., 1994, **10** : 31-41.

Jakob U., Gaestel M., Engel K., Buchner J. : Small heat shock proteins are molecular chaperones.
J. Biol. Chem., 1993, **268** : 1517-1520.

Johnstone A., Thorpe R. : Immunochimistry in practice.
Backwell Science Publications, 1982.

Karmazyn M., Mailer K., Currie W. : Acquisition and decay of heat-shock-enhanced postischemic ventricular recovery.
Am. J. Physiol., 1990, **259** : 424-431.

Knowlton A.A., Brecher P., Apstein C.S. : Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia.
J. Clin. Invest., 1991, **87** : 139-147.

Knowlton A.A. : Heat shock proteins, stress, and the heart.
Annals of the New York Academy of Sciences, 1994, **723** : 128-137.

Kochevar D.T., Aucoin M.M., Cooper J. : Mammalian heat shock proteins : an overview with a systems perspective.
Toxicol. Let., 1991, **56**, 243-267.

Kregel K.C., Johnson D.G., Seals D.R. : Tissue-specific noradrenergic activity during acute heat stress in rats.
Am. J. Physiol., 1993, **161** : 1988-1993.

Lee Y.J., Erdos G., Hou Z., Kim S.H., Kim J.H., Cho J.M., Corry P.M. : Mechanism of Quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells.
Mol. Cell. Biochem., 1994, **137** : 141-154.

Lin W.Q., Van Dyke R.A., Marsh H.M., Trudell J.R. : Nuclear translocation of heat shock protein 72 in liver cells of halotane-exposed rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, **199**, 647-652.

Lindquist S., Craig E.A. : The heat-shock proteins.
Annu. Rev. Genet., 1988, **22** : 631-677.

Lu D., Das D.K. : Induction of differential heat shock gene expression in heart, lung, liver, brain and kidney by a sympathomimetic drug, amphetamine.
Biochem. Biophys. Res. Communication, 1993, **192** : 808-812.

Marber M.S., Latchman D.S., Walker J.M., Yellon D.M. : Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction.
Circulation, 1993, **88** : 1264-1272.

Maulik N., Wei Z., Liu X., Engelman R.M., Rousou J.A., Das D.K. : Improved postischemic ventricular functional recovery by amphetamine is linked with its ability to induced heat shock.
Mol. Cell. Biochem., 1994, **137** : 17-24.

Mehta H.B., Popovich B.K., Dillmann W.H. : Ischemia induces changes in the level of mRNAs coding for the stress protein 71 and creatine kinase M.
Circ. Res., 1988, **63** : 512-517.

Mestrl R., Dillmann W.H. : Heat shock and adaptative response to ischemia.
Trends. Cardiovasc. Med., 1991, **1** : 240-244.

Mestrl R., Chi S.H., Sayen M.R., O'Reilly K., Dillmann W.H. : expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury.
J. Clin. Invest., 1994, **93** : 759-767.

Mestrl R., Dillmann W.H. : Heat shock proteins and Protection against myocardial ischemia.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1995, **27** : 45-52.

- Mocanu M.M., Steare S.E., Evans M.C., Nugent J.H., Yellon D.M. : Heat stress attenuates free radical release in the isolated perfused rat heart.
Free Radical Biol. Med., 1993, **15** : 459-463.
- Morimoto R.I., Sarge K.D., Abravaya K. : Transcriptional regulation of heat shock genes.
J. Biol. Chem., 1992, **31** : 21987-21990.
- Moseley P.L. : Mechanisms of heat adaptation : Thermotolerance and acclimatization.
J. Lab. Clin. Med., 1994, **123** : 48-52.
- Myrmet T., McCully J.D., Malikin L., Krukenkamp I.B., Levitsky S. : Heat-shock protein 70 mRNA is induced by anaerobic metabolism in rat hearts.
Circulation, 1994, **90** : 299-305.
- Nakata N., Kato H., Kogure K. : Inhibition of ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus by quercetin and anti-heat shock protein-70 antibody.
Neuropharmacol. Neurotoxicol., 1993, **4** : 695-698
- Nowak T.S. Jr., Ikeda J., Nakajima T. : 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia.
Stroke, 1990, **21** : 107-111.
- Ohno K., Fukushima M., Fujiwara M., Narumiya S. : Induction of 68,000-Dalton heat shock proteins by cyclopentenone prostaglandins.
J. Biol. Chem., 1988, **263** : 19764-19770.
- Petronini P.G., De Angelis E.M., Borghetti A.F., Wheeler K.P. : Effect of betaine on HSP70 expression and cell survival during adaptation to osmotic stress.
Biochem. J., 1993, **293** : 553-558.
- Poussin C., Joyeux M., Ribuot C., Verdetti J. : Protective effect of thermal stress against cryoprotectant toxicity on aortic rings.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1995, **6** : A164.
- Renis M., Di Giacomo C., Sorrenti V., Russo A., La Delfa C., Reale S., Barcellona M.L., Vanella A. : Heat shock proteins following rat cerebral ischemic/reperfusion episode : effect of ketamine.
Biochem. Mol. Biol. Int., 1994, **33** : 345-354.
- Ritossa F.M. : A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*.
Experientia, 1962, **18** : 571-573.
- Ryan A.J., Flanagan S. W., Moseley P. L., Gisolfi C. V. : Acute heat stress protects rats against endotoxin shock.
J. Appl. Physiol., 1992, **73** : 1517-1522.

Salo D.C., Donovan C.M., Davies K.J.A. : HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise.
Free Radic. Biol. Med., 1991, 11 : 239-246.

Santoro M.G., Garaci E., Amici C. : Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86 : 8407-8411.

Schlesinger M.J., Ashburner M., Tissières A. : Heat shock from bacteria to man.
Cold Spring Harbor Laboratory Publication, New York, 1982.

Schlesinger M.J. : Heat shock proteins.
J. Biol. Chem., 1990, 265 : 12111-12114.

Tissières A., Mitchell H.K., Tracy U.M. : Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*.
J. Mol. Biol., 1974, 84, : 389-398.

Tsang T.C. : New model for 70 kDa heat-shock proteins' potential mechanisms of function.
FEBS Let., 1993, 323, 1-3.

Van Rijn J., Van Den Berg J., Van Aken H., Van Wijk R. : Induction of thermotolerance and heat-shock protein synthesis during nutritional deprivation.
Int. J. Hyperthermia, 1992, 8 : 377-394.

Walker D.M., Pasini E., Kucukoglu S., Marber M.S., Iliodromitis E., Ferrari R., Yellon D.M. : Heat stress limits infarct size in the isolated perfused rabbit heart.
Cardiovasc. Res., 1993, 27 : 962-967.

Watson-Wright W.M., Armour J.A., Johnstone D.E., Wilkinson M. : Myocardial slice : a physiological approach to β -adrenergic [3 H]CGP 12177 receptor binding in hamster and guinea pig heart.
J. Pharmacol. Meth., 1989, 22 : 37-47.

Welch W.J. : Mammalian stress response : cell physiology, structure / function of stress proteins, and implications for medicine and disease.
Physiol. Rev., 1992, 72 : 1063-1077.

Wynn R.M., Davie J.R., Cox R.P., Chuang D.T. : Molecular chaperones : heat-shock proteins, foldases, and matchmakers.
J. Lab. Clin. Med., 1994, 124 : 31-36.

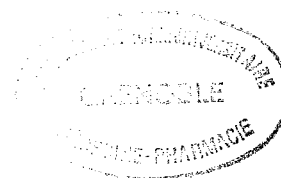
Yellon M.D., Latchman D.S. : Stress proteins and myocardial protection.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1992, 24 : 113-124.

Yellon M.D., Iliodromitis E., Latchman D.S., Van Winkle D.M., Downey J.M., Williams F.M., Williams T.J. : Whole body heat stress fails to limit infarct size in the reperfused rabbit heart.

Cardiovasc. Res., 1992, **26** : 342-346.

Zhang W., Drach J., Andreef M., Deisseroth a. : Proliferation of hematopoietic cells is accompanied by supressed expression of heat shock protein 70.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, **183** : 733-738.



A U T O R I S A T I O N D ' I M P R E S S I O N

De la Thèse dont l'intitulé est :


Les effets de l'hyperthermie sur la production de protéines de choc thermique
et les récepteurs bêta-adrénergiques cardiaques

CANDIDAT : Marie JOYEUX

VU

GRENOBLE, le 4 Septembre 1995

Le Président du Jury
P. DERENGE



VU

GRENOBLE, le 4 Septembre 1995

Le Président de l'Université
Joseph FOURIER GRENOBLE I
Sciences. Technologie. Médecine



