

# **HSP (Protein heat shoc Protein)**

# Introduction

- Le stress est impliqué dans toutes les relations entre l'individu et le milieu qui l'entoure. Dès la naissance et à chaque moment de l'existence, ses conséquences peuvent être d'une extrême gravité et même mettre en cause la survie de l'animal. Il existe dans la cellule un système de protection constitué de protéines dites de stress ou de choc thermique. Leur rôle est démontré dans la différenciation des cellules musculaires, la lutte contre les infections et les stress chimiques ou toxiques ainsi que la protection contre l'augmentation de la température ou l'hypoxie.

# Généralités

- Présentes dans toutes les cellules et les organismes
- Bien conservées au cours de l 'évolution :
- 60-78% d'homologies entre les cellules eucaryotes,
- 40-60% d'homologies entre HSP70 eucaryotique et *Escherichia coli*

# Généralités

- Impliquées dans les fonctions essentielles de la cellule: translocation, repliement et assemblage
- correct d'autres structures protéiques
- Protéines « chaperones »

- Les protéines de choc thermique se lient à des protéines dégradées par un stress et évitent leur agrégation et rétablissent leur fonctions

**Tableau 1. Facteurs provoquant la synthèse des protéines de choc thermique.**

**Stress**

**Choc thermique**

**Irradiation UV**

**Métaux lourds**

**Arsenite**

**Stimuli physiologiques**

**Hormones**

**Facteurs de croissance**

**Cycle cellulaire**

**Analogues d'acides aminés**

**Stimuli physio-pathologiques**

**Infections**

**Hypoglycémie**

**Anoxie**

# Définition

- *Le terme protéine de choc thermique* désigne un groupe de protéines dont l'expression est augmentée suite à un stress, le premier de ces stress décrit étant le choc thermique.
- Elles sont généralement appelées selon l'abréviation anglaise HSP pour "Heat Shock Protein".

# Classification

- Les principales HSP ont été divisées en cinq grandes familles, selon leur poids moléculaire sur gel dénaturant SDS-PAGE et leur homologie de séquence( **tableau 2**) Tout d'abord, on retrouve la famille des HSP90, dont les membres varient entre 83 et 90 kDa, puis la famille des HSP70, avec des protéines allant de 66 à 78 kDa et la famille des HSP60 contenant des protéines localisées dans les mitochondries et les chloroplastes chez les eucaryotes supérieurs.

## Classification

- Ces dernières sont généralement identifiées sous le terme de chaperonines.
- Finalement, on retrouve les protéines de la famille des petites HSP (sHSP : "small HSP") qui vont de 15 à plus de 30 kDa.
- Les protéines de cette dernière famille ont cette particularité d'avoir un domaine peptidique présentant une homologie de séquence avec la protéine alpha-crystallin ( $\alpha$ -crystallin) (Ingolia et Craig, 1982) et elles partagent la capacité d'interagir entre elles pour former de larges complexes oligomériques( complexe protéique) (Arrigo et al., 1988). Il existe également une autre famille, celle des HSP100, dont les membres varient entre 100 et 110 .
- Chacun de ces sous-groupes sera présenté brièvement dans les paragraphes suivants.

**Tableau 2. Nomenclature et localisations intracellulaires des différentes protéines de stress chez les eucaryotes (d'après Kiang et Tsokos 1998).**

<b>HSP</b>	<b>Localisation intracellulaire</b>
<b>HSP 110</b>	Cytosol/noyau
<b>HSP 90</b>	Cytosol/noyau
<b>HSP 73</b>	Cytosol/noyau
<b>HSP 72</b>	Cytosol/noyau
<b>grp 75</b>	Mitochondrie/chloroplaste
<b>HSP 60</b>	Mitochondrie/chloroplaste
<b>HSP 47</b>	Réticulum endoplasmique
<b>HSP 20 ( 27 )</b>	Cytosol/noyau
<b>HSP 10</b>	Mitochondrie/chloroplaste
<b>Ubiquitine</b>	Cytosol/noyau

Pr o t é in e	Ph é n o t y p e	F on c t i o n s
Ubiquitin e		Dé gradati on d es proté in es
H SP 1 0	Tol éra nce à l 'is ché mi e	
H SP 2 7	Rés ist ance aux mé di ca men ts de ch imio thér apie, à H 2O 2, aux UV, au TN F Tol éra nce à l 'is ché mi e, à l 'h yper therm ie	Cont rô le de la polym éris atio n de l'ac tin e Ch aper one
H SP 4 7		Ch aper on des coll agè ne
H SP 6 0	Tol éra nce à l 'h yper therm ie et à l 'is chém ie	Ch aper on des proté in es en g éné ral
H SP 7 0	Rés ist ance à H2O 2, aux UV, à l'apopt ose Tol éra nce à l 'is ché mi e, à l 'h yper therm ie R éduction de l'infar tu s car di aq ue apr ès is ché mi e	Prot ège co nt re la cyt oto xic ité Ch aper on mol éc ul a ire
H SP 9 0	Tol éra nce à l 'is ché mi e, à l 'h yper therm ie et à l'apopt ose	Se lie au récepteu r des té roïd es pour les stab ilis er
H SP 1 10	Tol éra nce à l 'h yper therm ie	

## HSP 27 et protéines associées

- Contrairement aux protéines de stress de poids moléculaire plus élevé, les séquences de celles de plus petite taille sont moins conservées entre espèces .
- Leur structure révèle, néanmoins, un domaine très conservé, connu sous le nom de domaine  $\alpha$   $\beta$  cristalline qui porte sur environ 80 résidus pour la drosophile et les mammifères. L'analogie de séquence reste supérieure à 50 % entre les différentes espèces.
- A l'état natif, ces protéines se présentent sous forme d'agrégats de 300 à 800 kDa
- Cette propriété est commune avec celle de l' $\alpha$  cristalline, conduisant à des granules de tailles similaires de 10 à 15 nm de diamètre (Arrigo et al 1988). La parenté entre HSP 27 et  $\alpha$  cristalline est encore plus prononcée en ce qui concerne la structure carboxy terminal pour la stabilité thermodynamique de ces protéines

# Localisations

Chez la drosophile, HSP27 a été localisée dans le tube neural des embryons en fin de développement. Elle se trouve au niveau neuronal probablement en association avec des cellules en mitose aussi bien qu'en voie de différenciation. Les protéines associées HSP 26 et HSP 23 ont une localisation voisine, bien que HSP 26 soit surtout exprimée dans les gonades.

Au niveau tissulaire, HSP 27 est exprimée dans les organes génitaux. Elle est également exprimée dans la peau où elle semble jouer un rôle important dans le développement cutané (Jantschitch et al 1998). HSP 27 s'exprime aussi, mais plus faiblement, dans l'intestin, le cœur, le rein, le sang et le muscle strié (Ciocca et al 1993).

En l'absence de stress, l'accumulation HSP 27 dans le tissu nerveux se produit dans les neurones spinaux et les cellules de Purkinje (réponsable de potentiel d'action) du cervelet . Son expression se fait alors dans la région périnucléaire proche du complexe de Golgi, tandis qu'après choc thermique, elle est localisée dans le noyau. Dans les cellules non stressées, les protéines de stress sont localisées dans le noyau et autour de celui-ci, mais de façon variable selon l'état métabolique des cellules et leur thermorésistance.

## Rôle biologique: a. Thermotolérance

- L'association entre la thermotolérance et, à la fois, le niveau d'expression et le degré de phosphorylation de HSP 27 représente un phénomène complexe. L'implication de HSP 27 dans la réponse au stress thermique est liée à son activité 'chaperone' (Ellis 1990).
- L'activité chaperone consiste en une protection des protéines cellulaires par leur association avec les HSP et un cortège de protéines associées en particules spécifiques
- HSP 27 et ses protéines associées empêchent l'agrégation des protéines ainsi protégées et facilite leur restructuration fonctionnelle. Il existe plusieurs illustrations du rôle vital des protéines de stress en tant que chaperons moléculaires.
- Parmi celles-ci, l'cristalline empêche la formation, dans le cristallin, d'agrégats protéiques de grande taille qui conduirait à une dispersion de la lumière et à diminuer la transparence du cristallin. HSP 27 peut être combinée à HSP 90, HSP 70 et d'autres HSP qui sont associées au récepteur des stéroïdes pour assurer le « chaperoning » des autres protéines.

# HSP 70 et protéines associées

- De nombreux travaux portent sur les interactions entre HSP 70 et les autres protéines protégées par celles-ci (Kiang et Tsokos 1998, Kelley 1999). Les protéines de choc thermique les plus étudiées sont HSP 70.
- La structure des protéines HSP 70 chez les eucaryotes est très voisine de celle de son équivalent procaryote (appelé Dnak). HSC70 représente la protéine constitutive de poids moléculaire voisin de 70 kDa. HSP 70 est la protéine inductible. L'ensemble est constitué de trois domaines de tailles respectives 44 kDa, 18 kDa et 10 kDa. Le domaine 18 kDa représente la partie de la molécule capable de fixer les peptides (2 feuilles  $\beta$  antiparallèles et une simple hélice  $\alpha$ ). Le domaine C- terminal de 10 kDa est une hélice  $\alpha$  contiguë à une séquence d'acides aminés (acide glutamique, valine et acide aspartique) EEVD très conservée (Hightower et al 1994).

# Localisations

- HSP 70 s'exprime à un faible niveau dans les cellules non stressées. HSP 70 ont été localisées dans différents tissus (Tanguay et al 1993), notamment cérébral. Trois heures après un stress thermique, l'ARN HSP 70 est surexprimé dans l'hippocampe de rongeur (David et al 1994). La distribution de HSP 70 a également été étudiée chez le rat ayant subi un infarctus du myocarde(mort des cellules d'une partie du muscle cardiaque) : cinq à sept jours après infarctus, HSP 75 et GRP 78 (glucose related protein) sont surexprimées dans la zone cardiaque d'infarctus, HSP 72 semblant peu modifiée (Kilgore et al 1996).

- Un aspect important de la localisation cellulaire de HSP 70 et des protéines associées est celui de la translocation à travers la membrane mitochondriale et de la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui permet le transport de polypeptides. Parmi les HSP, la protéine BIP (Binding immunoglobulin *protein*) est associée à ce transport à travers le réticulum endoplasmique (Brodsky et Schekman 1994). Le peptide se lie à un complexe protéique accepteur et BIP, sans utilisation d'ATP. Puis, ce complexe se lie à une autre protéine acceptrice de la membrane avec utilisation de l'ATP. Il y a ensuite libération du polypeptide dans le lumen du réticulum endoplasmique.

# Rôle biologique

- Un choc thermique de courte durée permet une protection contre les séquelles d'une ischémie/reperfusion (Currie et al 1993). Ceci a été confirmé en utilisant des souris transgéniques dont le muscle cardiaque est plus tolérant à l'ischémie que des souris normales (Plumier et al 1995, Hutter et al 1996). Chez le rat nouveau né, l'introduction du gène HSP 70 associé à l'adénovirus virus à ADN) amène une protection contre l'infarctus provoqué par l'ischémie (Mestril et al 1996).
- L'expression des HSP est associée à une protection de l'hôte suite à certaines infections. L'accroissement de l'expression HSP 70 peut être considéré comme un marqueur de l'accroissement du stress qui résulte de la pollution environnementale.

## HSP 90 et protéines associées

- Pour cette protéine de 90 kDa environ 40 % de la structure est la même chez les procaryotes et les eucaryotes.
- La protéine HSP 90 est un oligomère(complexe protéique phosphorylé. Comme la plupart des autres chaperons, la molécule HSP 90 est hydrophobe et cette hydrophobicité est encore accrue après choc thermique.
- De plus la présence, dans cette molécule, de deux zones chargées négativement confère à HSP 90 une liaison préférentielle pour les molécules chargées positivement ou hydrophobes .
- La phosphorylation de la molécule accroît encore les charges pour former des complexes avec de nombreuses protéines-kinases([enzymes](#) qui catalysent le transfert d'un groupe [phosphate](#) de l'[adénosine triphosphate \(ATP\)](#) )

- HSP 90 se lie à de nombreuses molécules comme les récepteurs hormonaux ou l'actine( protéine importante dans l'architecture et les mouvements cellulaires .
- On distingue en général trois grandes parties dans la molécule HSP 90 : une partie N-terminale, qui est le site de liaison de l'ATP et de la geldamycine (substance bloquant spécifiquement l'activité de HSP 90 et aussi médicament antitumoral), une partie médiane, qui constitue le site de liaison des récepteurs stéroïdes et une partie C-terminale qui comporte le site de liaison de la calmoduline ( protéine capable d'associer a calcium) et celui de la dimérisation( complexe de protéine en deux sous unités) de HSP 90.
- Notons qu'il existe, dans le réticulum endoplasmique, une protéine très abondante qui présente 50 % d'homologie avec la HSP 90, de localisation cytosolique.Cette protéine, appelée grp94, joue également un rôle de chaperon.

# Localisations

- L'équivalent procaryote de HSP 90, Htpg, a été décrit chez *Escherichia coli*. Les deux formes de HSP 90,  $\alpha$  et  $\beta$  ont été trouvées dans le cytoplasme de façon prépondérante; grp 94 étant localisé dans le réticulum endoplasmique.

## Rôle biologique a. Présentation de l'antigène

- HSP 90 peut servir au transport entre le cytoplasme et le noyau de molécules comme les peptides. Il y a déjà plus d'une décennie que HSP 90 a été identifié comme un antigène spécifique de tumeur à la surface de nombreuses cellules tumorales. La grp94 présente à la surface cellulaire peut se lier à la transferrine( elle transporte le fer de l'intestin vers le foie) avec une affinité élevée.
- Cette présence à la surface cellulaire fait de grp94 et HSP 90 des protéines impliquées dans la présentation de l'antigène et conduit à des applications pratiques importantes.

# Présentation de l'antigène

- Cette capacité est accrue par la possibilité de ces protéines de se lier à une grande variété de peptides, en association avec le protéasome (ils dégradent les protéines mal repliées).
- Il y a donc liaison entre des protéines de stress et le « relais » peptide/antigène.
- L'implication de grp94 et HSP 90 favorise, de plus, la reconnaissance d'infections par des agents extérieurs et accroît la réponse immunitaire.
- L'association entre l'antigène et HSP 90 (ou HSP 70) rend possible la vaccination sous des CMH (Le complexe majeur d'histocompatibilité) compatibles, ce qui permet d'accroître la gamme antigénique de vaccination.

## • Rôle dans la réponse cellulaire au stress : ischémie et reperfusion

- L'ischémie et la reperfusion sont des états pathologiques associés à de graves atteintes cérébrales ou cardiaques.
- Deux grandes étapes peuvent être observées : lors de l'ischémie, les protéines glucose dépendantes, comme grp94, sont induites alors que les HSP le sont dans la phase de reperfusion, en association avec le stress oxydatif.
- Dans plusieurs tissus, la reperfusion amène une induction de HSP 90 : le cœur, le cerveau et le rein.

# Ischémie et reperfusion

- HSP 90 n'exerce pas de rôle neuroprotecteur comme celui de HSP 70 dans le cas de l'ischémie. Cependant, il faut noter que HSP 90 peut s'associer à HIF1 $\alpha$ , facteur d'hypoxie qui intervient dans la transmission du signal ischémique.
- D'autres effets impliquant HSP 90, ont été récemment décrits comme l'hypertrophie cardiomypathique chez les porcelets atteints de mort subite

## . Pathologies

- HSP 90 a un rôle de protection contre les infections.
- La surexpression de HSP 90 protège contre plusieurs maladies infectieuses comme les leishmanioses (Salotra et al 1995), d'où l'idée d'utiliser HSP 90 pour la vaccination, par exemple contre *Candida albicans*( levures parasitent le muqueuses).
- Les premiers stades d'infections virales révèlent des surexpressions de HSP 90 .

- Les HSP sont utilisées comme marqueurs de toxicologie environnementale
- Les pesticides amènent une surexpression de HSP 90.
- Cette surexpression est aussi observée avec les médicaments anti-cancéreux.

## Induction des HSP: Induction par la température

- Les HSP induites par une élévation de température ont été détectées chez de nombreuses espèces d'invertébrés et de vertébré.
- Chez les animaux aquatiques vivants dans les milieux soumis à des fluctuations rapides de l'environnement le rôle des HSP serait de conférer une tolérance à ces conditions artificielles.
- La thermo tolérance joue un rôle important de point de vue écologique.
- à ce titre les organismes interdicaux sont d'excellents modèles par ce qu'ils subissent de fortes variations de la température de l'eau et de l'air lesquelles fluctuent journallement en fonction des saisons.

## Induction des HSP: Induction par la température

- Le rôle des protéines de stress dans l'adaptation a été bien étudié chez deux espèce de patelles du genre *Collicella* qui occupent des habitats différents caractérisé chacun par un microclimat déterminé.
- *C. scabra* qui vit dans la partie supérieure de la zone intertidale présente la plus grande tolérance et une réponse à un choc thermique aigu plus développé que *C. pelta* qui vit dans la zone intertidale moyenne.
- Le poisson *Fundulus heteroclitus* peut s'adapter à une large gamme de température et représente l'une des espèces les plus résistantes au températures élevées.

# induction par les toxiques

- La synthèse des protéines de stress est provoqué non seulement par la chaleur, mais elles peut aussi résulter de l'exposition à divers toxiques , les gammes des hsp induite différant fréquemment selon la nature de l'agent inducteur ( tableau .3)
- D'une façon générale. Il apparaît que les réponses provoqués par des contaminants chimiques sont plus lente à apparaître que l'induction provoquée par les chocs thermiques .
- .
- Ces différence dans l'activation des gènes des HSP pourrait résulter su fait que les stimulations chimiques dépendent des processus d'absorption et de détoxification et du mécanisme de toxicité . les quelles très variables selon la nature de l'agent inducteur.

# induction par les toxiques

- Le mécanisme d'induction des hsp par les polluants de l'environnement n'est pas connu avec précision. Toutefois plusieurs études semblent indiquer que cette induction ferait intervenir comme le cas d'un stress thermique les HSF .. en tout état de cause, l'accroissement de la concentration intracellulaire en protéines dénaturés constituait le signal déclencheur de la réponse cellulaire au stress , faisant office de signal de protéotoxicité .
- D'une façon générales tous les organes ne présentent pas la même intensité de réponse à l'action de stress ; qu'il s'agisse d'un stress thermique ou un stress toxique

# induction par les toxiques

- Chez le poisson *pimephales promelas* par exemple de protéine de la famille hsp 70, hsp 76 et hsp 74.sont exprimés dans les cellules branchiales et cardiaques lors d'un stress thermique .alors seule la protéine HSP 76 est détecté dans le foie , les muscles squelettiques et le cerveau.
- Dans le cas d'un stress toxique, la réponse est souvent maximale au niveau des organes cibles
- Chez *M edulis* par exemple, la synthèse des hsp 60 lors d'une intoxication par le cuivre est dix fois plus forte au niveau des branchies qu'au niveau du manteau.

# induction par les toxiques

- Chez *p. promelas* , les effets varient selon le toxique considéré , pour un toxique tel que l'arsenic , pour lequel tous es organes constituent des cibles potentielles. L'induction des protéine s'effectue selon les voie de pénétration .c'est ainsi que l'induction est plus forte au niveau des branchies .
- Pour les substance neurotoxiques telles que le diazinon ou le lindane en revanche , la réponse la plus élevée est observée au niveau du cerveau ainsi qu'au niveau des muscles striés en ce qui concerne le diazinon..
- Ces exemples suggère que l'induction des HSP peut être utilisée pour préciser la distribution des toxiques dans les organes pour identifier les organes cibles