

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Relation entre protéines de choc thermique et les enzymes antioxydantes

Weynants, Vincent

Award date:
1989

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1989



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

**RELATION ENTRE PROTEINES DE CHOC
THERMIQUE ET LES ENZYMES
ANTIOXYDANTES**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

WEYNANTS VINCENT

Voilà, il ne reste que quelques heures avant la date fatidique, avant de remettre ce mémoire.

Je remerciai tout d'abord Monsieur Remacle pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir appris qu'il ne fallait pas se décourager, qu'il faut aussi savoir attendre.

Merci à Andrée et Edouard pour m'avoir enseigné leur science de l'organisation et de la facilité. Sans vous, ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour.

Merci à Carine, Isabelle, Marie-Denise, Martine, Etienne, Olivier...pour leur disponibilité à toute épreuve, mais aussi à tous les autres pour la bonne humeur, l'ambiance et la vie qu'ils mettent au labo.

Je n'oublierai pas mes "compagnons d'armes": Caroline, Pierre et Thierry avec qui j'ai passé 4 années mais plus particulièrement celle-ci.

Merci à toute ma famille, mais spécialement à mes parents qui ont financé ces études et qui ont participé de loin comme de près à l'aboutissement de ce mémoire qui clot 4 années géniales.

Puisque j'évoque mes 4 années aux Facs, je tiens à remercier tous les Bio's qui ont vécu avec moi des moments supers et parfois pénibles.

Enfin, je tiens à remercier tout spécialement Béné qui a partagé mes joies mais aussi mes sautes d'humeurs, les "jours sans".

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

BiP	Protéines associées aux chaînes lourdes des Immunglobulines
HSC	Heat Shock Cognate protein
HSE	Heat Shock Element
HSP's	Heat Shock Proteins
HSR	Heat Shock Response
HSTF	Heat Shock Transcription Factors
Ig	Immunoglobulines
Gpx	Glutathione peroxydase
GRP	Glucose Regulated Proteins
GSH	Glutathion
MDA	Malondialdehyde
tBHP	ter Butylhydroperoxyde
Se	Sélénium
SOD	Superoxyde dismutase
Ub	Ubiquitine

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
1. Les protéines de choc thermique.....	1
1.1. Introduction.....	1
1.2. Classification des HSP's.....	1
1.3. Caractéristiques et fonctions des HSP's.....	2
1.3.1. Caractéristiques et fonctions générales des HSP's.....	2
1.3.2. Rôles spécifiques de quelques HSP's.....	3
1.3.2.1. La famille des HSP's 70.....	3
1.3.2.2. La HSP 90.....	3
1.3.2.3. L'ubiquitine.....	4
1.3.2.4. L'HSP 110.....	4
1.3.2.5. Les GRP.....	4
1.3.2.6. Résumé.....	5
1.4. Régulation de la HSR.....	5
1.4.1. Le HSE et les HSTF.....	5
1.4.2. Mécanismes impliqués lors de la réponse à un choc thermique.....	6
1.4.2.1. Mécanismes d'induction.....	6
1.4.2.2. Mécanismes intervenant au cours de la HSR.....	7
1.4.2.3. Pourquoi le HSR est-elle un phénomène transitoire ?.....	7
1.4.2.4. Les inducteurs de la HSR.....	7
2. Sress oxydatifs et enzymes antioxydantes.....	8
2.1. Introduction.....	8
2.2. Les radicaux libres.....	8
2.2.1. Définition.....	8
2.2.2. Sources des radicaux libres.....	8
2.2.3. Toxicité des radicaux libres.....	9
2.2.3.1. Peroxydation lipidique (fig. 13).....	9
2.2.3.2. Les Protéines.....	9
2.2.3.3. Acides nucléiques et ADN.....	10
2.3. Les enzymes antioxydantes.....	10
2.3.1. La catalase.....	10
2.3.2. La Glutathione peroxidase (Gpx).....	11
2.3.3. La superoxyde Dismutase (SOD).....	12
2.3.4. Rôle bénéfique des enzymes antioxydantes.....	13
2.3.5. Induction des enzymes antioxydantes.....	14

3. Relation entre choc thermiques et stress oxydatifs	15
MATERIELS ET METHODES.....	17
1. Culture cellulaire.....	17
2. Dosages	17
2.1. Dosages des protéines.....	17
2.2. Dosage de la Catalase.....	18
2.3. Dosage de la Glutathione peroxidase.....	18
2.4. Dosage de la Superoxyde Dismatase (SOD)	19
2.5. Dosage du Malondialdehyde.....	19
2.6. Titrage du Peroxyde d'Hydrogène (H ₂ O ₂)	19
3. Stress cellulaire	20
3.1. Chocs thermiques.....	20
3.2. Stress oxydatifs	20
3.2.1. Stress oxydatifs au tBHP	20
3.2.2. Stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène	20
3.3. Traitement des cellules pour le dosage des enzymes anti-oxydantes.....	20
3.4. Traitement des cellules pour l'analyse des protéines de choc thermique.....	21
4. Techniques utilisées pour les gels à une et deux dimensions	21
4.1. Solutions nécessaires à la réalisation des electro- phorèses.....	21
4.2. Marche à suivre pour la réalisation des électro- phorèses.....	23
4.2.1. Traitement de l'échantillon.....	23
4.2.2. Première dimension électrofocalisation (IEF)	24
4.2.3. Deuxième dimension	25
4.2.4. Gels à une dimension.....	25
4.3. Traitement des gels pour l'autoradiographie	26
4.4. Révélation du film photos.....	26
RESULTATS.....	27
1. Choc thermique.....	27
1.1. Analyse des HSP's.....	27
1.2. Analyse des enzymes antioxydantes.....	28
2. Stress oxydatifs	29
2.1. <i>ter</i> Butylhydroperoxide	29
2.1.1. Courbe de toxicité.....	29
2.1.2. Analyse des HSP's par gel à 1 dimension	30

2.1.3. Analyse des enzymes antioxydantes.....	30
2.2. Peroxyde d'Hydrogène.....	31
2.2.1. Courbe de toxicité.....	31
2.2.2. Analyse des HSP's.....	31
2.2.3. Analyse des enzymes antioxydantes.....	32
DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	33
1. Considérations générales.....	33
2. Les protéines de choc thermique.....	34
3. Les enzymes antioxydantes.....	36
4. Conclusions et perspectives.....	37
BIBLIOGRAPHIE.....	39

INTRODUCTION

1. Les protéines de choc thermique

1.1. Introduction

L'exposition à des températures supraoptimales (Heat Shock : HS) induit chez les êtres vivants une réponse physiologique appelée la réponse à un choc thermique (ou Heat Shock Response : HSR). Ce phénomène se rencontre chez les bactéries ainsi que chez les plantes et les animaux. (Schlesinger, 1986).

Il s'agit d'une reprogrammation immédiate, complexe et transitoire des activités cellulaires pour assurer la survie durant la période de stress, pour protéger les composants cellulaires essentiels contre les dommages causés par la chaleur et pour permettre un rapide retour aux activités normales de la cellule après le stress (Burdon, 1986).

La HSR, qui consiste en une augmentation impressionnante de la synthèse d'une douzaine de protéines et d'une suppression de la synthèse de la plupart des protéines normales (Neidhart et al, 1984), fût pour la première fois décrite par Ritossa en 1962. Celui-ci observa sur les chromosomes des glandes salivaires de *Drosophiles*, oubliées sur un radiateur, de nouveaux ensembles de soufflets à certains endroits des chromosomes dûs à une production intense d'ARN ("puffs"). Ce n'est qu'en 1974 que Tissières et Mitchel établirent une association entre ces nouveaux soufflets et la synthèse de protéines spécifiques, appelées par la suite protéines de choc thermique ou Heat Shock Proteins (HSP's). Peu après, on prouva que ces soufflet étaient le siège d'une transcription intense d'ARN (pour une revue voir Craig, 1985).

1.2. Classification des HSP's

La classification des HSP's et leur nomenclature sont basées sur leur poids moléculaire. Ces protéines sont habituellement classées en trois catégories.

la famille des HSP's de 70 kDa comporte la HSP70 et les les protéines apparentées à l'HSP 70 (HSC70). Ces dernières sont des protéines constitutives dont la synthèse n'est pas accrue lors d'une élévation de température; elles sont similaires mais non identiques à l'HSP 70 (Hightower and White, 1981).

- la famille des HSP's de 90 kDa comporte les HSP's de grands poids moléculaires : les HSP's 83, 90 et 110.

HUMAN	MA-KAAVGI	DLGTTYSQUG	VFQHGVEII	AAQGHATTP	SYUAFI-DTE	ALIGDAKHO	
XENOPUS	..T.GU...I...Y.....M.Y.....S.....	..M.EP...	
DROSOPHILA	.P---.I.Y.....M.Y.....S.....M.EP...		
YEAST	.S---.I.A.....	M.ANDR.D.F.....M.T..QG.....	
E. COLI	.G---.I.M.....	A INDGTPAUL	E.AE.D.	..I.Y.Q.G.	T.U.QP..A.	60
VALMPQATVF	DAKALIGAKF	GDPVUQSDMC	HUPFQUINOG	DEPEVQVSYK	GETKAFYPEE	ISSHULTKAC	
..N.....C.L.	A.....US.E	G...E.E.	..E.S.F...S.....	..M.EP...	
..N.A.A...	..RK...Y	D..KIRE...	...E.US.	G...IG.E.	..S.A.A.G.....	
M.A.S...M.	M..E..A...	F..EL.DUD	G..QI..EF.M.T..QG.....	
AUT....L.	RI.....A.	Q.EE..A.US	IN..EI.AAO	-NGDAU.EU.	--QKMA.PQ	..AE..K...	130
EIAEAYLGY	UIMAVITUPA	YFKOSQOAT	KDAGVIAGLN	ULRIIXEPTA	AAIAYGLDRT	EGGERMVLIF	
.T.....M.I.....L.....I.....L.....K.....	AA..Q.....	
.T.....ES	I..D.....M.....L.....L.....K.....	L.....S.....	
.T.S...AC	..MO..V...T.....T.....T.....K.....	..E.M7...	
ET..D...E.	..E.....A.....A.....	..E.....L.....	K-..T.M.TIAVY	200
DLGGGTDFUS	ILTIDGG---	-IFEVKATAG	DTHLGGEDFO	HALVHMFVEE	FEREKCKDIS	OKERRAARLA	
.....E.S---	..L...MS...T.LA...Y...LA	S.P..L...L.....L.....	
.....L.F.E---L.....L.....L.....L.....L.....L.....	
.....I..E..EUDGE	ET..L..M.S..I.YLKQGGI.LA	NOPL.NQ..EL.....L.....	270
TACEAAKATL	SSSTGASLEI	DSLFEIGIDFY	TSI----TAA	AFFELCSOLF	ASTLEPUCKA	LADAKLQKAO	
..D.....	..SQ..I.A.....A.....G.....S.....S.....	
..A.....	..E.TI..	A...Q...	.KV---S.AM..	M..Q.....	M..M..GQ	
..AQT..U.A.....D.....U.....S.....S.....S.....	
E.A.K...IE.	..AQTQVHL	PYITADATGP	KMMHKVT..	KL.S.UE..U	AAST..LKV.	Q..G.SUSD	310
INDLULUGES	TRIPKVEQLL	QOFFHGAOLN	ESINPDERVG	YGARUQAAIL	NGDESERVQD	LLLLDVAPLS	
..E.I.....E.....A.....A.....A.....A.....A.....	
..I.....S.....	E..M.KH.	L.....A.....SC.Q.GKI.	U..W.....S.....	
UDEI.....U.T.Y...	KEP..A.....A.....T..E.SKT.S.....S.....	
..D.VI...Q	..N.M..KV	RE...KEPA	..DU..E..A	I.....GGU.	T.----.K.	W.....T...	410
LGLETAGGUA	TALIKRSTI	PTKQTQIFTT	YSDKQPGULI	QVYEGEAAAT	KMHLLGAFE	LSCIPRAP-G	
..U.....T...S.....S.....F.....K.....G.....A.....	
..I.....	K..E..CA.	C...KT.S.S.....A.T.D.	..G.....A.G.....	
..I.....	K..P...S.	KFE..S..AF.....K.....G.....A.....	
..T..A...T.	..AK.T...	..MS.U.S.	RE...SA.T.	M.LQ...KAA	A..KS..Q.M	DG.N...A.	480
VPQIEVTFDI	DANGILKATA	TKDSTGKANK	ITITNKGAL	SKEEIEANUQ	EAEKYKAED	VQRENVSAKN	
.....L.....S.VEK.S.Q.D..K...D..DD..DD..DD..D	
.....U.....S.KEM..CNE...QA..D..MAD...	ENGQ.ITSA.KESQ.IAS.KESQ.IAS.	
N.....D..M.S.	KDKMS..EQ.KASS..	MED..QC..A	D..AAKRA.A	KFE.L.OTA.	550
RLSYAFMK	SAVEDEGLG	KISEADKKEV	LKCCQEVISH	LDANTLAEKD	EFENKAKELE	QVMPHISGL	
.....L..N.....	..AV...DE..ATI	SE..TO....	..EH.Q...E	..YAFQQ.D.	K..U...TK.S.....	
.....UY.U.	QS..QAPA..	..LD...MS.M.T.A.	..S..T...E	..D..RE..T	AM.S..ATKA	
Q...IAYSL.	MTISEA.D.L	EQAOK.TVTK	KAEET---	..S..T.S.E	..DO.L...Q	DIA...N.K.	
QGDHLHSTRA	EQ..EA.D---	..LPAO..TAI	ESALTALETA	..KGEDK.AIE	A---.NQ..A	..SOKLAEIA	620
YQ-GR---GG	-PG-----P	GGF-----GA	QGPKGGSG-S	GPTIEEU-D	HUMAN	640**	
YQ-----GG	VPGGU---P	GGMPGSSCGA	QAAQGG--RS	GPTIEEU-D	XENOPUS	647**	
HQQGAGAGGG	-PGAKCGQA	GGF-----	-----G--YS	GPTVEEU-D	DROSOPHILA	641**	
YQ--AG--GA	-PGAGGGAP	GGFPG---GA	PPAPEAE---	GPTVEEU-D	YEAST	643**	
QQQHAQQQTA	GADASAKKAC	DDDUUU-----	---AE-F---	EEVKCKK	E. COLI	638**	

The complete amino acid sequence of five *hsp70* genes: human (heat-inducible an serum regulated), *Xenopus laevis* (heat-inducible, oocyte constitutive), *Drosophila melanogaster* (chromosomal locus 87C, clone G3), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, YG100), and *E. coli* (*dnaK*). A dot (·) indicates the same amino acid as in the human sequence. In the last row, where varied homologies can be drawn, the single-letter code is given for each species.

Fig. 1

Séquences en acides aminés montrant le haut degré de conservation des HSP's 70 de l'Homme, de *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, de la levure et d'*E. coli* (d'après Lindquist, 1986).

De plus on a récemment montré que l'ubiquitine était une HSP chez les fibroblastes d'embryon de poulet (Bond and Schlesinger, 1985) et chez *Saccharomyces cerevisiae* (Finley et al, 1987). Cette protéine peut donc à elle seule constituer une quatrième famille d'HSP (Schlesinger, 1986).

Il faut tout de même noter que le nombre exact de HSP's varie considérablement selon les organismes et les types cellulaires, que toutes les HSP's (sauf probablement la HSP 70) sont présentes à des niveaux significatifs dans les cellules non stressées (Welch and al, 1983) et que l'augmentation de synthèse de ces protéines varie selon les HSP's elles-mêmes (Goochee, 1988) et d'après l'intensité du stress (Honda et al, 1988).

1.3. Caractéristiques et fonctions des HSP's

1.3.1. Caractéristiques et fonctions générales des HSP's

Une caractéristique remarquable des HSP's est leur haut degré de conservation au cours de l'évolution. Par exemple, si l'on considère les HSP70 et leurs gènes correspondants chez *E. coli*, *S. cerevisiae*, la Drosophile et l'Homme, on constate des séquences en acides aminés et en nucléotides extrêmement conservées (supérieures à 70% et 45% respectivement) (fig.1) (Bardwell and Craig, 1984, Hunt and Morimoto, 1985 a et b). Et en ce qui concerne les HSP 83 d'*E. coli*, de Drosophile et de l'Homme, les séquences en acides animés sont identiques à plus de 40% (Bardwell et al., 1987). En considérant la dégénérescence du code génétique, cette caractéristique des gènes HS est très intéressante d'un point de vue évolution et a conduit Hunt et Morimoto (1985) à proposer qu'il y a probablement des informations supplémentaires dans la séquence en nucléotide de ces gènes ou de leurs ARN messagers correspondants. De toute façon, cette homologie suggère des fonctions importantes imparties aux HSP's lors d'une HSR.

En effet, on suppose que les HSP's interviennent pour protéger des fonctions cellulaires et assurer la survie des cellules lors de stress. De plus, certaines d'entre elles sont indispensables pour la survie des cellules non agressées (Itikawa et al., 1979, Wada et al., 1984, Linquist and Craig, 1988).

De nombreuses observations démontrent aussi que la HSR est impliquée dans le phénomène de thermotolérance (Freeman and Scidmore, 1987; Li and Hahn, 1987; Laszlo, 1988, Mosser et al., 1988). Il s'agit d'une capacité de survie à des températures normalement léthales, acquise suite à une exposition à des températures subléthales qui induisent une HSR.

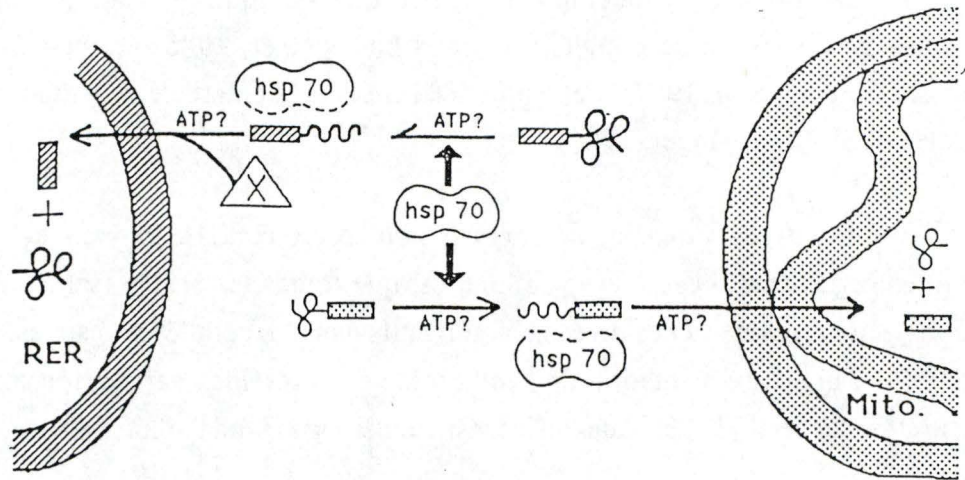


Fig. 1. A model of hsp70 function in protein translocation. One or more hsp70 binds to a secretory or mitochondrial precursor polypeptide. The position of this interaction is unknown, as indicated by the dotted lines at the hsp70-precursor interface. Binding may occur as the precursor is being made or after completion of the polypeptide. The initial interaction may consume ATP, or ATP may be bound but not hydrolysed by the complex. For import into the ER, at least one additional yeast lysate component is required (factor X). We propose that this factor(s) targets secretory proteins to the ER membrane. A translocation-competent complex then associates via a signal or transit peptide with the proper target membrane and as penetration begins the complex dissociates allowing the hsp70 to be recycled. ATP hydrolysis may facilitate this dissociation step.

Fig. 2 Rôle probable des HSP' 70 dans la translocation des protéines (d'après Deshaies et al., 1988).

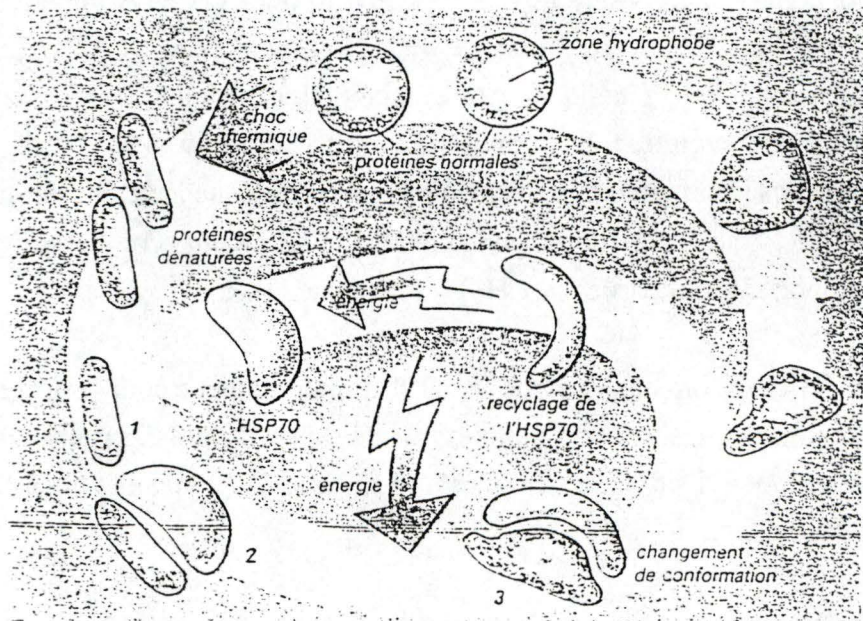


Fig. 3 Représentation schématique des fonctions des HSP's 70 dans la restauration et / ou la stabilisation des protéines lors de la dénaturation par un choc thermique (d'après Jamma, 1989).

De plus, en dehors de l'induction du HSP's lors d'un stress, ces protéines interviennent également dans des processus cellulaires tels que :

- la croissance et la division cellulaire (Celis et al., 1988),
- la protection de l'épissage (processus de maturation des ARN messagers) lors d'un choc thermique intense (Yost et al., 1988),
- le développement (pour revue voir Lindquist, 1986),
- la replication virale (pour revue voir Burdon, 1986),
- et probablement l'inflammation (Polla, 1988; Pardue, J., 1988).

1.3.2. Rôles spécifiques de quelques HSP's

Les fonctions individuelles des HSP's demeurent obscures. Mais, de plus en plus d'observations permettent de formuler une série d'hypothèses, plus que probables, sur le rôle de quelques unes d'entre elles.

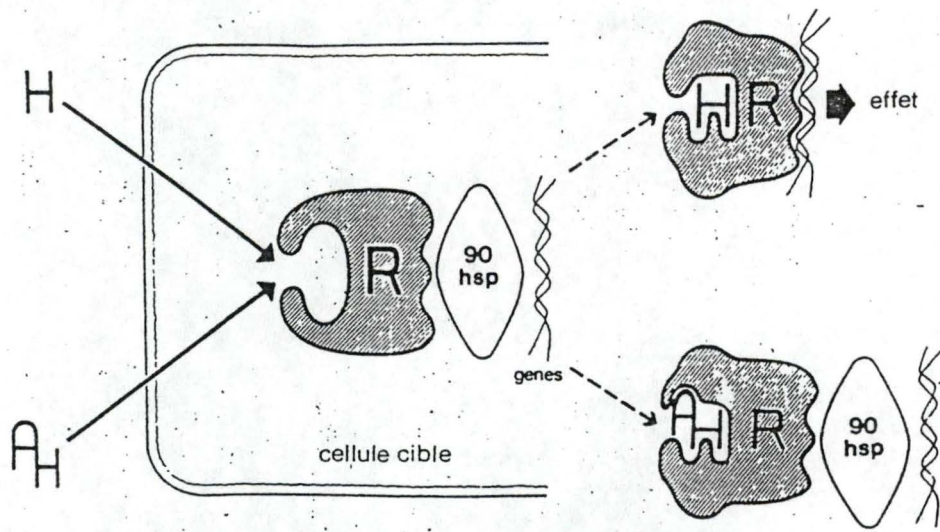
1.3.2.1. La famille des HSP's 70.

Les membres de cette famille possèdent tous des propriétés de liaison avec l'ATP (Beaulieu et al., 1988). De plus, la HSC 70 est apparentée à une ATP impliquée dans la dissociation de la clathrine des vésicules tapissées (coated vesicles) (Chappell et al., 1986). Récemment, on a aussi montré que les membres de la famille des HSP's 70 sont impliqués dans la translocation membranaire des protéines. Ces protéines seraient maintenues dans un état déplié au cours du passage transmembranaire (fig. 2) (Chiroco et al., 1988; Deshaies et al., 1988 a & b).

De ces observations et d'autres, Pelhan (1988) propose que la fonction des HSP's 70 est de restaurer, maintenir ou stabiliser la structure de protéines sensibles à la dénaturation par la chaleur et de défaire ou dissocier les agrégats de protéines par un mécanisme dépendant de l'ATP analogue à celui évoqué pour la HSC 70 (fig. 3).

1.3.2.2. La HSP 90.

Cette protéine est abondante dans le cytoplasme de cellules non stressées et elle est associée aux filaments d'actines (Koyasu et al., 1986). De plus, dans ces mêmes cellules, la HSP 90 est associée aux récepteurs stéroïdiens intracellulaires inactifs (Sanchez et al., 1987). Sanchez (1987) a montré que la chaleur, de même que les glucocorticoïdes étaient responsables de la dissociation entre l'HSP 90 et le récepteur. De cette dissociation résulte l'activation du récepteur qui peut dès lors se lier à des séquences régulatrices et permettre la transcription des gènes associés à ces éléments régulateurs (fig. 4).



Rôle des protéines de choc thermique lors de l'action des hormones stéroïdes sur la cellule cible (H : hormone, AH : anti-hormone).

Fig. 4 Interaction entre la HSP 90 et les récepteurs stéroïdiens intracellulaires. Mécanisme d'activation et d'inhibition de ces récepteurs (d'après Jamma, 1989).

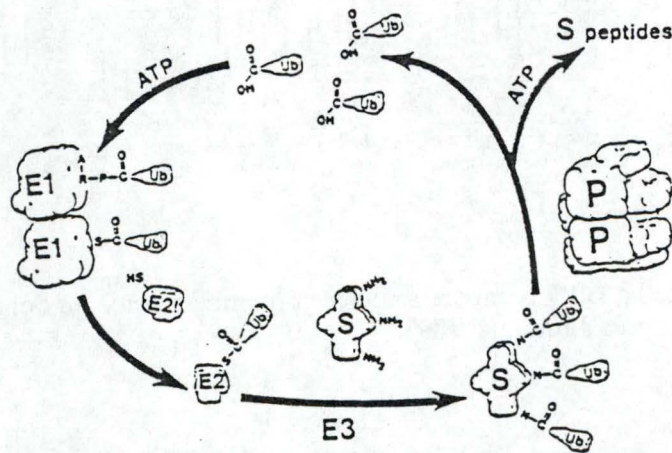


Fig. 5 Représentation schématique de l'activation de l'ubiquitine et de la protéolyse ATP-dépendante des substrats conjugués. Selon les connaissances actuelles, l'extrémité carboxy-terminale de l'ubiquitine (Ub) est activée par une enzyme dimérique (E1) et transférée sur une des nombreuses protéines porteuses (E2s) sous la forme d'un thiol ester réactionnel. L'ubiquitine est alors transférée sur les groupements aminés des résidus lysine du substrat devant subir la protéolyse (S) par une troisième enzyme (E3). Le substrat conjugué est ensuite hydrolysé par une grosse protéase ATP-dépendante (P) et l'ubiquitine est recyclée.

D'après Reichsteiner (1987).

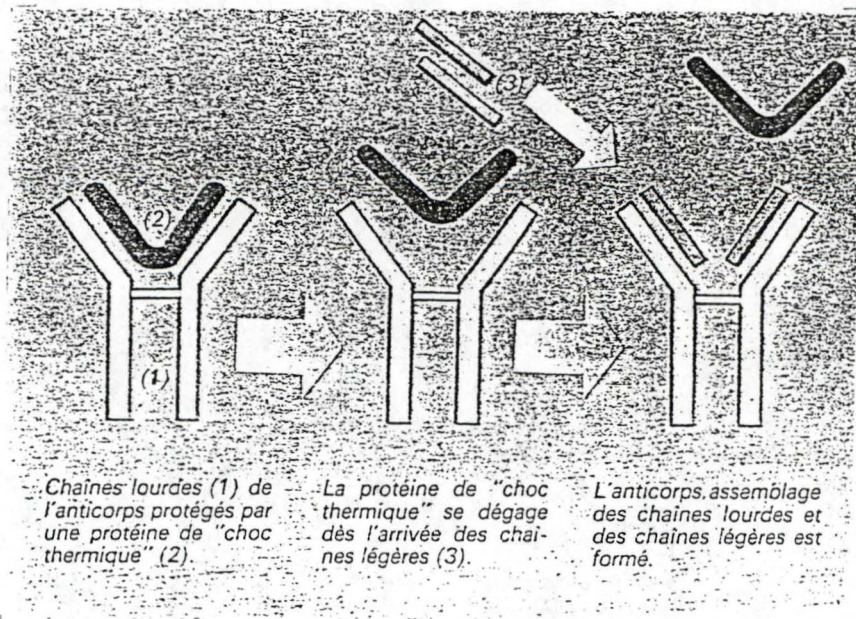


Fig. 6 Rôle de la BiP ou encore appelée protéine associée aux chaînes lourdes des Ig (d'après Jamma, 1989).

1.3.2.3. L'ubiquitine

L'ubiquitine sert de marqueur pour la dégradation des protéines (fig. 5) (Finley et al., 1985), mais c'est aussi une protéine de choc thermique (Bond, 1985; Finley et al., 1987; Neves et al., 1988) et ceci est loin d'être surprenant. En effet, un stress thermique a pour conséquence une augmentation du nombre de protéines plus ou moins dénaturées ou mal pliées. Il semble normal que la cellule réponde à cette accumulation par une stimulation du système de dégradation dépendant de l'ubiquitine.

L'ubiquitine permettrait aussi à certaines protéines dénaturées de retrouver leur conformation native à travers un cycle de conjugaison et de déconjugaison à ce marqueur (Finley et al., 1987).

1.3.2.4. L'HSP 110

Cette protéine est synthétisée par la plupart des cellules eucaryotiques. Elle est présente en abondance dans le cytoplasme de ces cellules non stressées (tout comme la HSP 90 et la HSC 70) (Lindquist et al., 1988) mais on la retrouve aussi en périphérie du nucléole de ces mêmes cellules (Welch, 1985). Welch et Suhan (1985) ont proposé que la HSP 110 serait impliquée soit dans l'arrêt des fonctions nucléolaires durant le stress, soit dans le retour aux fonctions normales du nucléole après la période de traumatisme.

1.3.2.5. Les GRP

Les GRP (Glucose Regulated Proteins) sont des protéines dont la synthèse est accrue par le manque de glucose et par la présence d'ionophores spécifiques du Ca^{2+} ou d'agents bloquant la glycosylation des protéines (pour une revue voir Lee, 1987).

Les GRP 78 et 94 sont apparentées respectivement aux HSC 70 (Munro et al., 1986) et à l'HSP 90 (Lee, 1987).

Munro et Pelhan (1986) ont démontré que la GRP 78 est identique à la BiP qui est une protéine associée aux chaînes lourdes des immunoglobulines (Ig) dans les cellules sécrétrices d'anticorps (fig. 6). La dissociation entre le BiP et les chaînes lourdes des Ig est stimulée par l'hydrolyse de l'ATP. Il semble évident que cette GRP, de même que la BiP, soit responsable de la stabilisation des protéines de sécrétions lors de leur passage à travers le réticulum endoplasmique (RE); elle préviendrait leur aggrégation et resolubiliserait les agrégats des protéines formés dans la RE.

a

PKQLIEN
 D. hsp70 (215 & 144) ATAAAGAAATATICTAGAA-----CTCGAGAAATIICTCGG
 (36 & 15) TTCTCGTTGCTICGAGAGAGCCGCTCGAATGIICTCGA
 O. hsp83 (35,25,15) ATCCAGAAAGCCICTAGAAAGTIICTAGAGACIICTAGTT
 O. hsp23 (97) CCGAGAAAGTIICTGTTTC
 O. hsp26 (13) TTCCGAGCTICICTAGAA
 X. hsp70 (72) CTGAGAAACIICTGAGTC
 Y. hsp30 (14) CTGAGAAAGTIICTAGAA
 S. hsp17 (28) CCGAGAAAGTIICTCGA
 H. hsp70 (80) CCGTGGAAATIICTCGAC

consensus C--GAA--ITC--G

b

1. GATTGGTCCTTAGCGTTCTGGCAGGTTCCAGAAGAAGG -35 Chicken hsp70
2. TGCAGCGCTCGAATCTTCCAGAGCTTTCTTTTCAACGC -339 Chick ubiquitin
- 3.* AATGCATCTAGGACCTTCTAGAACATTCTAAACGGCTG -1306 C.elegans hsp16
- 4.* CCTTTTGCAAGAAGCAGCTCGAATGTTCTAGAAAAAGG -3302
5. GAAGCCTCTAGAAGTTTCTAGAGACTTCCAGTTCGGGT -11 D.melano. hsp84
6. AAAATAAAGCGAATATTCTAGAATCCAAAAACAACTG -233 D.melano. hsp70
- 7.* TTGGCAGAAAAGAAAACCTCGAGAAATTTCTCTGGCCGTT -173
- 8.* TACTGCTCTCGTTGGTTCGAGAGAGCGCGCTCGAATG -55
- 9.* AGCGCGCTCGAATGTTTCGCGAAAAGAGCGCCGGAGTA -32
10. GCACACACACGAACTGACTGGAATGTTCTGACCCTTTC -41 D.melano. hsp68
- 11* TCCCAGAAAAGAAATGTCAAGAAGTTTCTGGTTCTTTC -324 D.melano. hsp27
- 12* CGCTGTGCCAGAAAGAGCCAGAAAGATGCGAGAGAAAAC -266
- 13* GTTCTTTTGCCTCTTTCTAGAAACTTCGGCTCTCTCA -512 D.melano. hsp26
- 14* CCTTTTCTGTCACTTTCCGGACTCTTCTAGAAAAGCT -224
- 15* CTGCTGTCTCGAAGTTTCGCGAATTTACTCCATCCTTC -382 D.melano. hsp23
16. CGTAATGCGGCAAATTCGAGAACTCTGCGATATTTTC -264
- 17* TTCAGCCCGAGAAGTTTCGTGTCCCTTCTCGTGTGAT -228
- 18* GAGAGCCCCAGAACTTCCACGGAGTTCGCTAAAGAAC -166 D.melano. hsp22
19. AAAGGGCGAAGAAAATTCGAGAGAGTCCGGTATTTTC -65
- 20* GTGAATCCCAGAAGACTCTGGAGAGTTCGAGCAGGGG -169 Human hsp70A
21. GACGGGAGGCCAAACCCCTGGAATATTTCCGACCTGGC -88
- 22* GGAGGAGCTAGAACCTTCCCGCGTTTCTTTCAGCAGC -229 Human hsp70B
- 23* CGATCCGCCCGAACCTTCTCCCGGGTCCAGCGCCGCGC -130
- 24* GACTGGGCGGGAAGGTGCGGGAAGTTTCGCGGCGGCGG -45
25. GAGAAGTCTGAAAGTTTATCGAATCATCTAAAACCTGCT -101 Soy hsp17
26. TATTTTCTGGAACATACAAGAGTATCCTTTCCTTCC -32
27. TTGCAAAACAGATTTTCTGGAACGTACACGATTATCC -42
28. ACTCTCTCGAGAAAGCTCGCGAATCTTCCGCGATTGTG -221 X.laevis hsp70
- 29* GACTGTCGCGAAACCTCGCGAAAGTTCTTCGGGTGAT -166
- 30* TAACGAAATGGAAGCCTCGGGAACCTTCGGGTGCGTTG -99
- 31* AAATTATTCTTCTTTTCCAGAACGTTCCATCGGCGGC -179 Yeast YG100

Fig. 7

Séquences nucléotidiques contenant le HSE chez différents gènes HS.
 a. Ancienne séquence consensius (d'après Lindquist, 1986).
 b. Séquence consensius de l'HSE proposée par Amin et al. (1988).

1.3.2.6. Résumé

On retrouve dans le cytoplasme les HSC 70 et HSP 90 et dans le RE les GRP 78 et 94. Or, Sorger et Pelham (1989) remarquèrent deux fonctions communes à ces deux compartiments cellulaires : l'acquisition de la conformation et l'assemblage de protéines oligomériques. Ces auteurs suggèrent que ces quatre protéines (HSC70, HSP90, GRP78 et 94) jouent un rôle dans l'assemblage de protéines dans des conditions non stressantes. En cas de stress, ces quatre mêmes protéines et leur partenaire inductible (c'est-à-dire la HSP70) joueraient un rôle supplémentaire dans le recyclage de protéines aberrantes et la stabilisation d'édifices protéiniques.

1.4. Régulation de la HSR

La régulation de la HSR est complexe et se situe à différents niveaux.

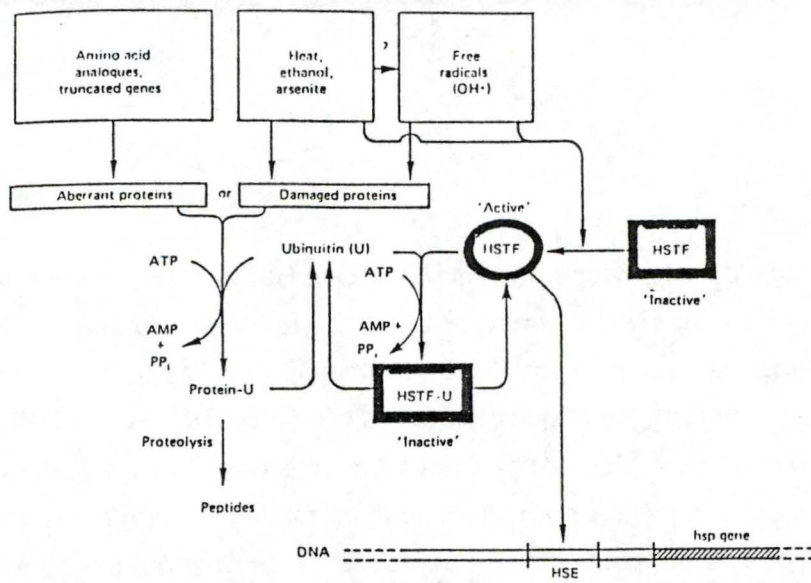
Le mécanisme d'induction apparaît comme hautement conservé au cours de l'évolution. En effet, quand on introduit par exemple les gènes de *Drosophila melanogaster* codant pour les HSP 70 dans les cellules de singes (Pelham, 1982), ou de souris (Corces et al., 1981) ils sont transcrits lorsque ces cellules receveuses sont soumises à des températures élevées.

1.4.1. Le HSE et les HSTF

Par la suite, les techniques de délétions ont permis de découvrir une séquence consensus (C-GAA-TTC-G) à l'extrémité 5' des gènes HS (fig. 7 a). Mais ce n'est que très récemment qu'Amin et al. (1988) démontrèrent que cette séquence, acceptée depuis plusieurs années comme régulant la HSR, ne joue en fait aucun rôle dans cette régulation. Actuellement, ils proposent comme élément de régulation (ou HSE : Heat Shock Element) des éléments modulaires d'une périodicité de cinq nucléotides constitués de blocs GAA ou TTC multiples généralement alternés avec deux nucléotides d'intervalles. Pour être fonctionnel, un HSE doit posséder au moins trois de ces blocs (fig. 7 b).

Cet HSE, situé en amont de la TATA box, est un site de fixation de protéines. En effet, on montra par exemple lors d'expérience de digestion du DNA que le HSE est protégé uniquement lors d'un traitement à la chaleur, tandis que la TATA box est protégée de la digestion avant et pendant le choc thermique (Wu, 1984).

Depuis lors, des protéines se liant aux HSE ont été isolées chez la *Drosophile* et *Saccharomyces cerevisiae* (Wiederreck et al., 1987). Ces protéines sont dénommées Heat Shock Transcription Factors ou HSTF.

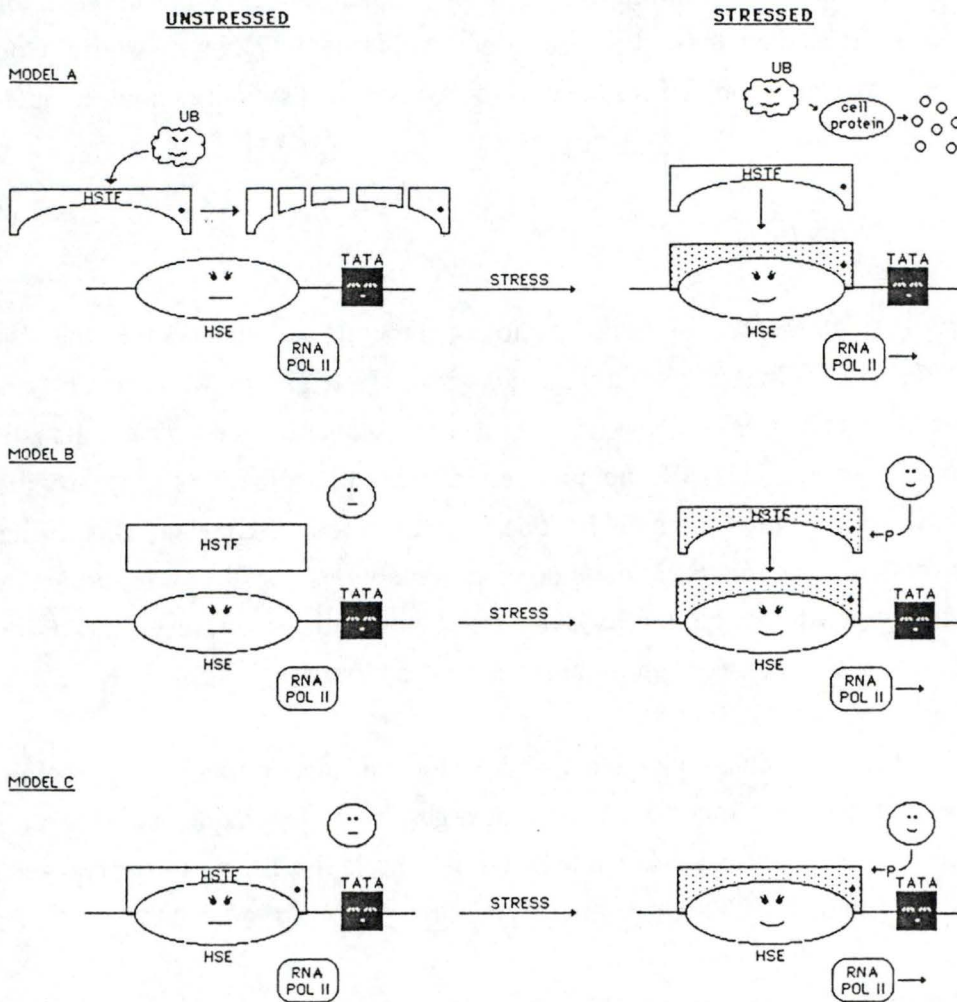


Possible means whereby the presence of damaged cellular proteins might signal the induction of hsp gene transcription

The introduction of truncated genes into mammalian cells, or treatment with amino acid analogues, will result in the synthesis of aberrant proteins. Other treatments, such as heat or ethanol, may damage cell proteins by denaturation, or by mechanisms involving free radicals. Aberrant or damaged proteins are then recognized by the ATP-requiring ubiquitin-dependent degradation system. However, a suggestion is that the normally 'inactive' form of heat shock transcription factor (HSTF) is in an ubiquitinated state; thus the depletion of the cellular levels of free ubiquitin due to any increases in levels of aberrant or damaged protein will lead to a rise in the levels of non-ubiquitinated HSTF. This may be the 'active' form. Alternatively, other mechanisms which do not involve ubiquitin may bring about the structural alteration of 'inactive' HSTF to 'active' HSTF (e.g. denaturation, free radical damage, proteolytic cleavage).

Fig. 8

Mécanisme d'induction de la HSR selon l'hypothèse émise par Findley et Ananthan (d'après Burdon, 1986).



Idealized models for possible mechanisms involved in the *trans*-activation of heat shock genes. Model A: ubiquitin-mediated proteolytic competition model. UB: ubiquitin-ATP-dependent protease. Model B: Post-translational modification of HSTF prior to binding (*Drosophila*, HeLa). Model C: Post-translational modification of HSTF *in situ* (yeast).

Fig. 9

Variantes du modèle d'induction de la HSR (d'après Tanguay, 1988).

1.4.2. Mécanismes impliqués lors de la réponse à un choc thermique

La HSR est une reprogrammation immédiate, complexe et transitoire des activités cellulaires, une série de mécanismes ont donc été invoqués pour expliquer cette réponse physiologique.

1.4.2.1. Mécanismes d'induction

Finley (1984) observa une déficience de l'expression des HSP's chez des cellules eucaryotiques présentant une carence dans la voie de proteolyse dépendant de l'ubiquitine et Ananthan (1986) induisit la HSR en injectant des protéines dénaturées. Suite à leurs expériences, ces auteurs proposèrent le mécanisme d'induction suivant (fig. 8).

Dans des conditions normales, les HSTF seraient maintenus dans une forme ubiquitinée et seraient ainsi inactifs. Lors d'un traitement thermique, d'une exposition à l'éthanol ou suite à un mécanisme impliquant des radicaux libres, il y aurait production de protéines dénaturées ou endommagées. Ces protéines aberrantes seraient alors reconnues par le système de dégradation dépendant de l'ubiquitine entraînant une déplétion d'ubiquitines libres et donc une augmentation d'HSTF non ubiquitinés c'est-à-dire actifs.

Il existe cependant des variantes de ce modèle (fig. 9). Tout d'abord, chez la levure, Sorger (1987) montre que la liaison entre la HSE et le HSTF est identique chez les cellules stressées ou non. De plus, dans des expériences plus récentes, Sorger (1988) suggère que l'expression des gènes HS chez la levure est modulée par la phosphorylation des HSTF liés au DNA. De même chez la Drosophile et les cellules HeLa, il est plus que probable que se soit la phosphorylation du HSTF qui lui permet de se lier au HSE (Tanguay 1988).

Quant aux procaryotes, il semble que ce sont des dinucléotides polyphosphatés, produits au cours d'un stress oxydatif ou thermique (Bochner et al., 1984; Lee, 1983), qui agiraient comme alarmones (molécules de faibles poids moléculaire synthétisées en réponse à un stress spécifique et jouant de manière homéostatique pour augmenter la probabilité de survie cellulaire) et déclencheraient la synthèse des HSP's (Varshovsky, 1983; Lee, 1983). Cependant, d'après Guédon (1986), cette corrélation entre l'accumulation de ces dinucléotides polyphosphatés et la HSR n'existerait pas chez les cellules eucaryotiques.

1.4.2.2. Mécanismes intervenant au cours de la HSR

Une série d'expériences ont montré qu'un choc thermique est responsable de l'inhibition de l'épissage (processus de maturation des ARN messagers) (Yost et Lindquist, 1986; Bond, 1988). Or comme les gènes HS sont exempts d'intron, leurs ARNm peuvent être traduits sous de telles conditions. De plus, il semble que la chaleur induit la désagrégation des polysomes et donc l'inhibition de la traduction (Daucan, 1984). Enfin, un traitement thermique, appliqué à des procaryotes, augmente le niveau cellulaire du facteur σ^{32} (facteur σ^{HS} d'un poids moléculaire de 32 kDa) tout en diminuant la quantité de facteur σ^{70} ou encore facteurs σ des cellules non stressées (Skelly, 1987).

Toutes ces observations nous expliquent donc en partie pourquoi suite à ces chocs thermiques, la synthèse des protéines constitutionnelles diminue tandis qu'on assiste à une véritable explosion de la synthèse du HSP's.

1.4.2.3. Pourquoi le HSR est-elle un phénomène transitoire ?

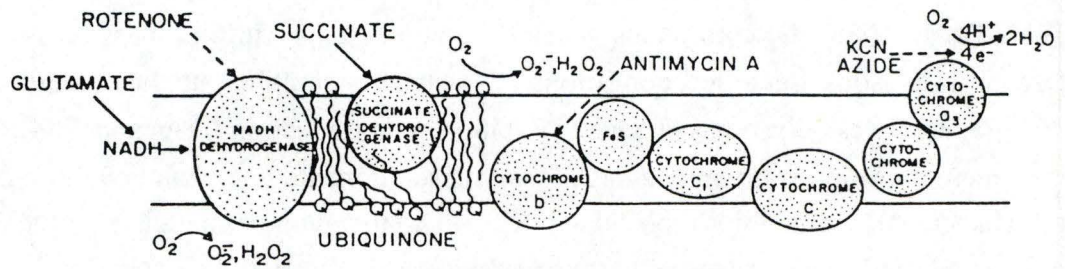
Chez les procaryotes, le facteur σ^{70} est une HSP (Skelly, 1984 et 1985). Donc, la compétition entre les facteurs σ^{32} et σ^{70} tournera, après un certain temps, en faveur du facteur σ^{70} . C'est pourquoi il y aura à nouveau une transcription des ARNm non HS.

Chez les eucaryotes, il ne faut pas oublier que l'ubiquitine est aussi une HSP (Bond, 1985; Finley et al., 1987, Neves et al., 1988). Dès lors, même si au début de la HSR on assiste à une carence en ubiquitine, la cellule voit le pool de son marqueur de dégradation régénérer assez rapidement et les HSTF seront à nouveau rendus inactifs car de nouveau ubiquitinés.

1.4.2.4. Les inducteurs de la HSR

La HSR n'est pas uniquement induite lors de l'exposition à des températures supraoptimales, mais aussi par toute une série d'autres agents et stress. Parmi ceux-ci se retrouvent l'éthanol (Burdon et al., 1987), les métaux lourds (Cajone et al., 1988). H_2O_2 chez la drosophile (Courgeon, 1988) et chez *S. typhinurium* (Morgan et al., 1986) de même que l'hypoxie suivie de la reperfusion (Li et al., 1982).

MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT



Mitochondrial free radical generation. Major source of mitochondrial free radicals is electron transport chain located on inner mitochondrial membrane. Mitochondrial sources of O₂⁻ have been studied using various electron transport inhibitors (rotenone, antimycin

A, KCN, and azide, *dashed arrows*) and substrates (NADH-linked substrates and succinate, *solid arrows*). NADH dehydrogenase and ubiquinone-cytochrome b region have been shown to reduce oxygen to O₂⁻, which in turn serves as precursor for H₂O₂ and OH⁻.

Fig. 10 Génération de radicaux libres au cours du transport mitochondriale des électrons (d'après Freeman et Crapo, 1982).

2. Sress oxydatifs et enzymes antioxydantes

2.1. Introduction

Non seulement il existe des chocs thermiques, mais aussi des stress oxydatifs et ce d'autant plus que tous les organismes, mis à part ceux ayant optés pour une vie anaérobie, exigent de l'oxygène pour produire de l'énergie. Or, l'O₂ est un promoteur des réactions radicalaires.

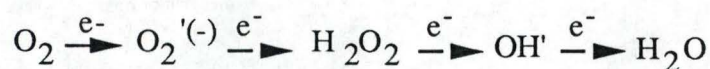
Nous allons donc examiner successivement ce que sont les radicaux libres, les dangers qu'ils représentent pour les organismes vivants et les protections que les cellules ont développées pour s'en protéger.

2.2. Les radicaux libres

2.2.1. Définition

Les radicaux libres peuvent être définis comme des molécules ayant un électron non apparié. L'électron célibataire procure à la molécule une réactivité élevée. Ces molécules peuvent être formées par des processus de fission (A:B → A· + B·) ou par des réactions de transferts d'électrons (A:· + B → A· + B⁻). Les radicaux libres sont produits *in vivo* comme sous produits du métabolisme normal c'est-à-dire au cours de réactions d'oxydo-réductions et lors d'exposition à des radiations ionisantes (Slater, 1984).

La grande majorité des radicaux libres proviennent de l'O₂. Ces dérivés actifs sont produits par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire (Halliwell et Gutteridge, 1985):



2.2.2. Sources des radicaux libres

- Tous les organismes aérobies produisent des radicaux libres dérivés de l'O₂ lors
- de l'oxydation de petites molécules telles que les thioles, hydroquinones ou flavines qui en réduisant l'O₂ produisent des radicaux superoxydes (O₂^{·-}) (Freeman et Crapo, 1982).
 - de l'activité de certaines enzymes cytoplasmiques telles que les oxydases (Chance, 1979)
 - du transport d'électrons dans la mitochondrie (fig. 10) . Ce sont la NADPH déshydrogenase et la région ubiquinone cytochrome b qui sont responsable de la réduction

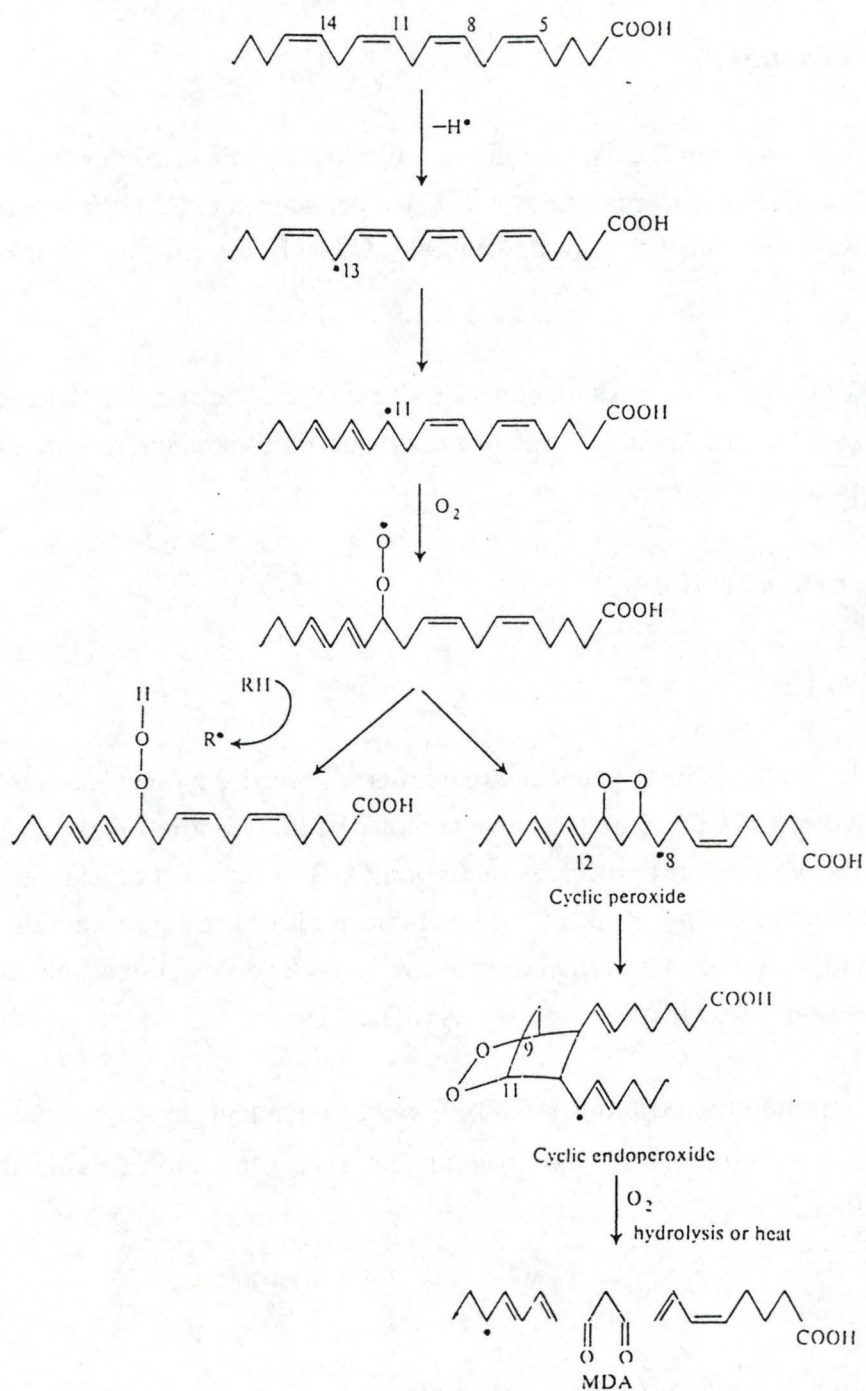


Fig. 11 Formation d'hydroperoxydes lipidiques et de peroxydes cycliques suite à la peroxydation lipidique (d'après Halliwell et Gutteridge, 1985).

de l'O₂ en O₂^{•-}. O₂^{•-} sera alors transformé en H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) et en OH[•] (le radical hydroxyle) (Freeman et Crapo, 1982).

- de la métabolisation de certains médicaments, carcinogènes ou xénobiotiques (Freeman et Crapo, 1982).

De plus, le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire externe possèdent toutes deux les cytochromes P450 et 65 qui sont aussi capables de produire des dérivés actifs de l'O₂ (Chance, 1979); quant aux peroxysomes, de part leur concentration élevée en oxydases, ils sont aussi une source potentielle d'hydroperoxydes produits à partir de l'O₂^{•-} (Freeman et Crapo, 1982).

2.2.3. Toxicité des radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules très réactionnelles. C'est pourquoi ils peuvent être responsables d'une série de réactions remettant en question l'homéostasie cellulaire.

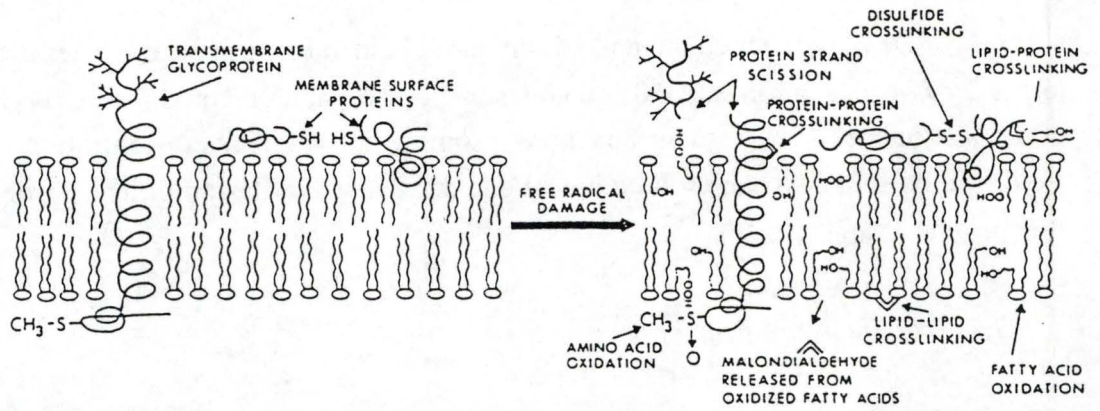
2.2.3.1. Peroxydation lipidique (fig. 11)

Le radical hydroxyle peut initier la peroxydation lipidique en arrachant un H[•] à un acide gras polyinsaturé. Après des délocalisations électroniques successives, un O₂ réagit avec le radical lipidique pour donner un peroxyde lipidique radicalaire capable à son tour d'arracher un H[•] à un autre acide gras polyinsaturé pour former un hydroperoxyde lipidique et un nouveau radical lipidique. C'est l'étape de propagation. (Kappus, 1985). Par la suite, l'hydroperoxyde lipidique ainsi formé pourra donner, via la formation de peroxydes cycliques, des aldéhydes de tailles diverses dont le malondialdéhyde ou MDA (CHO-CH₂-CHO). Les différents radicaux lipidiques peuvent aussi réagir entre eux pour former des produits non radicalaires (Freeman et Crapo, 1982).

De plus, au cours de cette peroxydation lipidique, des liens lipides-protéines et protéines-protéines se créent entre autre suite à la formation du MDA (fig. 12) (Freeman et Crapo, 1982).

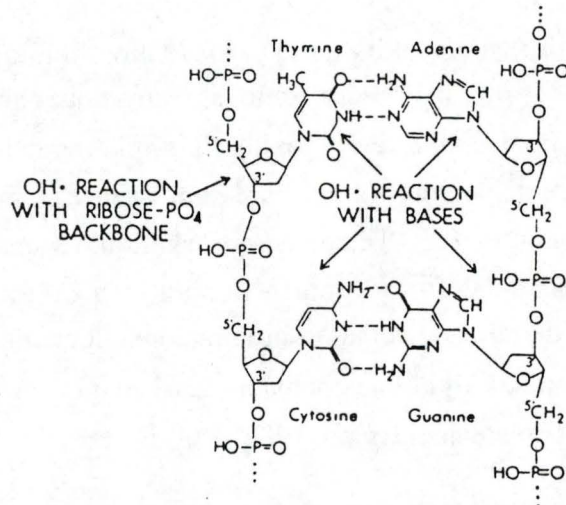
2.2.3.2. Les Protéines

De part la réactivité des radicaux libres, de molécules insaturées ou contenant des groupements sulfhydryles, les acides aminés histidine, tryptophane, tyrosine, phenylalamine, méthionine et cystéine peuvent subir des modifications et par conséquence, il en va de même pour les protéines comprenant ces acides aminés (AA). Ainsi, des enzymes possédant un



Free radical damage to membranes. Free radicals can affect lipids by initiating peroxidation, which leads to short chain fatty acyl derivatives and the by-product malondialdehyde. Variety of cross-linking reactions can be mediated by malondialdehyde reactions. Free radicals can also catalyze amino acid oxidation, protein-protein crosslinking, and protein strand scission.

Fig. 12 Al \acute{e} ration des membranes suite \grave{a} la peroxydation lipidique (d'apr \acute{e} s Freeman et Crapo, 1982).



Reaction of DNA with hydroxyl radical. Hydroxyl radical can react with and modify DNA bases. DNA strand scission also results from OH· reaction with ribose-phosphate backbone.

Fig. 13 Sch \acute{e} ma illustrant les r \acute{e} actions engendr \acute{e} es par le radical hydroxyle avec l'ADN (d'apr \acute{e} s Freeman et Crapo, 1982).

ou plusieurs de ces AA dans leurs sites actifs risquent d'être inactivés s'ils sont exposés à des agents générant des radicaux libres (Sies, 1986).

La proline, quant à elle, constitue une cible préférentielle pour l'hydrolyse des liens peptidiques lors de réactions impliquant des dérivés actifs de l'oxygène (Wolff et al., 1986).

Pour finir, des protéines hémiques telles que l'hémoglobine peuvent être inactivées par l'oxydation de leur Fe^{2+} lors de la réduction de $O_2^{\cdot-}$ ou de H_2O_2 (Freeman et Crapo, 1982).

2.2.3.3. Acides nucléiques et ADN (fig 13)

Les radicaux libres peuvent aussi réagir avec les bases puriques et pyrimidiques. Mais ils sont aussi responsables de la scission de brins d'ADN soit par élimination du phosphate d'un ribose phosphate, soit en réagissant directement avec le ribose (Schulke - Frahlind et Van Sonntag, 1985). Il en résulte donc des mutations qui entraînent parfois la mort cellulaire (Freeman et Crapo, 1982).

2.3. Les enzymes antioxydantes

Face au danger que représente les radicaux libres, les cellules ont mis au point une série de mécanismes antioxydants afin d'assurer leur survie. Parmi ceux-ci, figurent des systèmes non-enzymatiques tels que la vitamine C, la vitamine E, la glutathion, l'acide urique, etc. (Halliwell et Gutteridge, 1985); mais aussi une série d'enzymes comme la catalase, la glutathione peroxydase, la superoxyde dismutase.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes uniquement intéressés au système de défense enzymatique.

2.3.1. La catalase

La catalase est présente dans tous les types cellulaires de mammifères. Dans la plupart des cas, on la retrouve dans les peroxysomes, mais elle est parfois présente dans le cytoplasme, les microperoxysomes et les mitochondries (Chance, 1979).

L'enzyme, composée de 4 sous unités de 60 000 Da chacune, possède en son site actif une protoporphyrine- Fe^{3+} .

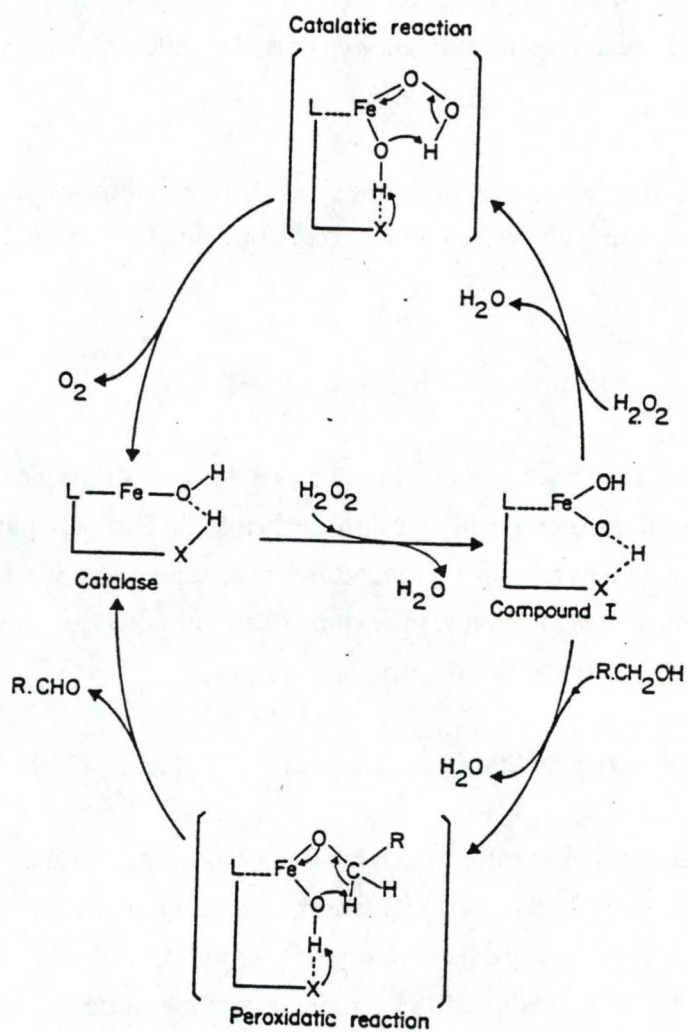
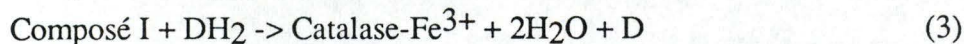
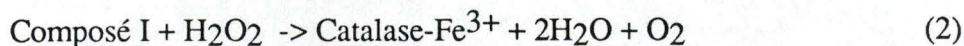


Fig. 14 Schéma illustrant le mode d'action de la catalase tel que le propose Chance et al. (1979).

La catalase présente deux modes de fonctionnement :

- une fonction catalytique lorsque la concentration en peroxyde d'hydrogène est élevée (équations 1 et 2),
- une fonction peroxydasique quand l'H₂O₂ est présent en faible concentration (équations 1 et 3).



D étant le donneur d'hydrogène (par exemple, un alcool qui s'oxyde en aldéhyde).
(Chance, 1979)

La figure 14 représente le mécanisme de la réaction proposé par Chance en 1979.

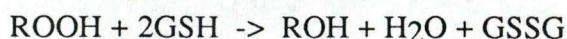
L'enzyme ne peut utiliser comme substrat que le peroxyde d'hydrogène ainsi que les méthyl- et éthyl-hydroperoxydes. Les hydroperoxydes lipidiques d'ordres supérieurs, tels que la *ter*Butylhydroperoxyde, ne peuvent réagir qu'avec la glutathione peroxydase.

Enfin, il est intéressant de remarquer que l'activité de cette enzyme augmente linéairement avec la concentration en H₂O₂ disponible. Cela permettant à la cellule de contrôler sa quantité de peroxyde d'hydrogène (Chance, 1979).

2.3.2. La Glutathione peroxidase (Gpx)

La Gpx est une sélénoenzyme tétramérique d'un poids moléculaire de 84 000 Da, contrairement à la catalase, elle est capable de réduire une variété d'hydroperoxydes y compris les hydroperoxydes lipidiques (Ladenstein et al., 1979). On retrouve cette enzyme dans le cytoplasme et la mitochondrie dans un rapport de trois pour une (Flohé, 1982).

La réaction générale catalysée par l'enzyme est la suivante :



Le glutathion (GSH) est le donneur unique d'électrons ce qui différencie la Gpx des autres peroxidases qui acceptent une série de donneur d'e⁻ (Flohé, 1982).

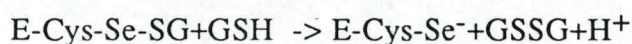
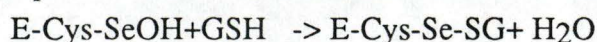
Chaque sous-unité possède un atome de Sélénium au niveau du site actif. Cet atome est lié de manière covalente à une cystéine dont le soufre a été substitué par le Se (Ladenstein, 1979). Cette sélénocystéine serait située à la surface du site actif. Cela pourrait expliquer la grande spécificité d'hydroperoxyde que l'enzyme peut réduire, ceci étant

probablement renforcé par l'abondance d'acides aminés hydrophobes et aromatiques présents autour de ce site (Flohé, 1982).

La réaction détaillée est la suivante (Flohé, 1982).

1ère étape : oxydation d'un séléniol ionisé par un hydroperoxyde conduisant à la formation d'un acide séléinique : $E-Cys-Se^{-}+H^{+}+ROOH \rightarrow E-Cys-SeOH+ROH$.

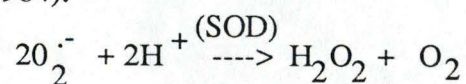
2ème étape : régénération du séléniol par 2 réactions consécutives impliquant l'acide séléinique et le GSH via la formation d'un sélénosulfide entre l'enzyme et le GSH :



Pour être complet, il faut tenir compte de la régénération du GSH. Cette réduction est catalysée par la glutathion reductase qui oxyde le NADPH produit par la voie des pentoses phosphates (Halliwell et Gütteridge, 1985).

2.3.3. La superoxyde Dismutase (SOD)

La dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en H_2O_2 et O_2 est une réaction spontanée mais elle peut être aussi catalysée par un enzyme : la superoxyde dismutase (Hassan, 1984).

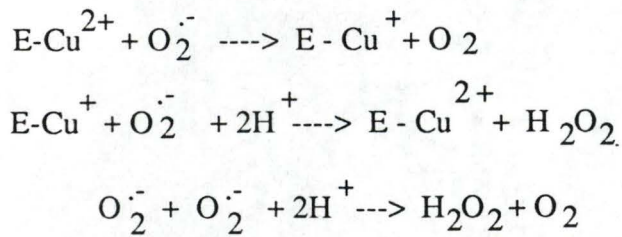


Contrairement à la catalase et à la Gpx, la SOD existe sous une variété de formes différentes (Fridovich, 1985).

. La CuZnSOD

Cette enzyme, présente dans le cytoplasme de tous les eucaryotes, a un poids moléculaire de 32000 et est constituée de 2 sous-unités, chacune comprenant un ion zinc et un ion cuivre. Il est probable que l'enzyme se localise aussi dans l'espace intermembranaire des mitochondries (Fridovich, 1986).

L'ion cuivre catalyse la réaction de dismutation.



Le Zn²⁺ ne servirait qu'à stabiliser l'enzyme.

La séquence en AA de la CuZnSOD a été déterminée chez la levure, les erythrocytes humains et bovins. Elles sont très similaires les unes par rapport aux autres (plus de 50% d'homologie) (Fridovich, 1986).

. La MnSOD

Cette enzyme est le plus souvent présente sous forme dimérique chez les procaryotes, mais elle est toujours tetramérique chez la levure et chez les organismes supérieurs. Le manganèse est nécessaire à l'activité de l'enzyme, mais les mécanismes de la réaction semblent plus complexes que ceux de la CuZnSOD. (Halliwell and Gutteridge, 1985).

Cette enzyme, présente dans la matrice mitochondriale et dans le protoplasme chez les procaryotes, possède une séquence en AA extrêmement conservée au cours de l'évolution. Ces séquences sont par ailleurs totalement indépendantes de celles du CuZnSOD. (Halliwell et Gutheridge, 1985).

. La FeSOD

Cette enzyme se retrouve chez de nombreux procaryotes le plus souvent sous une forme dimérique. Le poids moléculaire de ses sous unités est comparable à celui de la MnSOD (c'est-à-dire environ 23 000 Da). On la retrouve aussi dans quelques familles de plantes supérieures (Fridovich, 1986).

Le fer serait à l'état de repos sous la forme 3⁺ et il oscillerait probablement entre les états 3⁺ et 2⁺ durant le cycle catalytique (Halliwell et Gutteridge, 1985).

2.3.4. Rôle bénéfique des enzymes antioxydantes

Le rôle bénéfique de ces 3 enzymes a déjà été testé au sein de notre laboratoire en examinant la protection qu'ils procurent aux cellules soumises sous une atmosphère riche en O₂ (Michiels et al., 1986; Raes et al., 1987), ou en présence d'inhibiteurs des enzymes

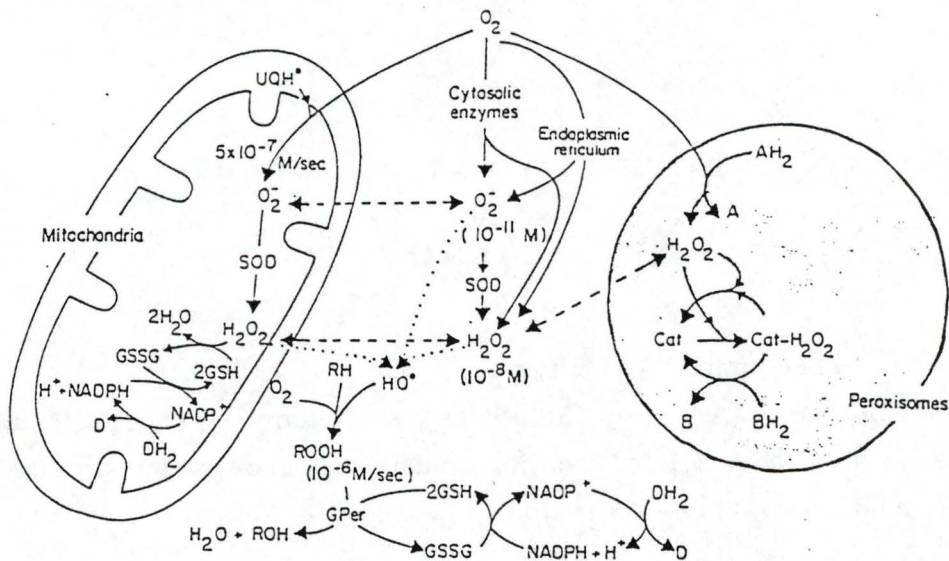


FIG. 1. General scheme of roles of catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in different subcellular locations. Concentrations and formation rates of oxygen metabolites are estimated. UQH·, ubiquinone radical; GSSG, oxidized glutathione; GSH, reduced glutathione; DH₂ and D, a nonspecific NADP reducing system; SOD, superoxide dismutase; NADPH and NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; O₂⁻, superoxide anion; HO·, hydroxyl radical; ROOH, an alkyl hydroperoxide; GPx, glutathione peroxidase; Cat, catalase; B and BH₂, hydrogen donors of a specificity appropriate to catalase, such as ethanol.

Fig. 15 Schéma générale des réactions catalysées par la catalase, la Gpx et la SOD et les interactions possibles entre ces enzymes (d'après Chance et al., 1979).

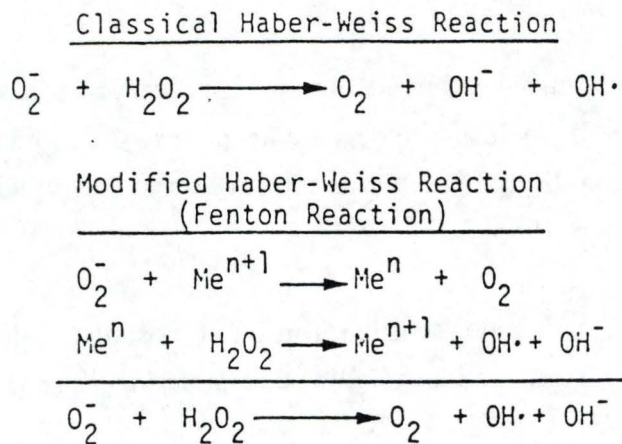


Fig. 16 Réaction d'Haber-Weiss et de Fenton produisant le radical hydroxyle (d'après Halliwell et Gutteridge, 1985).

antioxydantes (Michiels et al., 1988 a). Ce rôle fut mis en évidence par des expériences de microinjection des enzymes ou de leurs anticorps respectifs (Michiels et al., 1988 b).

La figure 15 (Chance, 1979) illustre les localisations respectives de ces 3 enzymes; on se rend compte que ces localisations sont complémentaires et assurent à la cellule une protection efficace lui permettant de survivre.

En effet, l' O_2 entrant dans la cellule peut être réduit en $O_2^{\cdot-}$ dans la mitochondrie. Ce dérivé actif de l' O_2 est éliminé du cytoplasme et de la mitochondrie par la SOD ou d'autres agents réducteurs non enzymatiques tels que la vitamine E (ou α -tocopharol) et l'acide ascorbique (ou vitamine C). Mais la dismutation du radical superoxyde produit une autre molécule toxique : l' H_2O_2 . Cette molécule est détruite dans la mitochondrie par la Gpx, et dans le cytoplasme par le Gpx et la catalase. Pour finir, l' $O_2^{\cdot-}$ et l' H_2O_2 peuvent produire de l' OH^{\cdot} (radical hydroxyde) par la réaction de Fenton (fig. 16). L' OH^{\cdot} est un inducteur de la peroxydation lipidique, mais ici intervient à nouveau la Gpx, capable de réagir avec les peroxydes lipidiques.

2.3.5. Induction des enzymes antioxydantes

Il existe un certain nombre d'arguments qui démontrent que les enzymes antioxydantes sont inductibles. Mais actuellement, on ne connaît rien sur les mécanismes de cette régulation .

Chez les procaryotes, Hassan et Fridovitch (1977) ont mis en évidence une induction de la catalase et de la SOD chez *E.coli* et *S.typhimurium* lors du passage à la vie aerobic. Christman et al. (1985) ont remarqué que 30 protéines sont induites lors de l'adaptation de *S.typhimurium* à l' H_2O_2 . Parmi ces protéines 9 sont sous le contrôle d'un régulon impliqué dans la défense contre les radicaux libres. Un mutant de ce régulon (appelé OxyR) surexprime l'activité des enzymes antioxydantes et est résistant à une variété d'agents oxydants, tandis que dans des cellules où ce regulon est délété, le taux de mutations spontanées a grandement augmenté (Christman et al., 1985).

Chez les eucaryotes, Galiazza (1987) a montré une induction de l'activité de la Gpx chez la levure suite à l'exposition à l' H_2O_2 . Crapo et Tierney (1974) ont constaté une augmentation de l'activité de la SOD au niveau des poumons de rats exposés 5 jours à une atmosphère composée de 85% d' O_2 . Ils montrèrent aussi en 1974 que des rats préalablement sensibilisés survivaient à une atmosphère d' O_2 pur. Frank (1978) constata que la tolérance des rats immatures à une toxicité pulmonaire due à une exposition à 95% d' O_2 est plus importante que chez les adultes. Cette tolérance accrue chez les rats nouveaux-nés est due à une augmentation plus rapide de l'activité des enzymes antioxydantes. (Frank, 1985).

Asayana(1985) observe une augmentation de l'activité de la MnSOD chez des monocytes humains lors d'une stimulation par des lipopolysaccharides bactériens. Les polymorphonucléaires et les macrophages alvéolaires de cobayes montrent également une augmentation de l'activité de la SOD lorsqu'ils sont soumis à une hyperoxie, mais l'activité de la catalase et la Gpx diminuent (Rister et al., 1976). Ce même type de stress a le même effet sur l'activité enzymatique chez des cellules endothéliales de cobaye, mais Housset et Junod (1982) ont prévenu la diminution de l'activité de la Gpx, sans pour autant l'accroître, en ajoutant dans le milieu de la Sélénométhionine.

Mais les stress oxydatifs ne sont pas les seuls capables d'induire un accroissement de l'activité des enzymes antioxydantes chez les procaryotes et les eucaryotes. Un stress thermique est capable d'induire le même effet. Par exemple, chez *E.coli*, il y a l'induction de la SOD suite à un HS (Privalle et al., 1987). Morgan et al (1986) observèrent une augmentation de l'intensité du spot de l'alkyl hydroperoxyde reductase après un traitement thermique chez *S. typhimurium*. Quant à Kapoor (1987, 88), il montra qu'un choc thermique accroissait l'activité peroxydasique et de la SOD chez *Neurospora crassa*. Pour finir, après hyperthermie des cellules d'embryon de souris voient l'activité des 3 enzymes antioxydantes augmentées (Omar, 1987).

3. Relation entre chocs thermiques et stress oxydatifs

Comme nous venons de le constater, d'une part les Heat Shock Proteins sont induites lors d'hyperthermies, mais ils pourraient aussi l'être par des stress oxydatifs, d'autre part, les enzymes antioxydantes sont induites par des stress oxydatifs mais certaines pourraient l'être lors de certains chocs thermiques. De plus, nous avons vu que toute accumulation de protéines aberrantes ou dénaturées pourrait jouer un rôle important dans la HSR. Or, et les chocs thermiques et les stress oxydatifs contribuent à l'accumulation de protéines modifiées.

Dès lors, deux questions se posent, auxquelles nous essayerons de répondre dans le cadre de ce mémoire :

- existe-t-il une relation entre ces deux types de stress,
- les enzymes antioxydantes qui protègent les cellules en cas de stress oxydatifs jouent-elles aussi un rôle dans les chocs thermiques. Et si oui, peuvent-elles être considérées comme HSP's ?

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons le modèle des fibroblastes humains WI-38 en culture. Ces cellules seront soumises et à différents chocs thermiques et à différents stress oxydatifs. Pour chaque stress, nous suivrons l'induction éventuelle des

HSP's, par les techniques des gels d'électrophorèses à 1 et 2 dimensions, et l'activité de la catalase, de la glutathione peroxydase et de la superoxyde dismutase.

MATERIELS ET METHODES

1. Culture cellulaire

Toutes nos expériences ont été réalisées sur des fibroblastes humains WI-38 dérivés du poumon foetal et obtenus à l'American Type Culture Collection. Ces cellules sont cultivées en flacon de culture de 75 cm² (Cel-Cult) et repiquées selon la méthode décrite par Hayflick (1965).

Nos expériences ont été effectuées sur des cultures arrivant à confluence. Mais, selon le type d'expérience, la quantité de cellules nécessaire à leurs réalisations variait : les fibroblastes ont été cultivés dans des boîtes de 75 cm² pour les dosages enzymatiques et autres, et dans des boîtes de 25 cm² pour les expériences d'autoradiographie.

De plus, une série de travaux ont montré la dépendance de la Gpx envers le Sélénium (Se) (Scott et al., 1977). Il semble que la quantité de Se, présente dans le milieu de culture ou la nourriture, influence le niveau des ARN messagers de cette sélémoenzyme (Saedi et al., 1988). Dès lors, afin d'être certain que le Sélénium ne soit pas un facteur limitant au cours de nos expériences, nous avons décidé d'en ajouter dans le milieu de culture pendant la génération précédent les stress. Celui-ci était additionné sous la forme de Sélénométhionine à une concentration de $2.10^{-7}M$ (Housset et al., 1983).

2. Dosages

Les cellules ont été raclées dans un ml de PBS par boîte de 75 cm², homogénéisées en *Dounce tight* puis centrifugées à 39 000 RPM pendant 30 min à 4°C (Beckman L2 65B, rotor type 40) afin d'obtenir un surnageant à partir duquel l'activité des différentes enzymes a été mesurée.

2.1. Dosages des protéines

Les protéines ont été dosées selon la méthode de Lowry (1951).

2.2. Dosage de la Catalase

Le dosage et le calcul de l'activité sont réalisés sur la méthode décrite par Baudhuin et al. (1964). Son principe est d'ajouter du peroxyde d'hydrogène dans le surnageant cellulaire et d'en mesurer la quantité restante après 45 min d'incubation en le fixant à l'oxysulfate de titane, ce qui permet un lecteur ou spectrophotomètre (Zeiss, West Germany, Spectrophotometer PM6).

L'activité enzymatique est calculée de la manière suivante :

$$\log\left(\frac{\text{Valeur BIS lue} - \text{Valeur BIBI lue}}{\text{Valeur test lue} - \text{Valeur BI Enz lue}}\right) \times \left(\frac{5,2 \times \text{dil}}{0,1 \times 45 \times 50}\right) = \text{unité/ml}$$

Valeur BIS = valeur obtenue pour les tubes où l'on met du peroxyde d'hydrogène mais pas de surnageant

Valeur BIBI = valeur obtenue pour les tubes où l'on ne met ni H₂O₂ ni surnageant

Valeur test = valeur obtenue pour les tubes contenant de l'H₂O₂ et du surnageant

Valeur BI Enz = valeur obtenue par les tubes contenant du surnageant mais pas d'H₂O₂

L'unité est définie comme étant la quantité d'oxygène qui dans un volume de 50 ml diminue en une minute le log de la concentration en H₂O₂ de 1.

Par la suite l'activité sera rapportée en unité par microgrammes de protéines du surnageant. C'est ainsi que l'on définit l'activité spécifique de l'enzyme.

2.3. Dosage de la Glutathione peroxydase

Le dosage et le calcul de l'activité sont réalisés selon une méthode établie par Mbemba et al.(1985) et améliorée par Pigeolet et al.(1986).

Le principe de cette méthode repose sur la mesure du spectrophotomètre (Perker-Elmer 557) de la décroissance de l'absorbance du NADPH à 366 nm. Cette diminution résulte de l'activité de la glutathione réductase qui en réduisant le GSSG ,formé par l'activité de la Gpx ,oxyde le NADPH. Le substrat utilisé lors de ce dosage est le ter-Butylhydroperoxyde (tBHP) (Aldrich-Europe).

L'activité se calcule ensuite grâce à la formule ci-dessous :

$$\frac{\Delta\text{DO}/\text{min} \times 10 \times \text{dilution}}{6,22 \times 1,667} \mu \text{ noles} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$$

L'unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzymes oxydant une mole de NADPH par min. à 25°C.

Comme pour la catalase, on calcule par la suite l'activité spécifique de la Gpx, c'est-à-dire l'activité exprimée par mg de protéines.

2.4. Dosage de la Superoxyde Dismutase (SOD)

La méthode utilisée pour ce dosage consiste en une mesure de l'activité par chemoluminescence mise au point par Corbisier et al.(1987).

Il s'agit d'un couplage entre un système de production d'anions superoxydes (par la xanthine oxydase qui, tout en oxydant la xanthine en acide urique, réduit l'O₂ en ions superoxydes) et une synthèse de détection de ces ions superoxydes par la mesure de la chemoluminescence de la lucigénine à l'aide d'un luminomètre Lumac (Biocounter M2010).

L'activité de la SOD se calcule en pourcentage d'inhibition de la réaction de chemoluminescence par rapport au mélange réactionnel sans SOD.

Comme pour les deux enzymes précédentes, cette activité enzymatique est transformée en activité spécifique.

2.5. Dosage du Malondialdehyde

Le dosage du malondialdehyde (MDA) repose sur une méthode décrite par Placer (1966). On incube pendant 30 min. à 95°C l'homogénat avec de l'acide thiobarbiturique (TBA) dilué et de l'acide trichloroacétique (TCA) 10%; ce dernier sert à précipiter les protéines. On centrifuge 10 min à 15 000 RPM dans une centrifugeuse Janetski et on lit l'absorbance à 532 nm du complexe MDA-TBA qui se trouve dans le surnageant.

2.6. Titrage du Peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂)

On ajoute à une solution d'H₂O₂, 30 ml d'H₂O et 5 ml d'H₂SO₄ 1N. Cette solution est titrée avec du KMnO₄ 0,1N jusqu'à ce que la solution devienne d'un rose puissant.

3. Stress cellulaire

Les cellules ont été soumises à une série de chocs thermiques et de stress oxydatifs.

3.1. Chocs thermiques

Les boîtes de 75 cm² sont immergées soit dans un bain thermostaté à 41,5; 42; 42,5 ou 43°C pendant 75 min, soit à 45°C pendant 20 min. Ensuite, elles sont remises à l'étuve à une température de 37°C pendant des temps variables.

3.2. Stress oxydatifs

Il existe une multitude de stress oxydatifs, nous nous sommes cependant limités à deux peroxydes : le tBHP dont l'action sur les fibroblastes a été bien étudié par O. Toussaint (non publié).

3.2.1. Stress oxydatifs au tBHP

Pour réaliser le stress oxydatif au tBHP, le milieu de la boîte est décanté, puis on ajoute 10ml (par 75 cm²) de tBHP, dilué dans du PBS à une concentration de $8 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} ou $2 \cdot 10^{-3}$ M. Après 15 min d'incubation, le support sur lequel se trouve les fibroblastes est rincé 2 fois avec 10ml de PBS (toujours pour une surface de 75 cm²) et enfin, on remet 15 ml de milieu de culture contenant 10% de serum de veau foetal et du Sélénium à une concentration de $2 \cdot 10^{-7}$ M. Les cellules sont remises à 37°C.

3.2.2. Stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène

La procédure suivie pour ce traitement est la même que celle appliquée pour le stress oxydatif au tBHP. Il n'y a que la concentration en H₂O₂ qui varie. Celles-ci sont de 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} et 10^{-3} M.

3.3. Traitement des cellules pour le dosage des enzymes anti-oxydantes

Que les cellules aient été soumises à un choc thermique ou à un stress oxydatif, elles seront traitées de la même manière pour le dosage des enzymes antioxydantes. Après le stress, les cellules sont remises à 37°C et puis râclées à des temps variables. Elles seront alors homogénéisées, centrifugées et le surnageant congelé à - 70°C avant le dosage.

3.4. Traitement des cellules pour l'analyse des protéines de choc thermique

Etant donné que l'analyse des protéines de choc thermique se fait par électrophorèse sur gel d'acrylamide révélé par autoradiographie, les cellules requièrent quelques manipulations supplémentaires. Le milieu de culture est remplacé par le milieu ne contenant ni méthionine, ni glutamine (Gibco), additionné de sérum de veau foetal (10%) et auquel on a rajouté de la glutamine ($2.10^{-4}M$ final) et de la méthionine ^{35}S (10 μ l par boîte de 25 cm^2).

Pour les chocs thermiques, ce milieu contenant la méthionine radioactive est ajouté soit avant, soit après le stress et pour les expériences de stress oxydatifs, ce milieu est rajouté immédiatement après le stress oxydatif.

Après des temps variables, les cellules sont rincées 2 fois avec 5 ml de PBS contenant de la méthionine froide à 0,02%, puis lysées avec 200 μ l de tampon de lyse dont la composition sera donnée dans le paragraphe consacré aux gels d'électrophorèse.

4. Techniques utilisées pour les gels à une et deux dimensions

Cette technique a été mise au point par O'Farrel (1975) et modifiée par Lecocq (non publié).

4.1. Solutions nécessaires à la réalisation des électrophorèses

La plupart des produits utilisés ont été fournis par la firme Bio Rad.

A = tampon de lyse :

Urée (9,5M) (Janssen Chemica)	22,8g
Nonidet P40 (2%W/V) (Sigma)	0,8g
Servalyte 40% pH 7.9 (20% (Serva)	2,0ml
Dithiothreitol	616,0 mg
H ₂ O	20,4ml

B = Acrylamide :

Acrylamide	5,676g
Bisacrylamide	0,324g
Porter à 20 ml par H ₂ O, ajouter de la résine (AG 501-X8) et agiter pendant 20 min.	

C = solution de recouvrement des gels :	
Urée	4,8g
Porter à 10ml par H ₂ O	
D = solution de recouvrement :	
Urée	0,96g
Servalyte 40% pH 7-9	50,0μl
Nonidet P40	100,0mg
β mercaptoethanol	100,0μl
H ₂ O	1,4ml
E = Electrolytes pour la première dimension :	
Anode : Acide orthophosphorique 85% (Merk)	1,36ml
Porter à 2000ml avec H ₂ O	
Cathode : H ₂ O dégazée	580,0ml
NaOH 1N	24,0ml
F = Gels (pour 6 gels IEF (= isoelectrofocusing)) :	
Urée	3,7g
Acrylamide (B)	0,9ml
NP40 10%	1,35ml
H ₂ O	0,9ml
Traiter cette solution à la résine pendant 20 min puis filtrer.	
Servalyte (5.7)	270,0μl
Ampholine (5-7)	270,0μl
Servalyte (2-11)	135,0μl
Persulfate NH ₄ 12%	39,5μl
Dégazer la solution pendant 5 min.	
TEMED (Merck)	4,5ml
G = tampon SDS	
Glycerol 87 % (Merck)	50,0g
β Merceptoethanol	25,0ml
SDS	10,0g
Tris 0,5 pH 6,8	3,78g
H ₂ O	400,0ml
Ajuster à pH 6,8 par HCl 25% (7,7N) et porter à 500ml par H ₂ O	
H = Acrylamide :	
Acrylamide	292,0g
Bisacrylamide	8,0g
H ₂ O	700,0ml
Porter à 1 litre par H ₂ O	
I = Tampon pour gels de séparation :	
Tris	181,7g
H ₂ O	700,0ml
Ajuster à pH 8,8 par HCl 6N et porter à 1L par H ₂ O	
J = Tampon pour gels de concentration :	
Tris	6,057g
H ₂ O	80,0ml
Ajuster à pH 6,8 par HCl 6N et porter à 100ml par H ₂ O	

K = Solution d'agarose 1% :	
Agarose	1,0g
Bleu de bromophenol	2,0mg
H ₂ O	100,0ml
Porter à 80°C. Quand l'agarose est fondue aliquoter	
L = Electrolyte pour la deuxième dimension	
Tris	18,18g
Glycerine	86,49g
SDS	6,0g
H ₂ O	5,910L
M = Gel de séparation (pour 2 gels)	
Acrylamide 6% :	
solution H	13,2ml
tampon I	16,6ml
H ₂ O	35,6ml
Persulfate NH ₄ 10%	220,0µl
Dégazer pendant 5 min. et refroidir	
SDS 10%	660,0µl
TEMED	11,0µl
Acrylamide 16% :	
Glycerol 87%	12,0g
solution N	35,2ml
tampon I	16,6ml
H ₂ O	3,8ml
Persulfate NH ₄ 10%	122,8µl
Dégazer pendant 5 min. et refroidir	
SDS 10%	660,0µl
TEMED	12,2µl
N = Gel de concentration (pour 2 gels)	
solution H	3,4ml
tampon J	5,6ml
H ₂ O	13,3ml
Persulfate NH ₄ 10%	48,0µl
Dégazer pendant 5 min.	
SDS 10%	225,0µl
TEMED	17,4µl

4.2. Marche à suivre pour la réalisation des électrophorèses

4.2.1. Traitement de l'échantillon

Toutes les électrophorèses ont été réalisées sur des échantillons de lysats cellulaires présentant des radioactivités comparables. Pour les gels à deux dimensions, on dépose généralement un échantillon correspondant à 500 000 CPM, pour les gels à 1 dimension, on descend jusqu'à 100 000 CPM/puits. La radioactivité des différents lysats cellulaires à analyser doit donc être préalablement déterminée.

Pour ce faire, nous avons suivi la démarche suivante. Après avoir centrifugé le lysat pendant 5 min à 14 000 RPM à la centrifugeuse Janetski, on prélève du surnageant 5 µl que l'on ajoute à 45 µl d'H₂O. 20 µl de cette solution sont déposés sur un filtre Watman qui est ensuite lavé dans du TCA 15% pendant 15 min puis successivement rincé dans de l'eau,

du méthanol et de l'acétone. Le filtre est ensuite séché et puis déposé dans une fiole contenant 5 ml d'aqualuma. On compte le nombre de CPM présent dans ce filtre dans un compteur à scintillation (Beckman). Les échantillons à déposer sur les gels seront par la suite dilués correctement dans le tampon de lyse.

4.2.2. Première dimension : électrofocalisation (IEF)

Les tubes font 15 cm de long et ont un diamètre intérieur de 2 mm. Les gels seront coulés sur une hauteur de 13 cm. La cuve vient de chez BioRad (Model 175 Tube Cell).

Lavage des tubes : ils sont lavés dans du détergent (Decontamin 20 ml/l) pendant une nuit, puis traités par de l'HCl 0,1N pendant une heure à ébullition et ensuite rincés à l'eau distillée et séchés à l'air.

Polymérisation de la première dimension : les tubes sont fermés à l'extrémité inférieure par du Parafilm. Les gels sont coulés sur une hauteur de 13 cm à l'aide d'une seringue munie d'un fin cathéter et ensuite recouvert d'un peu de tampon C.

Préfocalisation : lorsque les gels ont polymérisés, on retire le Parafilm et la solution C. On dépose 20µl de A surmonté d'un peu de NaOH(E). Les tubes sont introduits dans la cuve de telle façon qu'ils trempent d'environ 5mm dans l'anolyte (acide phosphorique) (E) (qui occupe la cuve inférieure). La cuve supérieure est alors remplie par le catholyte (E). L'ampérage et la tension sont réglés au maximum. Le voltage est fixé à 200V pendant 15 min, 300V pendant 30 min, 400V pendant 30 min et 500V pendant 30 min.

Focalisation isoélectrique : le liquide du sommet des tubes est enlevé et ceux-ci sont rincés par A. On y dépose ensuite un volume d'échantillons contenant 500 000 (cpm) (c'est-à-dire si possible un volume de 10 à 15 µl) surmonté de 10 µl de D puis de NaOH. L'ampérage et la tension sont maximum, le voltage est fixé à 500V pendant 16h puis à 1000V pendant 1h.

Après l'électrophorèse, les gels sont extraits des tubes en injectant de l'eau à l'aide d'une seringue et placés dans la solution G pendant 30 min. Les gels peuvent être congelés à -70°C dans cette solution.

4.2.3. Deuxième dimension

Appareil : la cuve vient de chez BioRad (Protean II, Mults Cell). La longueur totale des gels est de 20 cm de long sur 20 cm et d'une épaisseur de 1,5 mm.

Polymérisation des gels SDS : le gradient est coulé par le haut grâce à un système à gradient (BioRad, Model 295, Gradient Former) et une pompe péristaltique (Gilson, Minipuls 2) à 2 sorties réglées sur un débit d'environ 5 ml/min. Le gradient est coulé sur une hauteur de 18,5 cm et recouvert d'isobutanol (Carlo Erba) pendant la polymérisation. Si ces gels ne sont pas utilisés directement, ils peuvent être gardés 15 jours à 4°C à condition d'être recouverts de la solution suivante (10ml de solution I + 30 ml H₂O + 0,04g SDS).

Gel de concentration : les gels sont rincés par la solution décrite ci-dessus puis recouverts du gel de concentration surmontés d'un bâtonnet en plexiglas ayant les mêmes dimensions que les gels IEF. Ce bâtonnet est utilisé pour que le gel de concentration forme une gouttière lors de la polymérisation. Cela permettra au gel IEF de s'y appliquer exactement.

Dépôt de la première dimension : le gel IEF est déposé sur le gel de concentration et scellé par 540µl d'agarose (solution K).

Electrophorèse : la cuve inférieure est remplie de tampon L de sorte que les gels y soient immergés de quelques mm. On remplit la cuve supérieure de ce même tampon et on lance l'électrophorèse. Elle se fait à 360V pendant 4 à 5 heures jusqu'à ce que le bleu de bromophenol ait atteint le bas du gel. Pendant tout ce temps, les plaques sont refroidies à 5°C.

Après l'électrophorèse, les gels sont retirés et traités pour l'autoradiographie.

4.2.4. Gels à une dimension

Nous avons régulièrement réalisé des électrophorèses en une dimension. Voici les quelques détails se différenciant de la deuxième dimension.

- les gels ne sont plus coulés que sur une hauteur de 16,5 cm
- les gels de concentration sont aussi coulés sur le reste de la hauteur mais on y plonge un peigne qui définira les puits lors de la polymérisation.
- on remplit la cuve supérieure de tampon L avant de déposer les échantillons des puits préalablement traités de la manière suivante :
 - Diluer 2 fois les échantillons de la solution J
 - Porter à ébullition pendant 1 min les échantillons additionnés de β Mercaptoethanol 12% (10µl pour 100µl d'échantillon).

- Déposer dans les puits une quantité d'échantillons représentant 100 000 CPM (le volume de cette solution ne doit pas si possible dépasser 15 μ l). Dans les puits extérieurs on dépose 10 μ l de Bleu de Bromophenol afin de suivre la migration et le puits central est réservé aux étalons radioactifs (Amersham); on y dépose 10 μ l c'est-à-dire plus ou moins 0,05 mCi.
- le reste de la manipulation ne varie pas.

4.3. *Traitement des gels pour l'autoradiographie*

Après l'électrophorèse, les gels sont plongés dans un bain d'acide acétique 7% pendant 10 min, puis dans 3 bains successifs de DMSO (Dimethylsulfoxyde, Janssen Chemica) 100% pendant 30 min pour chaque bain.

Les gels sont laissés toute une nuit dans une solution de DMSO-PPO 30% (PPO = 2,5 Diphenyloxayole Scintillation Grade, Janssen Chemica).

Le lendemain, les gels sont rincés à l'eau courante pendant 1 h puis séchés sous vide à 70°C pendant 4 heures puis 1 h à température ambiante.

Les gels sont alors placés dans des cassettes (Kodak X-Omatic) en présence d'un ou deux films pour autoradiographie (Amersham, films MP). Les cassettes sont alors placées à - 70°C pendant 3 ou 8 jours (respectivement pour les gels à une dimension et deux dimensions) avant la révélation.

4.4. *Révélation du film photos*

Solution :

Révéléateur (R) : Kodak D19	(80 ml dans 200 ml H ₂ O)
Fixateur (F) Hypam	(50 ml dans 200 ml H ₂ O)

Méthode :

Les solutions sont utilisées à 18°C.

Plonger les films à révéler 4 min dans révélateur, puis les rincer à l'eau distillée 3-4 fois avant de les plonger 4 min dans le fixateur. Enfin, les films photos sont abondamment rincés à l'eau.

RESULTATS

1. Choc thermique

Avant d'étudier l'évolution de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes suite à un choc thermique, nous avons vérifié si les fibroblastes humains WI-38 induisent bien une HSR lors d'un tel traitement.

1.1. Analyse des HSP's

Pour ce faire, nous les avons soumis à une gamme de températures comprises entre 41,5 et 42°C pendant 75 min et à 45°C pendant 20 min. La méthionine radioactive fût additionnée au milieu de culture soit juste avant le stress soit juste après.

La photo du gel obtenue par autoradiographie (fig. 2) montre clairement l'induction de la synthèse d'au moins 3 HSP's et cela pour tous ces traitements. Grâce à l'utilisation d'étalons radioactifs, nous avons pu déterminer le poids moléculaire de ces protéines (fig. 1). Les HSP's synthétisées par les fibroblastes WI-38 suite à un stress thermique, appartiennent aux trois familles des protéines de choc thermique, décrites au cours de l'introduction, puisque leurs poids moléculaires respectifs sont de 40kDa, 72kDa et 82kDa. Il semblerait que les HSP's 42 et 82 soient des protéines constitutives mais pas la HSP 72. En ce qui concerne leur induction, c'est la protéine majeure de choc thermique c'est-à-dire la HSP 72 qui voit sa synthèse la plus augmentée, tandis que la HSP de faible poids moléculaire n'est que très faiblement induite; l'accroissement de la HSP 82 étant intermédiaire aux deux autres protéines de stress.

Ensuite, afin de pouvoir suivre l'évolution des HSP's au cours des quelques heures suivant le choc thermique, nous avons traité les cellules à une température de 42°C pendant 75 min et étudié la production de ces protéines au cours des trois heures suivant la période de stress. Les résultats obtenus (fig. 3) démontrent que les HSP's sont bel et bien produits pendant la durée du traitement et qu'elles restent présentes pendant les quelques heures succédant au choc thermique.

Par la suite, nous avons réalisé des électrophorèses en deux dimensions afin d'obtenir une résolution plus grande des gels. Nous espérons ainsi découvrir de nouvelles protéines de stress et/ou des isoformes des HSP's obtenues précédemment. La simple analyse visuelle de gels permet de distinguer, assez facilement, pour les cellules exposées à un choc thermique (fig. 5), 3 spots dont, soit l'intensité, soit la présence les différencient du gel témoin (fig. 4). Il est probable que ces taches correspondent aux 3 HSP's observées sur

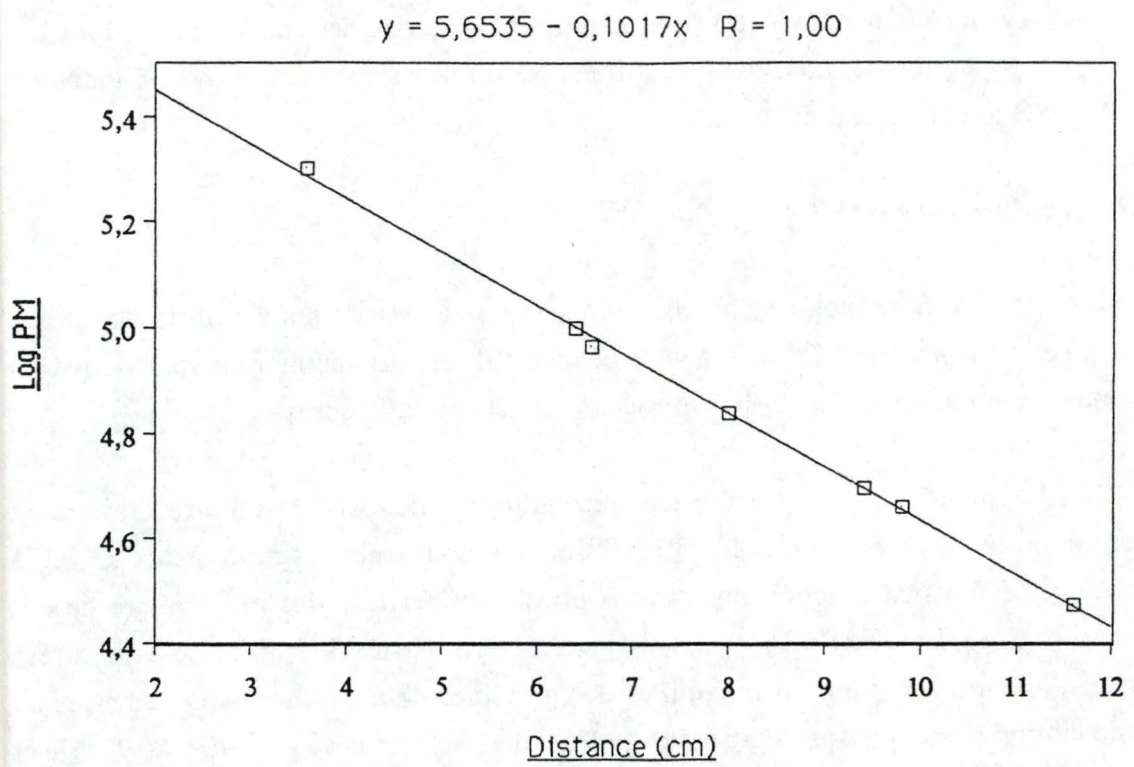


Fig. 1 Droit d'étalonnage obtenue à partir de la fig. 2.

les gels à une dimension, mais l'absence d'étalons ne nous permet pas de le certifier pour l'instant.

De plus, vu la complexité de ces derniers gels, il faudra attendre pour identifier l'ensemble des HSP's un programme d'analyse d'image. Ce programme est actuellement mis au point par V. HENIN dans le cadre d'un mémoire à l'Institut d'Informatique .Il devra nous permettre de comparer plusieurs gels entre eux de manière qualitative et quantitative.

1.2. Analyse des enzymes antioxydantes

Nous avons alors suivi l'activité enzymatique de la catalase, la glutathione peroxydase et la superoxyde dismutase suite à un choc thermique de 75 min à 42°C (fig. 6). Pour ces 3 enzymes, l'activité juste après le stress est inférieure à celle le précédant. Ensuite, elles augmentent très légèrement au cours de la première heure succédant à la période de traitement. Le tableau I donne les pourcentages d'augmentation des activités 1h après le stress, pour la catalase et la Gpx et 2 heures après pour le SOD.

Nous avons également vérifié si les chocs thermiques que nous appliquions aux cellules n'induisaient pas une dégénérescence des fibroblastes. Nous n'observons qu'une faible mortalité cellulaire (fig. 7) et l'examen morphologique, du moins en contraste de phase, ne révèle pas les modifications morphologiques classiquement associées à une dégénérescence cellulaire.

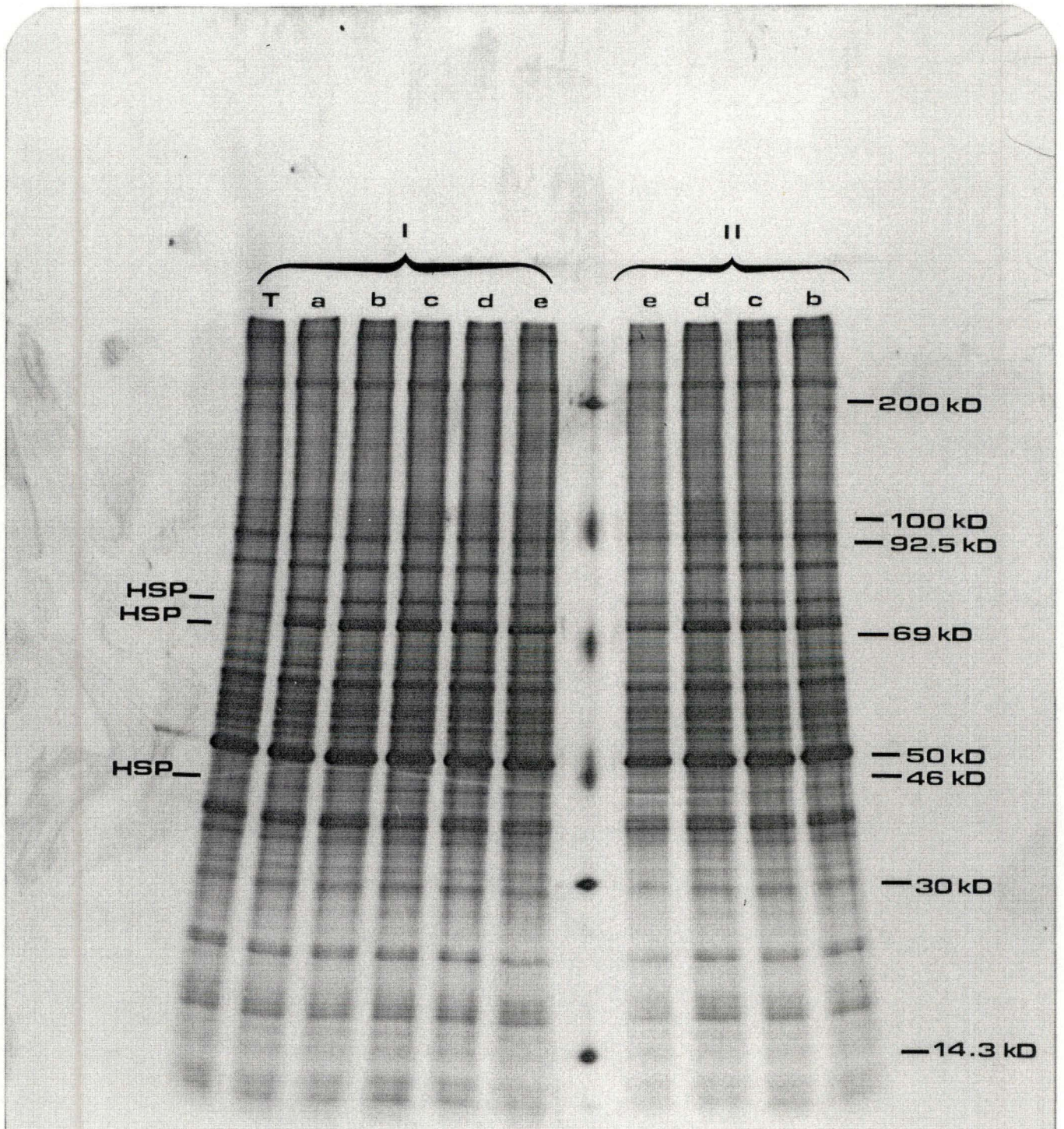


Fig. 2 Induction des HSP's après un choc thermique chez les fibroblastes de 41^{ème} génération. Les cellules ont été traitées 75 min. à des températures de 41,5°C (a), 42°C (b), 42,5°C (c), 43°C (d) et 20 min. à 45°C (e) puis remises à 37°C pendant deux heures avant d'être lysées. La méthionine ³⁵S a été ajoutée au milieu soit juste après le stress (I) soit juste avant (II). Les cellules témoins (T) sont restées à 37°C.

Pour chaque échantillon, un volume équivalent à 100 000 cpm a été déposé dans un puits et analysé sur gel de polyacrylamide-SDS.

Les flèches indiquent la position des HSP's identifiées. Les PM des étalons sont de 200; 100; 92,5; 69; 50; 46; 30 et 14,3 Da.

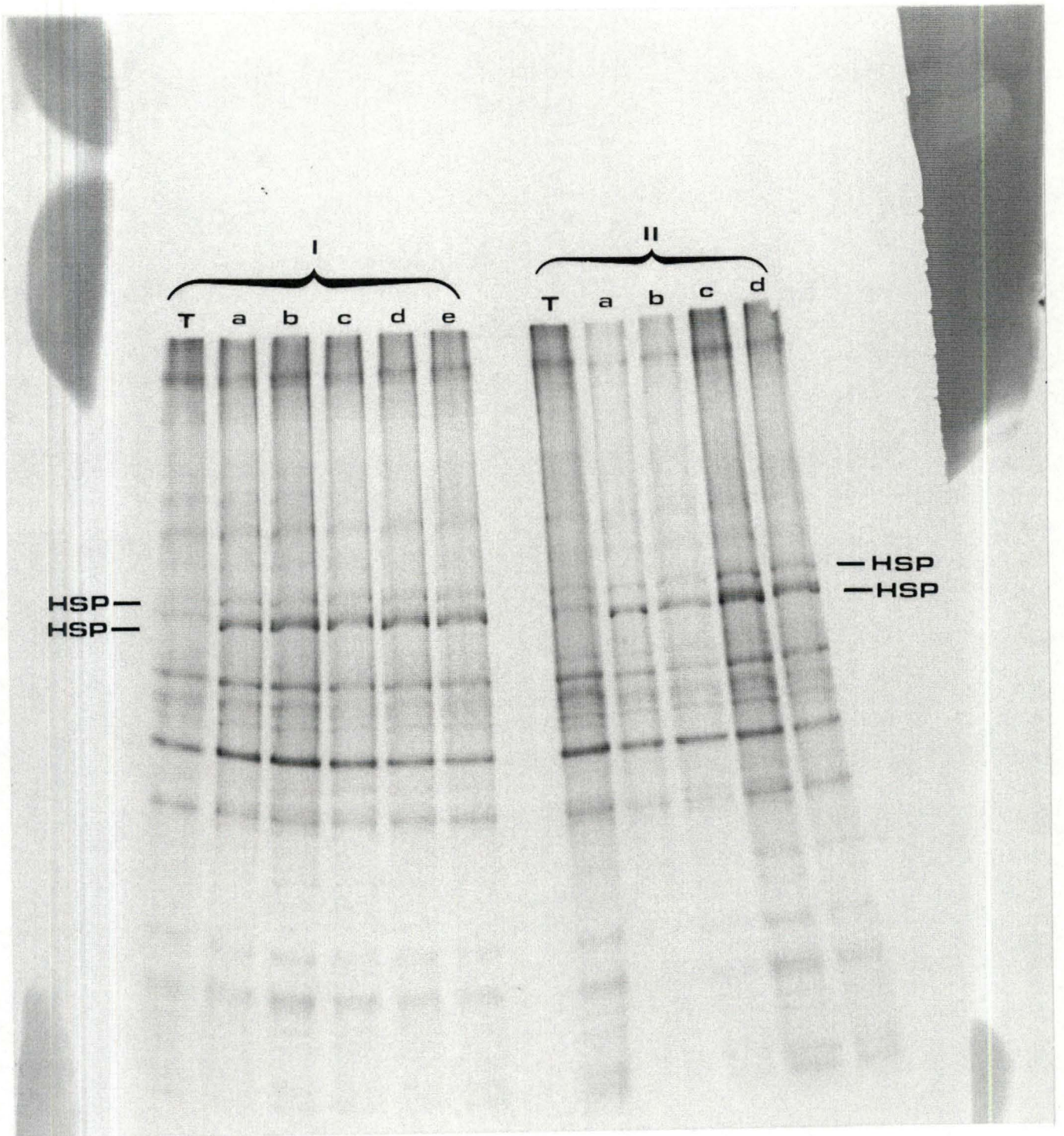
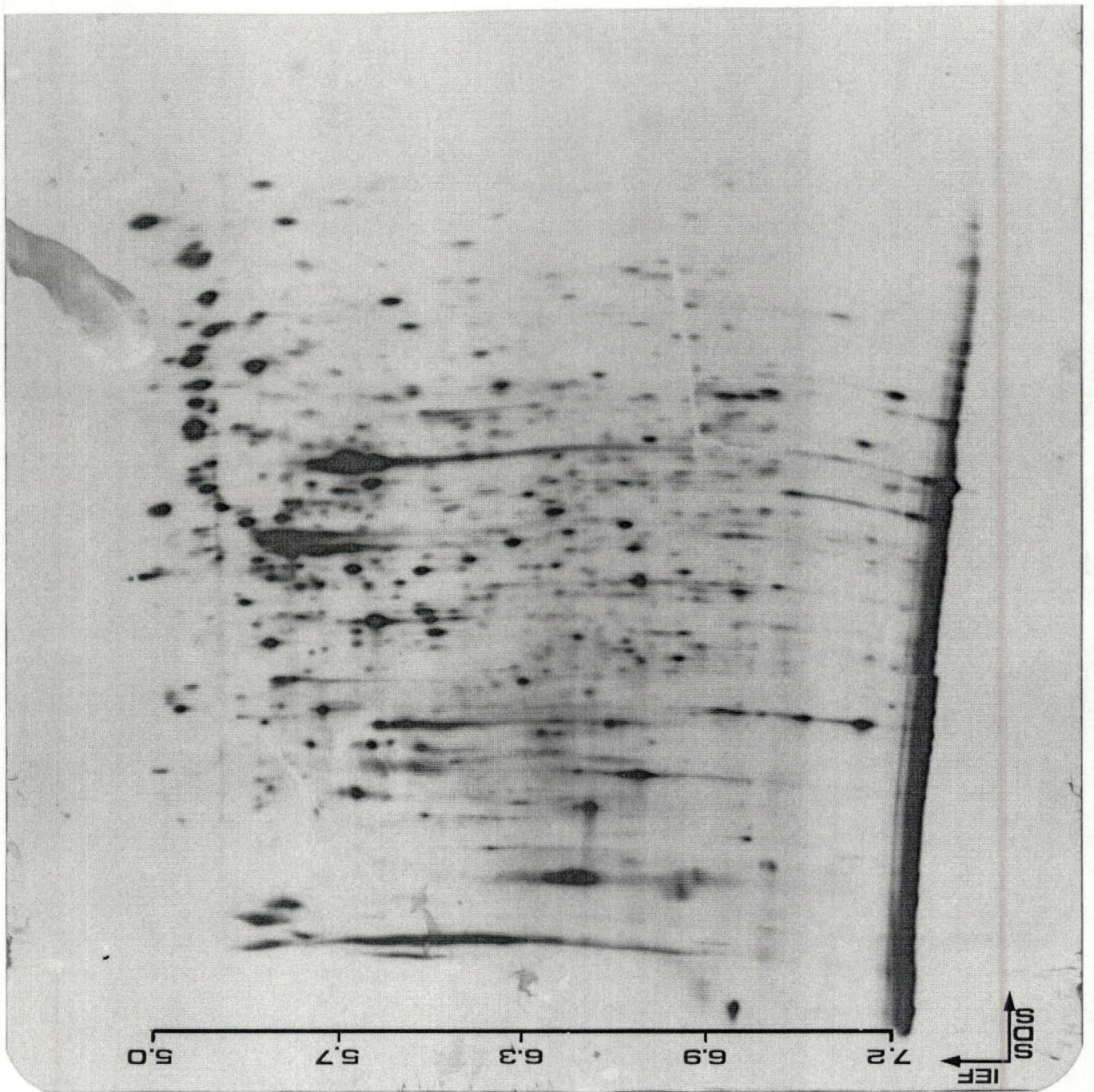


Fig. 3 Induction des HSP's après un choc thermique chez des fibroblastes de 42^{ème} génération. Les cellules ont été traitées 75 min. à 42°C puis remises à 37°C et lysées à différents temps après le stress : 0h(a), 0,5h(b), 1h(c), 2h(d) et 3h(e). La méthionine ³⁵S a été ajoutée au milieu de culture soit juste avant le stress (I) soit juste après (II). T = cellules témoins.

Fig. 4 Analyse sur gel à deux dimension des protéines synthétisées chez des fibroblastes de 31^{ème} génération restés à 37°C. L'intervalle de pH lors de IIEF est également donné. Un volume d'échantillon contenant 500 000 cpm a été analysée par ce gel.



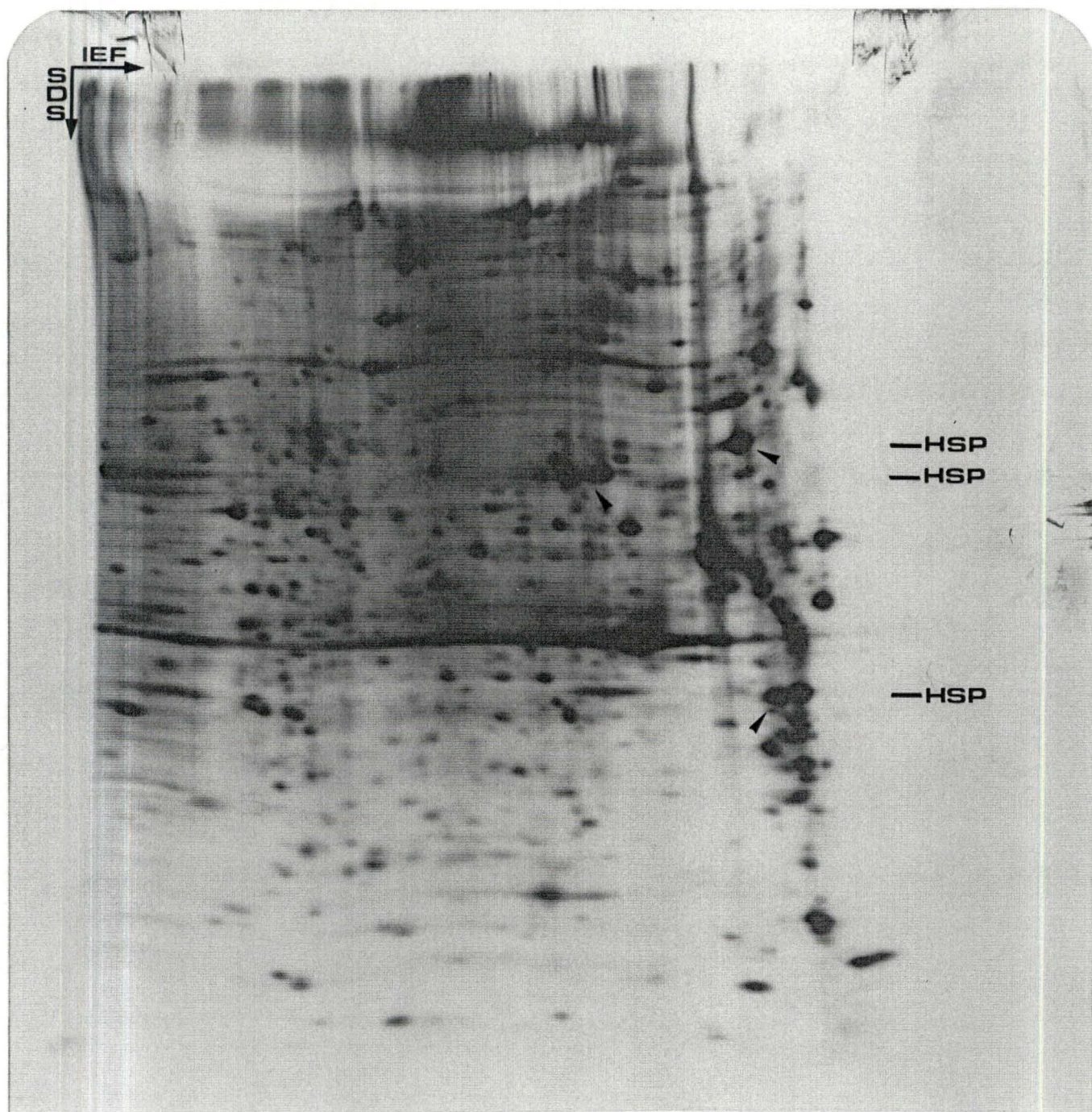


Fig. 5 Analyse sur gel à deux dimension des protéines chez des fibroblastes de 31^{ème} génération ayant subi un choc thermique de 75 min à 42°C puis remis 2h à 37°C avant d'être lysés. Un volume d'échantillon contenant 500 000 cpm a été analysé par ce gel et la durée du marquage est de 2 heures. Les flèches indiquent la position des HSP's identifiées.

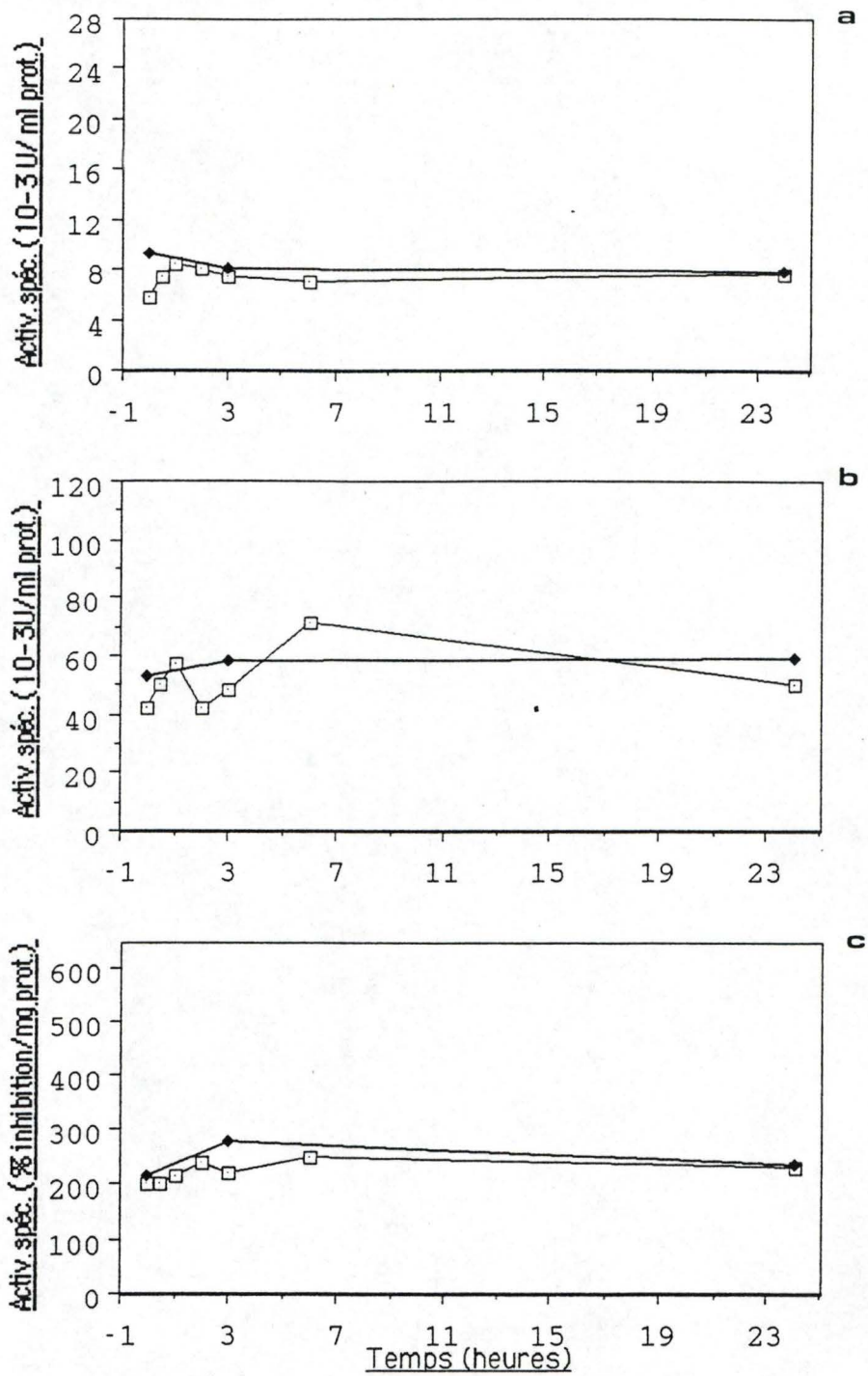


Fig. 6 Dosage des enzymes antioxydantes dans un surnageant de fibroblastes WI-38 en 41^{ème} génération pour des cellules témoins restées à 37°C (♦) et des cellules ayant subi un choc thermique (□) à 42°C pendant 75 min (- 75min à 0h.) puis remises à 37°C (0 à 24h.). Les activités mesurées au cours du temps sont données respectivement pour la catalase (a), le glutathione peroxydase (b) et la superoxyde dismutase (c).

		Catalase	Gpx	SOD
Cell. stressées	0 h	5,75	42,7	202,5
	1 h	8,3	57,2	239,4
% d'augmentation		45,2	34,0	18,2

Tableau I. Accroissement de l'activité des enzymes antioxydantes 1 h après le stress pour la catalase et la Gpx et 2 h après pour la SOD. Le pourcentage d'accroissement est calculé par la formule ci-dessous:

$$\frac{\text{activité 1h (ou 2h) après le stress} - \text{activité 0h après le stress}}{\text{activité 0h après le stress}} \times 100$$

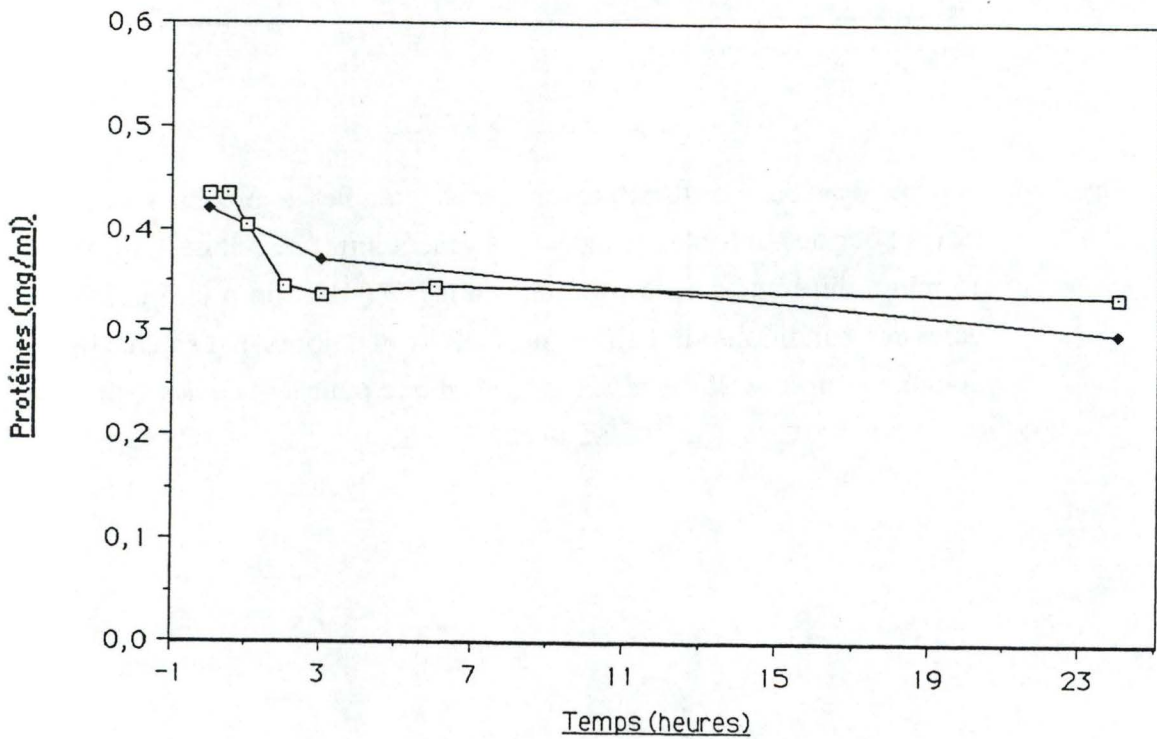


Fig. 7 Dosage des protéines d'un surnageant de fibroblastes en 41^{ème} génération pour les cellules restées à 37°C (□) et les cellules ayant subies un choc thermique de 42°C pendant 75 min (◆) (-75 min à 0h) puis remises à 37°C (0 à 24h).

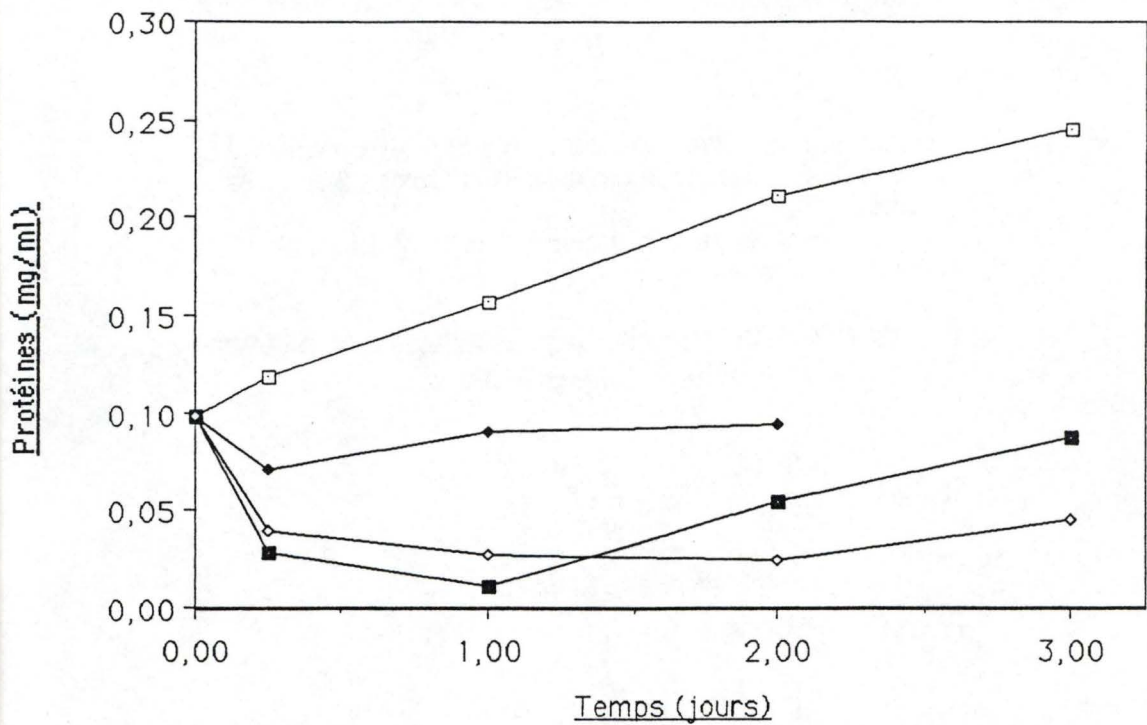


Fig. 8 Courbes de toxicité de tBHP, exprimées en quantités de protéines au cours du temps pour des fibroblastes en 34^{ème} génération. Les cellules sont stressées 15 min à différentes concentrations en tBHP (- 15 min à 0h.) puis remises dans des conditions de culture normale (0 à 3 jours). Les courbes sont données pour les cellules témoins (□) ainsi que pour les cellules traitées avec des tBHP $8 \cdot 10^{-4}M$ (◆), $10^{-3}M$ (■) et $2 \cdot 10^{-3}M$ (◇).

2. Stress oxydatifs

2.1. *ter*Butylhydroperoxide

Comme premier type de stress oxydatif, nous avons choisi de soumettre les cellules au *ter*Butylhydroperoxide (tBHP). Cette molécule est réduite par la Gpx, mais lorsque le système de protection est insuffisant, elle peut conduire à la formation de radicaux tButoxy (RO.) or tButylperoxy (ROO.) (Sies 1985). Le fer pouvant aussi catalyser de telles réactions (Cadenas, 1985).

2.1.1. *Courbe de toxicité*

Olivier Toussaint a récemment développé ce modèle dans le cadre d'études sur les stress oxydatifs et la récupération cellulaire. Mais, comme il travaillait sur des cultures à faible densité en fibroblastes, nous avons dû refaire des courbes de toxicité de cette molécule sur des cultures à confluence, vu que nos expériences sont réalisées sur des cultures à forte densité cellulaire.

La figure 8 fournit une appréciation de l'effet de cette molécule sur la viabilité des cellules après des stress de 15 min à des concentrations en tBHP de 8.10^{-4} , 10^{-3} et 2.10^{-3} M. Ce temps et ces concentrations ont été choisies sur base des travaux réalisés par O Toussaint.

Nous voyons que pour une concentration en tBHP de 10^{-3} M, il faut attendre au moins un jour avant d'obtenir une multiplication cellulaire, il semble même n'y avoir aucune reprise des fibroblastes pour la concentration supérieure. Par contre, pour les cellules traitées pendant 15 min avec du tBHP 8.10^{-4} M la reprise de la croissance semble plus rapide puisqu'elle s'amorce déjà au cours du premier jour.

Etant donné que 8.10^{-4} M de tBHP provoque un stress oxydatif significatif mais suffisamment léger que pour permettre une reprise rapide de la croissance cellulaire, on pourrait supposer que ces conditions étaient idéales pour étudier l'induction d'une protection c'est pourquoi nous avons décidé d'effectuer les traitements futurs avec une concentration en tBHP de 8.10^{-4} M malgré le fait que nous n'ayions pu apprécier la suite de cette reprise suite à un tel stress.

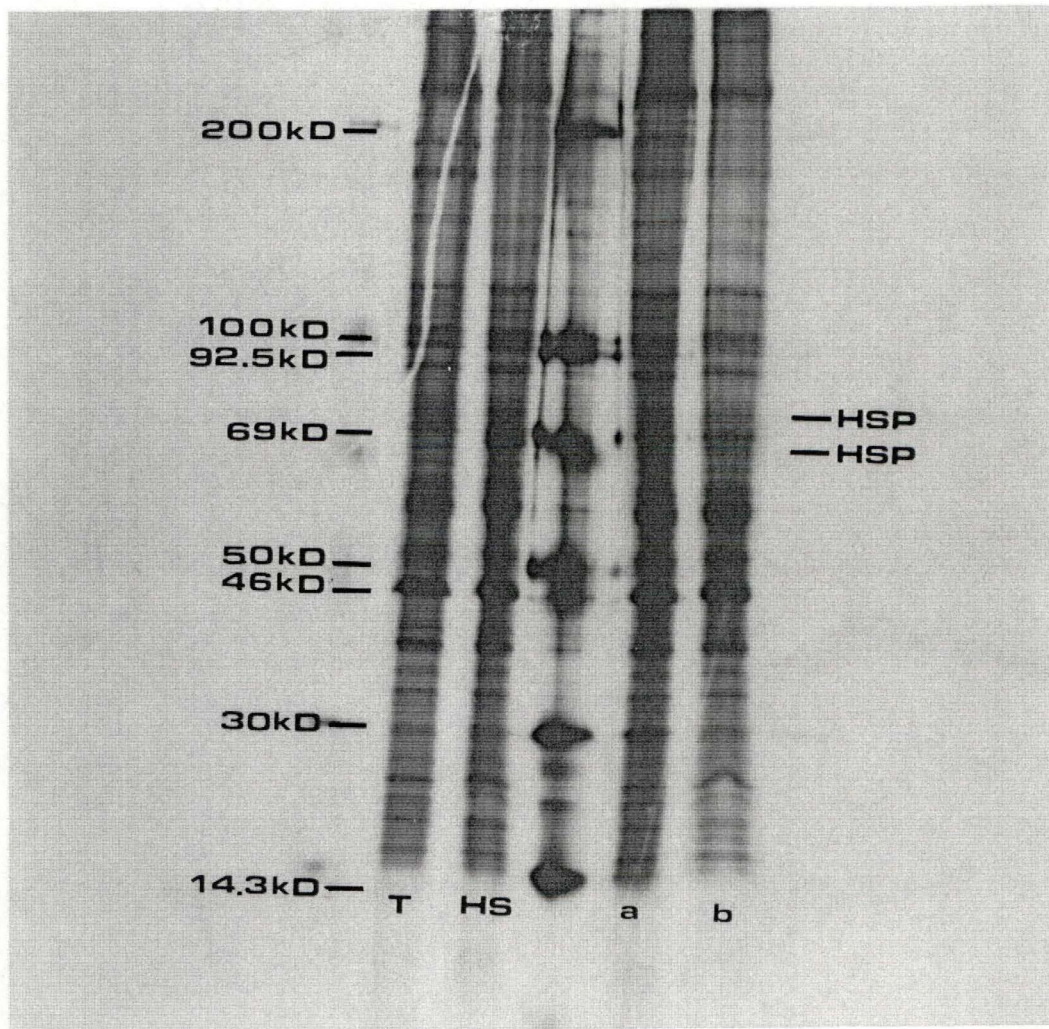


Fig. 9 Analyse des protéines en électrophorèse chez des fibroblastes en 34^{ème} génération ayant été traités pendant 15 min. avec une concentration en tBHP de $8 \cdot 10^{-4}M$ (a) et $10^{-3}M$ (b). La durée du marquage est de 3 heures.
T = cellules témoins.

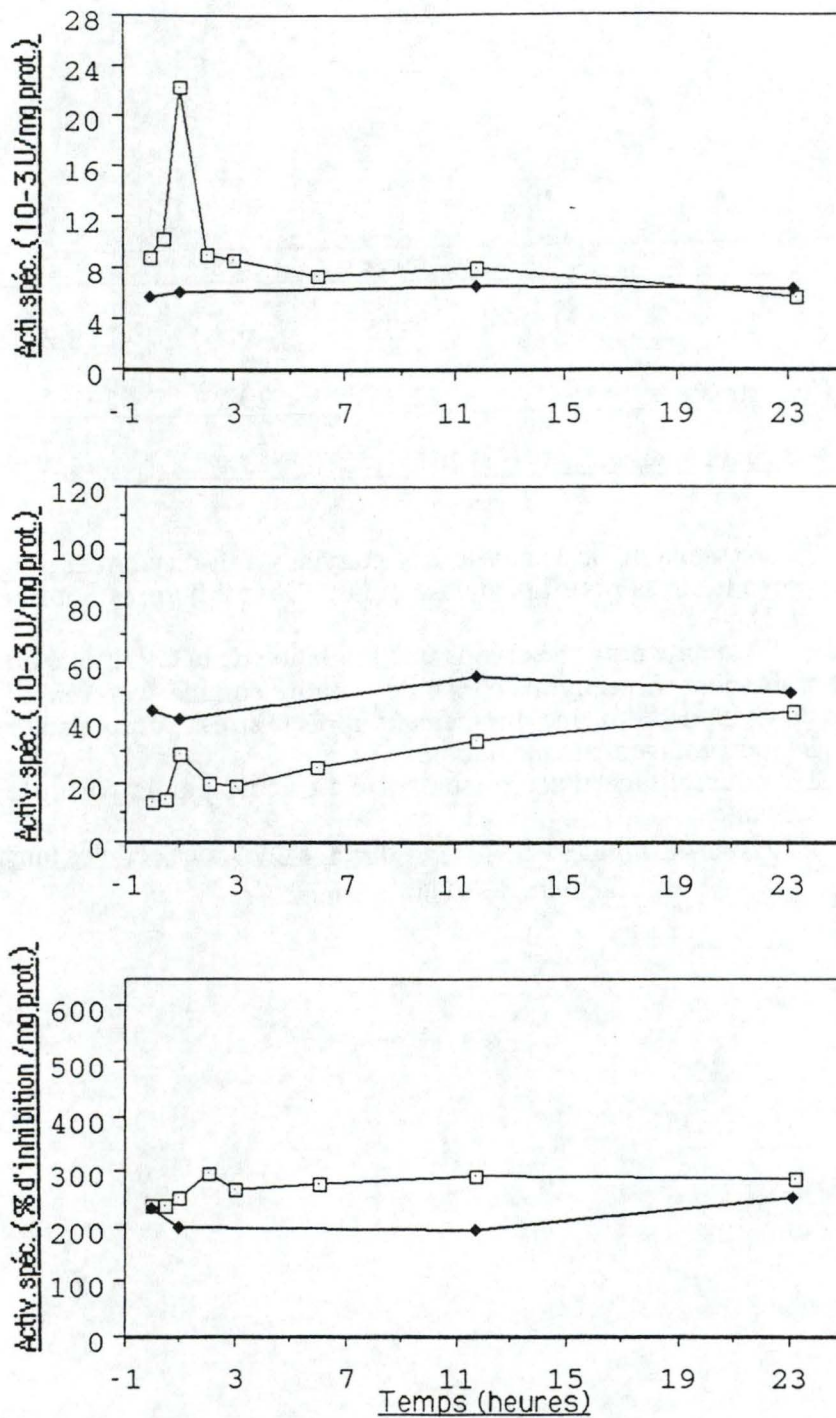


Fig. 10 Dosage des enzymes antioxydantes dans un surnageant de fibroblastes en 37^{ème} génération. Les cellules ont subies un stress oxydatif de 15 min avec du tBHP $8.10^{-4}M$ (- 15 min à 0h) puis remise dans des conditions normales de culture (0h à 24h) (□). Les activités enzymatiques sont données respectivement pour la catalase (a), la Gpx (b) et la SOD (c). Cellules témoins (♦).

	Catalase	Gpx	SOD
Témoin	6,15	13,9 *	218,2
Cell. stressées	22,25	29,2	297,7
% d'augmentation	261,6	111,9	36,3

Tableau II

Accroissement de l'activité des enzymes anti-oxydantes 1 h après le stress pour la catalase et la GPX et 2 h après pour la SOD.

(*) Comme nous observons une inhibition de la GPX suite au traitement, nous avons choisi de prendre comme "reference" l'activité de l'enzyme directement après le stress pour calculer le pourcentage d'augmentation.

Le pourcentage d'accroissement est calculé par la formule suivante:

$$\frac{\text{Activité des cellules 1 h après le stress} - \text{activité des cellules témoin}}{\text{activité des cellules témoin}} \times 100$$

2.1.2. Analyse des HSP's par gel à 1 dimension

Un stress d'une durée de 15 min, réalisé avec une concentration en tBHP de $8.10^{-4}M$ ou $10^{-3}M$ est responsable d'une induction de la synthèse des HSP's. En effet, le gel (fig. 9) montre 2 protéines de stress. Il s'agit des HSP's 82 et 72 kDa.

De ce gel, il ne faut cependant pas conclure que la HSP 40 n'est pas synthétisée car, d'une part les expériences précédentes ont montré que son induction était faible par rapport aux autres HSP's (fig. 2) et d'autre part, cette protéine de stress est également absente chez les cellules ayant subi un choc thermique (fig. 9, colonne HS).

2.1.3. Analyse des enzymes antioxydantes

Après l'analyse des HSP's, nous avons vérifié si les stress oxydatifs au tBHP influençaient également l'activité des 3 enzymes antioxydantes.

L'activité de la catalase augmente de manière considérable (figure 10a) tandis que l'activité de la SOD n'a, quant à elle, augmenté que très faiblement (figure 10c). Il est cependant toujours possible quoique peu vraisemblable qu'une induction ait lieu pendant le choc thermique ou immédiatement après, puis ait disparu par la suite. La Gpx présente une inhibition de 68% de son activité suite au traitement au tBHP (figure 10b), cependant, un pic d'activité est tout de même présent 1h après le traitement. Cette inhibition de la Gpx par le tBHP a en fait été montrée dans notre laboratoire par des expériences réalisées in vitro par E. Pigolet (1989) et le mécanisme probable de cette inactivation a été décrite par Blum et Fridovich (1985); il s'agit d'une oxydation de Selenium par le tBHP.

Le tableau II nous donne le pourcentage de l'augmentation de l'activité une heure après le stress pour la catalase et la Gpx et 2 heures après pour la SOD.

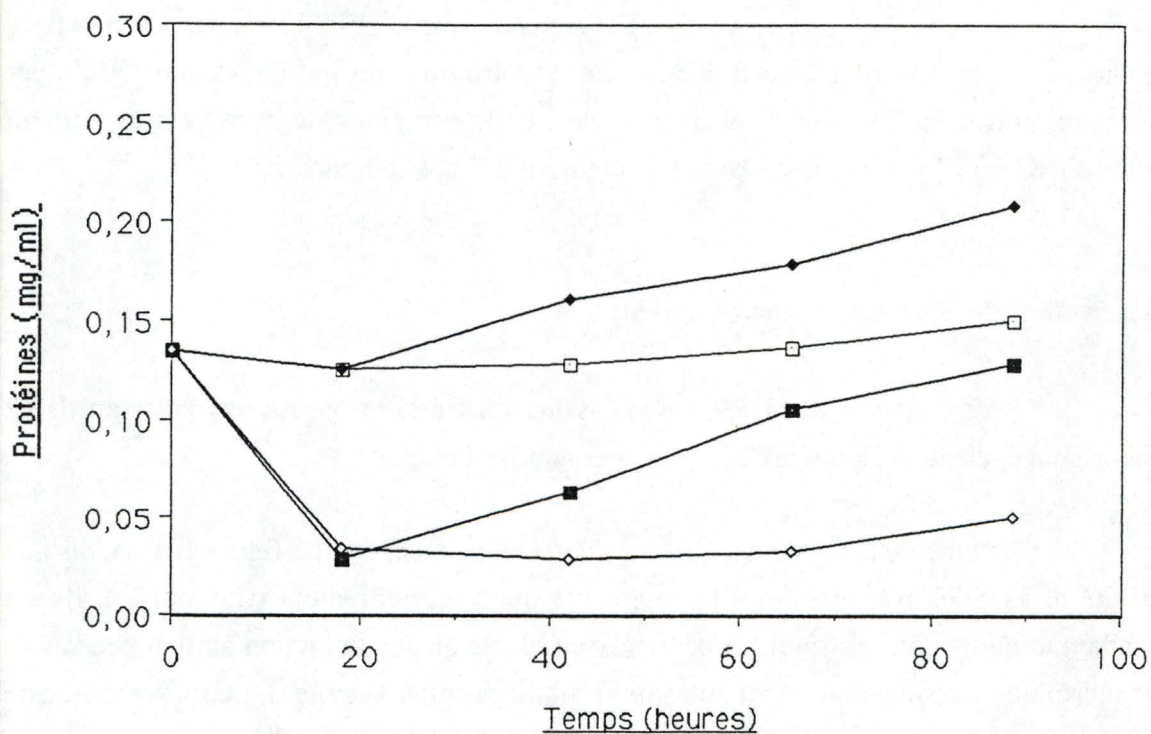


Fig. 11 Courbes de toxicité en H_2O_2 , exprimées en quantités de protéines au cours du temps pour des fibroblastes en 37^{ème} génération. Les cellules sont stressées 15 min. à différentes concentration en H_2O_2 (- 15 min à 0h) puis remises dans des conditions normales de culture (0 à 88 h) les courbes sont données pour les cellules témoins (□), ainsi que pour les cellules traitées avec des concentrations en H_2O_2 de $10^{-5}M$ (◆), $10^{-4}M$ (■) et $10^{-3}M$ (◇).

2.2. Peroxyde d'Hydrogène

Suite à l'inactivation de la Gpx par le tBHP, nous avons décidé d'utiliser un autre peroxyde qui, du moins à faible concentration, ne possède pas d'effet inhibiteur sur l'activité des enzymes antioxydantes. C'est pourquoi, nous avons choisi le peroxyde d'hydrogène pour réaliser une nouvelle série de stress oxydatifs.

2.2.1. Courbe de toxicité

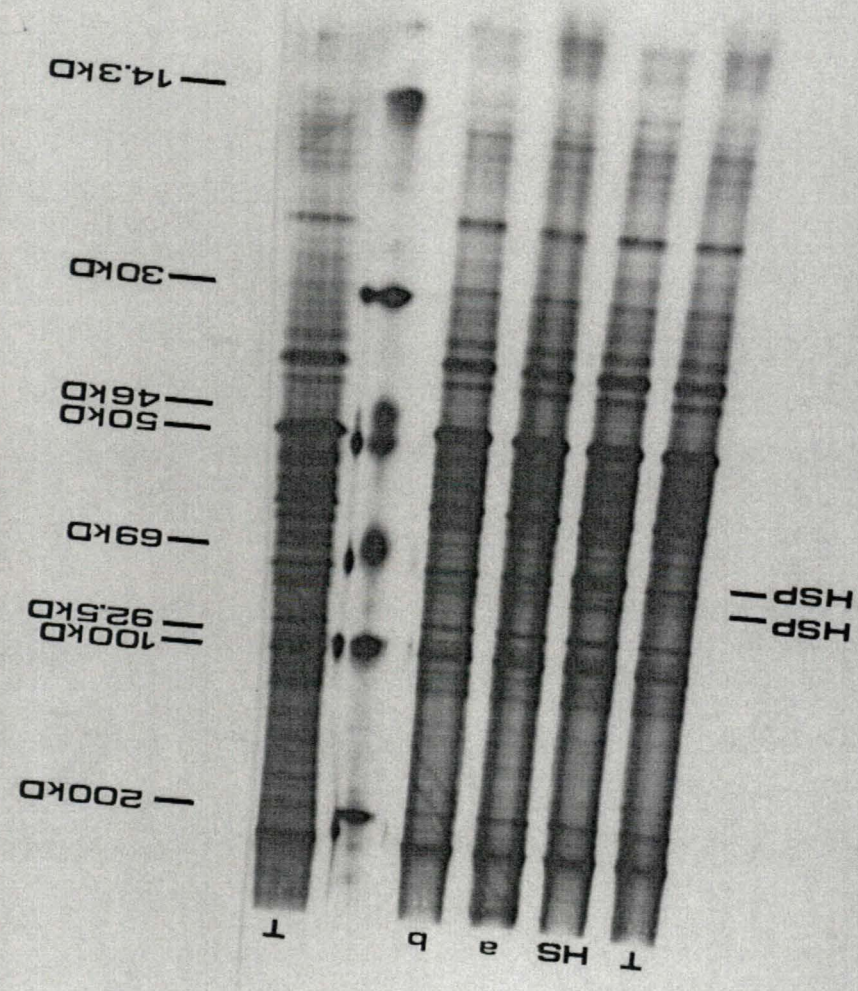
Comme pour le tBHP, nous avons d'abord réalisé une courbe de toxicité de l'H₂O₂. Cependant, les indications sur la toxicité de l'H₂O₂ sur les fibroblastes étaient moins nombreuses, nous avons utilisé un intervalle de concentration plus grand que celui réalisé pour le tBHP. Nous avons décidé de traiter les fibroblastes pendant une période de 15 min avec des concentrations en H₂O₂ de 10⁻⁵, 10⁻⁴ et 10⁻³ M (fig. 11).

Pour une concentration de 10⁻³ M, les cellules ne récupèrent pas. Par contre, lors d'un stress réalisé avec une concentration en H₂O₂ de 10⁻⁴ M, les fibroblastes reprennent leurs divisions 2 jours après le traitement. Cependant, la mortalité est trop élevée pour que nous puissions ultérieurement doser une activité enzymatique. Enfin, à 10⁻⁵ M, malgré un effet visible de l'H₂O₂ au microscope optique (rétraction des cellules), nous n'observons pas de mortalité de celles-ci. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser par la suite l'H₂O₂ à une concentration de 2.10⁻⁵ M afin d'être certain d'obtenir un stress cellulaire significatif mais qui n'endommagerait pas les cellules.

2.2.2. Analyse des HSP's

L'analyse par électrophorèse des protéines synthétisées au cours des 3 et 4 heures succédant un stress de 15 min, à une concentration en H₂O₂ de 2.10⁻⁵ M, ne révèle pas la présence de protéines de choc thermique (fig. 12). Pour être certain qu'il ne s'agissait pas d'un artefact quelconque, cette expérience fut réalisée une deuxième fois. Les résultats obtenus se révélèrent parfaitement identiques aux précédents.

Fig. 12 Analyse par électrophorèse des protéines chez des fibroblastes en 3^{ème} génération ayant été traités pendant 15 min. avec $2.10^{-5}M$ d' H_2O_2 puis remises dans des conditions de cultures habituelles et lysées 3h (A) et 4h (B) après le stress. La durée du marquage est de 3 heures. T = cellules témoins.



2.2.3. Analyse des enzymes antioxydantes

Comme la figure 13 l'indique, il y a une augmentation impressionnante de l'activité des 3 enzymes antioxydantes suite à un stress induit par l' H_2O_2 à une concentration de 2.10^{-5} M pendant 15 min. Contrairement au traitement réalisé avec le tBHP, on constate que la Gpx n'est pas inhibée et qu'elle se comporte comme les deux autres enzymes. Le tableau III montre le pourcentage de l'activation enzymatique une heure après le stress.

La cinétique d'induction est comparable à celle obtenue suite au traitement exercé par le tBHP c'est-à-dire avec un pic transitoire d'activités obtenues une heure après le stress.

	Catalase	Gpx	SOD
Témoin	6,31	50,65	281,24
Cell. stressées	15,04	107,34	634,14
% d'augmentation	138,3	111,9	125,5

Tableau III Accroissement de l'activité des enzymes antioxydantes 1h après le stress
le pourcentage d'accroissement est calculé grâce à la formule donnée au tableau II.

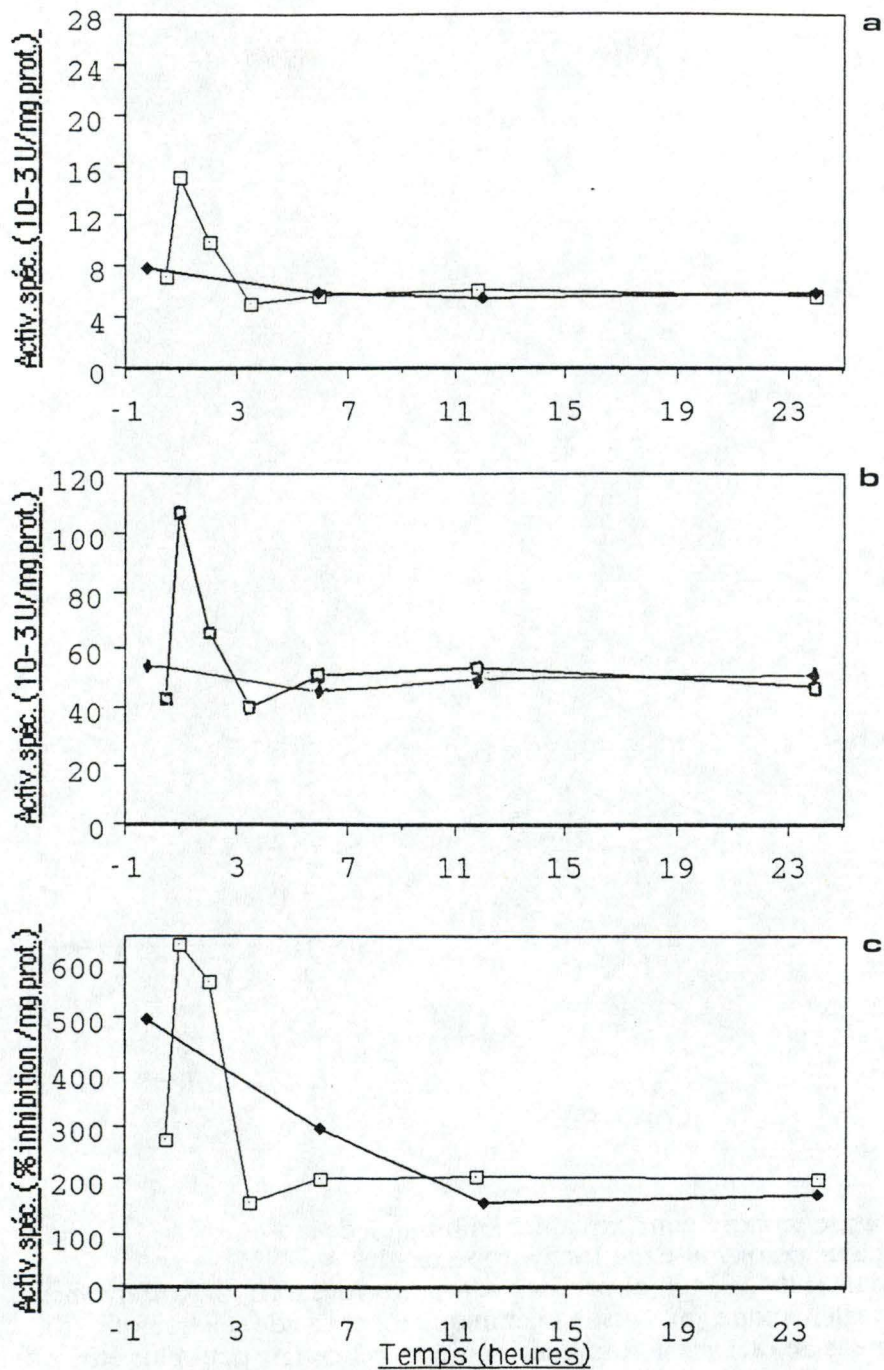


Fig. 13 Dosage de Enzymes antioxydantes dans un surnageant de fibroblastes en 41^{ème} génération.
 Les cellules ont subies un stress oxydatifs de 15 min (- 15 min à 0h) en H_2O_2 $2.10^{-5}M$ (□) puis remises dans des conditions normales de culture (0 à 24h). Les activités enzymatiques sont données respectivement pour la catalase (a), la Gpx (b) et la SOD (c).
 Cellules témoins (◆).

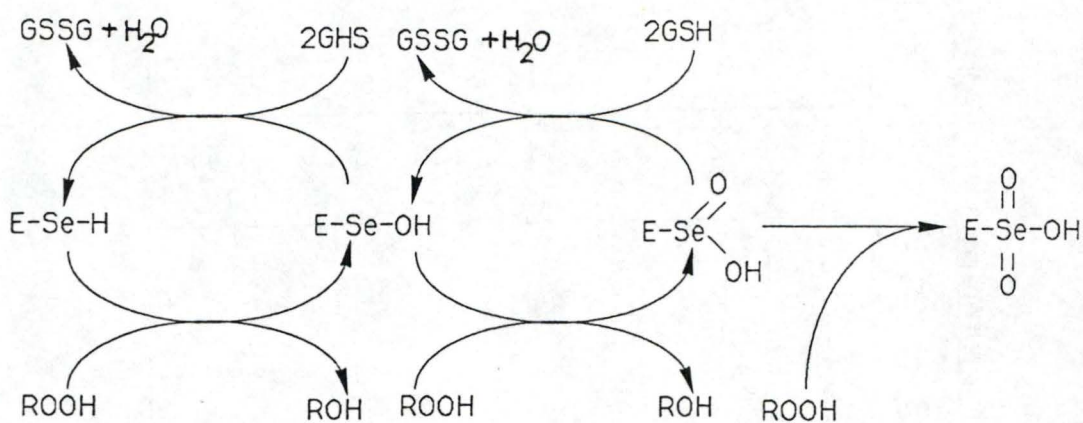


Fig. 14

Mécanisme proposé pour expliquer l'inhibition de la glutathione peroxydase par les hydroperoxydes.

L'oxydation du sélénol (a) par les hydroperoxydes forme successivement l'acide sélénénique (b), l'acide séléninique (c) et l'acide sélénonique (d).

Lorsque le Se est sous la forme sélénonique, celui-ci ne peut plus être réduit par le glutathion et nous avons dès lors une enzyme irréversiblement inactivée (d'après Blum et al, 1983 et Pigeolet et al, 1989).

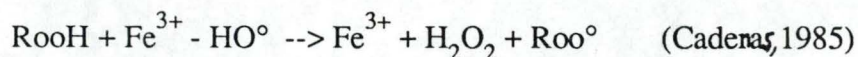
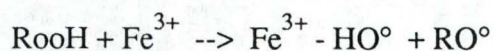
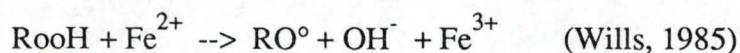
DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Considérations générales

Une série d'expériences ont montré, dans des modèles divers utilisant principalement des microorganismes, d'une part que des traitements hyperthermiques induisent un accroissement de l'activité d'enzymes antioxydantes et d'autre part que des stress oxydatifs sont responsables d'HSR. C'est pourquoi nous avons réalisé au cours de ce mémoire une première série d'expériences, sur un modèle unique, avec pour but de découvrir s'il existe une relation entre le système de défense que représente les enzymes antioxydantes et la réponse à un choc thermique.

Une température ambiante de 42°C semble être une limite supérieure du bon fonctionnement cellulaire, du moins chez les cellules de mammifères. En effet, à 41,5°C le cycle cellulaire se poursuit pour s'arrêter à 42°C, les cellules paraissent très sensibles à des variations comprises entre 42°C et 43°C (Honda et al. et al., 1978) et des températures plus élevées (45°C et plus) inhibent l'épissage des ARN (Yost et al., 1985). C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser nos stress thermiques à 42°C pendant 75 min. 15 min sont nécessaires pour que le milieu de culture atteigne cette température.

Quant au choix des molécules induisant un stress oxydatif, nous avons d'abord choisi le tBHP car O. Toussaint a mis au point, au laboratoire, un modèle de stress et de récupération cellulaire suite à des traitements induits par ce peroxyde. Le tBHP peut être une source de radicaux libres si des traces de fer sont présents dans le milieu et cela par les mécanismes suivants:



C'est donc pour avoir de plus amples informations sur l'effet cellulaire de cette molécule, au niveau de la synthèse des HSP's et de l'activité des enzymes antioxydantes, que nous l'avons choisie. Hélas, il s'est avéré que la concentration utilisée par tBHP était suffisante pour induire une inhibition de la glutathione peroxydase. Les travaux réalisés par Blum et Fridovich. (1985) et par Pigeolet et al. (1989) ont montré que tous les peroxydes d'hydrogène peuvent, selon leurs concentrations et leurs environnements (c'est-à-dire entre autre la concentration en GSH), inhiber la Gpx. La figure 14 explique ce mécanisme.

Pour les stress suivants, nous avons ensuite choisi d'utiliser l'H₂O₂ car les travaux réalisés par Pigeolet et al. ont montré que ce radical a un effet inhibiteur moindre que celui provenant du tBHP et cela pour des raisons de taille et d'affinité avec le site actif.

Nous aurions pu choisir l'hyperoxie comme stress oxydatif, mais les travaux de Michiels et al. (1986), réalisés au sein du laboratoire, ont montré qu'il fallait attendre plusieurs jours avant d'obtenir une légère induction de l'activité des enzymes antioxydantes, ce qui est peu compatible avec une réponse telle que la HST. L'hypoxie suivie de la reperfusion est également un traitement bien connu pour induire les HSP's (Li et al., 1982, Sciandra et al., 1984). Mais, c'est une technique assez longue à mettre au point : elle a été développée cette année par T. Arnould sur des cellules endothéliales humaines cultivées in vitro, dans le cadre de son mémoire.

Pour les électrophorèses, nous avons utilisé la méthode mise au point par M. Lecoq. Mais, lors du traitement des gels pour l'autoradiographie, nous avons observé une déformation hétérogène de ceux-ci provenant de leur gradient en acrylamide. Pour éviter une telle déformation, nous envisageons l'utilisation, lors de prochains travaux, des gels homogènes afin de faciliter l'analyse des protéines synthétisées suite à différents stress, qu'il s'agisse d'électrophorèses à une ou deux dimensions. La concentration en acrylamide reste encore à déterminer. Enfin, les logiciels que met actuellement au point V. Henin dans le cadre de son mémoire à l'Institut d'Informatique nous permettront par un système d'analyse d'image, de comparer nos gels de manière quantitative et qualitative.

2. Les protéines de choc thermique

Les résultats nous montrent que les fibroblastes humains WI-38 induisent la synthèse des protéines de choc thermique suite à un traitement à la chaleur. Cette synthèse ne semble pas varier selon la génération cellulaire, ce que confirme les travaux réalisés sur les fibroblastes humains TIG-1 par Tsuji et al. (1986).

A notre connaissance, c'est la première fois que l'on décrit des HSP's chez les fibroblastes humains WI-38. Elles ont des poids moléculaires de 40, 72 et 82 kDa. Les HSP's 40 et 82 semblent être des protéines constitutives car on les retrouve chez les cellules non stressées; cependant leurs spots voient leur intensité s'accroître suite à un stress thermique. La HSP 70 n'est que très peu présente chez les fibroblastes restés à 37°C. En fait Celis et al. (1988) ont montré que la synthèse d'une protéine très similaire voir analogue à la HSP 70 augmente pendant la mitose. Cette observation nous explique pourquoi nous retrouvons la HSP 70 en faible quantité chez les cellules non stressées, car, ne l'oublions pas, les expériences ont été réalisées sur des cultures cellulaires subconfluentes.

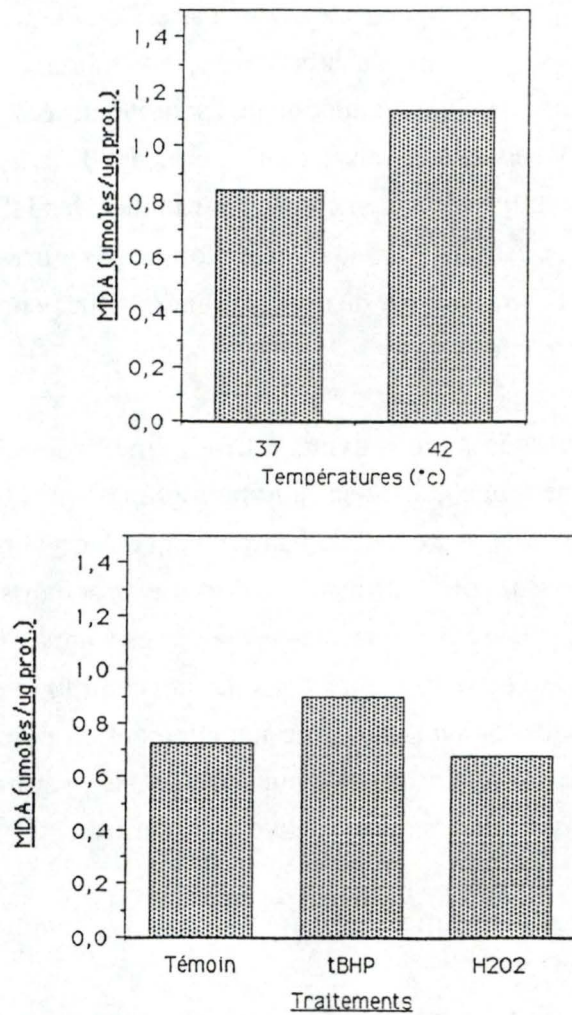


Fig. 15 Concentration en MDA dans des cellules stressées. En (A), les cellules ont été soumises à un choc thermique, à 42°C, pendant 75 min et le MDA mesuré immédiatement après le choc; le témoin a été incubé à 37°C. En (B), le MDA a été mesuré 1h après un traitement de 15 min en présence de tBHP ($8 \cdot 10^{-4}M$) ou de H_2O_2 ($2 \cdot 10^{-5}M$), le témoin a été traité de la même manière, mais en l'absence de peroxyde.

Des expériences de stress thermiques ont déjà été réalisées sur d'autres souches de cellules humaines notamment sur des TIG-1 qui sont aussi des fibroblastes de poumon obtenus à partir d'un fœtus. Tjuji et al. (1986) ont montré que ces cellules synthétisent les HSP's 70, 85 et 116 kDa suite à un stress de 10 min. à 46°C. Il est plus que probable que nos HSP's 72 et 82 correspondent aux HSP's 70 et 85 des TIG-1. Par contre nous n'observons pas l'HSP 110. Nous comptons imposer aux WI-38 un traitement identique à ceux soumis aux TIG-1 afin de pouvoir comparer les HSP's obtenus chez ces deux souches de fibroblastes humains.

Les fibroblastes WI-38 montrent aussi une synthèse d'au moins deux des HSP's suite à un stress oxydatif occasionné par le tBHP. L'H₂O₂ quant à lui, du moins à la concentration utilisée (c'est-à-dire à 2.10⁻⁵M), n'est pas un inducteur de la réponse physiologique qu'est la HSR.

Au premier abord, nos données peuvent apparaître comme assez déconcertantes. Cependant, Burdon (1987) et Cajone (1988) se sont demandés si la peroxydation lipidique n'est pas un facteur intervenant dans l'induction de la HSR. Or, lorsqu'on compare la facilité du passage transmembranaire des 2 peroxydes utilisés au cours de ce mémoire, on se rend compte que le tBHP reste, plus que probablement, beaucoup plus longtemps dans la membrane plasmique que l'H₂O₂ qui la traverse très facilement. Dès lors, le tBHP entraînerait une peroxydation lipidique plus prononcée que celle provoquée par l'H₂O₂. C'est pourquoi nous avons décidé de doser la quantité de malondialdéhyde dans les cellules, quelle que soit la nature du stress appliqué. Le MDA, rappelons-le, est un des dérivés bien connus résultant des réactions de peroxydation lipidique et des clivages que celles-ci entraînent (voir Introduction figure 13). Nous avons donc dosé le MDA dans des cellules soumises et à des stress oxydatifs et à des chocs thermiques.

La figure 15 nous montre bien un accroissement de la quantité intracellulaire de MDA suite à un choc thermique et à un stress oxydatif exercé par le tBHP; il ne semble pas y avoir de différence dans la concentration de MDA entre les cellules témoins et stressées par l'H₂O₂. Ces tout derniers résultats sont toutefois à mettre sous réserve car l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et l'estimation du degré de peroxydation lipidique par le dosage du MDA reste controversée (pour revue voir Kappus, 1985). Cependant, ils sont en parfait accord avec l'hypothèse selon laquelle la peroxydation lipidique est un facteur intervenant dans l'induction de la HSR (Burdon, 1987; Cajone, 1988).

Par quel mécanisme cette peroxydation lipidique induit-elle une HSR ? Il est possible, qu'au cours des réactions impliquées dans ce "remodelage" membranaire, des radicaux libres soient relargués dans le cytoplasme, produisant, suite à leur réactivité élevée, des protéines aberrantes, proposées comme essentielles pour l'activation des gènes HS.

Quant au mécanisme reliant le stress thermique et la peroxydation lipidique accrue, il reste actuellement hypothétique.

Dès lors, dans la poursuite d'un tel travail, il faudra réaliser une nouvelle série de stress thermiques et oxydatifs tels qu'ils ont été appliqués au cours de ce mémoire, mais en ajoutant des inhibiteurs de la synthèse des ARN et de la synthèse protéinique (par exemple et respectivement l'actinonysine D et la cycloheximide). De plus, il nous faudra estimer la peroxydation des lipides lors de ces stress en utilisant plusieurs méthodes complémentaires comme le conseillent Halliwell et Gutteridge (1985).

3. Les enzymes antioxydantes

Le tableau ci-dessous résume la seconde partie de nos résultats. Il donne les pourcentages d'accroissement des activités enzymatiques tels qu'ils ont été calculés précédemment.

Stress SOD	Catalase	Gpx	
Chaleur	45,2	34,0	18,2
tBHP	261,6	(99,2 ?)	36,3
H ₂ O ₂	138,3	111,9	125,5

Pour ces trois types de stress, l'évolution des activités enzymatiques est comparable : on obtient des pics transitoires 1 heure après le traitement pour la catalase et la glutathione réductase et entre 1h30 et 2 heures après la fin du stress pour la superoxyde dismutase. Il est surtout intéressant qu'un stress thermique ait un effet sur l'induction de ces trois enzymes antioxydantes et qu'il s'accompagne d'une augmentation du nombre de peroxydes produits à partir des lipides. Cette augmentation de peroxydes lipidiques pourrait alors agir comme élément d'induction des enzymes antioxydantes. On peut cependant se demander à quel niveau se fait le processus d'induction observé dans les 3 stress réalisés au cours de ce mémoire et quel en est son mécanisme moléculaire.

Actuellement, il nous est impossible de répondre à cette question, mais deux hypothèses peuvent être émises.

Nos résultats pourraient s'expliquer par une activation des gènes codant pour ces enzymes et d'un accroissement subséquent de la synthèse de celles-ci. Si cette hypothèse est exacte, la quantité d'ARNm correspondant aux enzymes devrait être largement accrue. Pour le vérifier, il faudra donc impérativement resoumettre les cellules à des stress thermiques et oxydatifs, mais en présence d'inhibiteurs de transcription (actinomycine D) et de traduction

(cycloheximide). Si cette hypothèse s'avère correcte, il faudra analyser de manière plus fine cette activation et vérifier en particulier si les enzymes antioxydantes peuvent être induites par des mécanismes comparables à ceux contrôlant la HSR. Mais, l'allure générale des pics d'activité et leur caractère transitoire et éphémère, en particulier, ne plaident pas en faveur de l'hypothèse favorisant un contrôle pré-traductionnel.

La seconde hypothèse permettant d'expliquer nos résultats privilégierait plutôt un contrôle post-traductionnel : le mécanisme responsable de cette amplification des activités serait peut-être dû à un phénomène de réarrangement entre les monomères constituant les enzymes, formant ainsi des complexes très actifs. En effet, on a montré au laboratoire que la composition du cytoplasme a une influence sur l'activité de la CuZnSOD en jouant sur l'équilibre entre les formes tetramériques et dimériques de cette enzyme (Somville et al., 1984). Un mécanisme analogue a aussi été démontré pour la glucose 6 phosphate deshydrogénase (Houben et al., 1982). Il se pourrait donc que les stress, auxquels nous avons soumis les fibroblastes modifient la composition du cytoplasme favorisant ainsi la formation de multimères inhabituels et très actifs. Ces pics seraient transitoires car après le stress le cytoplasme retrouverait sa composition normale et les enzymes leurs caractéristiques habituelles. La nature et l'intensité des modifications cytoplasmiques restent toutefois à établir. De plus, cette hypothèse suppose que différents types de stress induisent des modifications cytoplasmiques comparables. Cette hypothèse reste donc, comme la première à vérifier.

Avant d'opter pour telle ou telle hypothèse, des expériences complémentaires doivent être réalisées : dans un premier temps, différents stress thermiques et oxydatifs seraient à nouveau appliqués aux fibroblastes mais en ajoutant l'actinomycine D et/ou la cycloheximide. Cela nous permettrait de déterminer si les pics observés correspondent bien à une augmentation du nombre des enzymes suite à une synthèse accrue et non à une réassociation entre monomères. Mais, si l'hypothèse d'un contrôle pré-traductionnel est à rejeter, il faudra essayer de vérifier l'hypothèse d'un contrôle post-traductionnel. En utilisant les techniques décrites par Somville et al. (1984), il devrait être possible de suivre la SOD au cours du temps (avant, pendant et après les stress) : l'activité et le degré de polymérisation de l'enzyme seraient déterminés. Si les stress induisent bien des associations multimériques particulières des enzymes antioxydantes, ce type d'expérience décrit pour la SOD devrait permettre de les mettre en évidence.

3. Conclusions et perspectives

Actuellement, il ne nous est donc pas permis de répondre aux questions que nous nous sommes posés au début de ce mémoire. Il semblerait tout de même que la peroxydation lipidique soit un chaînon entre stress thermique, certains stress oxydatifs et la synthèse des

protéines de choc thermiques. Quant au(x) rôle(s) des enzymes oxydantes, si rôle il y a, lors d'un traitement à la chaleur, il(s) reste(nt) à définir.

Il nous faudra donc réaliser une série d'expériences complémentaires : utiliser différents inhibiteurs de transcription et de traduction, étudier la survie et pourquoi pas la thermotolérance des cellules à des stress thermiques suite à l'injection d'enzymes antioxydantes, de leur ARN messager et des ARN inverse correspondants.

A plus long terme, l'étude de la régulation de l'expression des HSP's et des enzymes antioxydantes devrait répondre à certaines questions fondamentales de la biologie : quelles sont les voies métaboliques que la cellule a développées pour se protéger contre certains stress ? Comment s'exerce la régulation ? Quelles sont les fonctions des HSP's ? Mais cette étude fondamentale pourrait également aboutir à des applications bio-médicales de première importance. Des chercheurs, se basant sur des différences de thermosensibilité entre les cellules saines et tumorales, ont proposé une thérapie par chocs thermiques pour traiter le cancer (pour une revue voir Burdon, 1986). La combinaison de stress thermique, oxydatif et de radiations se révélera peut-être encore plus discriminante pour éliminer sélectivement les cellules tumorales.

BIBLIOGRAPHIE

- AMIN, J., ANANTHAN, J. and VOELLMY, R. (1988)
Key features of heat shock regulatory elements.
Mol. Cell. Biol., 8, 3761-3769.
- ANANTHAN, J., GOLENDERG, A.C. and VOELLMY, R. (1986)
Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of HS genes.
Science, 23, 522-524.
- ASAYAMA, K., DANCO, R.L. and BURR, I.M. (1985)
Selective induction of manganese superoxide dismutase in human monocytes.
Am. J. Physiol., 249, 393-397.
- BAUDHIN, P., BEAUFAYS, H., RAHMAN-LI, V., SELLINGER, O.Z., WATTIAUX, R., JACQUES, P. and DE DUVE, C. (1964)
Tissue fractionnement studies, 17 intracellular distributions of monoamine oxydase, aspartate aminotransferase, alanine deshydrogenase, D-amino acide oxydase and catalase in rat liver tissue.
Biochem. J., 92, 179-184.
- BARDWELL, J.C.A. and CRAIG, E.A. (1984)
Major heat shock gene of *Drosophila* and *Escherichia coli* heat inducible dnaK gene are homologues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 842-852.
- BRADWELL, J.C.A. and CRAIG, E.A. (1987)
Eukaryotic Mr 83000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 5177-5181.
- BEAULIEU, J.-F. and TANGUAY, R.M. (1988)
Members of the *Drosophila* HSP 70 family share ATP-binding properties.
Eur. J. Biochem., 172, 341-347.
- BLUM, J. and FRIDOVICH, I. (1983)
Inactivation of glutathione peroxydase by superoxide radical.
Arch. Biochem. Biophys., 223, 407-416.
- BOCHNER, B.R., LEE, P.C., WILSON, S.W., CUTLER, C.W. and AMES, B.N. (1986)
AppppA and related adenylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress.
Cell, 37, 225-232.
- BOND, U. and SCHLESINGER, M.J. (1985)
Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts.
Mol. Cell. Biol., 5, 949-956.
- BOND, U. (1988)
Heat shock but not other stress inducers leads to the disruption of a sub-set of snRNPs and inhibition of in vitro splicing in HeLa cells.
EMBO, 7, 3509-3518.
- BURDON, R.H. (1986)
Heat shock and the heat shock proteins.
Biochem. J., 240, 313-324.

- BURDON, B.H., GILL, V.M. and RICE-EVANS, C. (1987)
Oxidative stress and heat shock protein induction in human cells.
Free Rad. Res. Comms., 3, 129-139.
- CADENAS, E. (1985)
Oxidative stress and formation of excited species.
in: *Oxidative stress*. Edité par SIES, H., 311-330.
- CAJONE, F. and BERNELLI, Z.A. (1988)
Oxidative stress induces a subset of HSP in rat hepatocytes and MH₁C₁ cells.
Chem. Biol. Interactions, 65, 235-246.
- CELIS, J.E., LAURIDEN, J.B. and BASSE, B. (1988)
Cell cycle-associated change in the expression of the proliferation-sensitive and heat-shock protein hsc70 (IEF 14): increased synthesis during mitosis.
Exp. Cell. Res., 177, 176-185.
- CHANCE, B. SIES, B. and BOVERIS, A. (1979)
Hydrogen peroxide metabolism.
Physiol. Rev., 59, 527-589.
- CHAPPELL, T.C., WELCH, W.J., SCHLOSSMAN, D.D., PALTER, K.B., SCHLESINGER, M.J. and ROTHMAN, J.E. (1986)
Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins.
Cell, 45, 3-13.
- CHIROCO, W.J., WATERS, M.G. and BODEL, G. (1988)
70K heat shock related proteins stimulate proteins translocation into microsomes.
Nature, 332, 805-810.
- CHRISTMAN, M.F., MORGAN, R.W., JACOBSON, F.S. and AMES, B.N. (1985)
Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*.
Cell, 41, 753-762.
- CORBISIER, P., HOUBION, A. and REMACLE, J. (1987)
A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemoluminescence.
Anal. Bioch., 164, 240-247.
- CORCES, V., PELLICER, A., AXEL, R. and MESELEN, M. (1981)
Integration, transcription and control of a *Drosophila* heat shock gene in mouse cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7038-7042.
- COURGEON, A.M., ROLLET, E., BECKER, J., FLAISONHAUTE, C. and BEST-BELPOMME, M. (1988)
Hydrogen peroxide (H₂O₂) induces actin and some HSP in *Drosophila* cells.
Eur. J. Biochem., 171, 163-170.
- CRAIG, E. (1985)
The heat shock response.
C.R.C. Crit. Rev. Biochem., 18, 239-280.
- CRAPO, J.D. and TIERNEY, D.F. (1974)
Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity.
Am. J. Physiol., 226, 1401-1407.

- DESHAIES, R., KOCH, B.D., WASHBURNE, W.M., CRAIG, E. and SCHECKMAN, R. (1988 a)
70 kd stress protein homologues facilitate translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides.
Nature, 322, 800-805.
- DESHAIES, R., KOCH, B.D. AND SCHECKMAN, R. (1988 b)
The role stress proteins in membrane biogenesis.
Tibs, 13, 384-388.
- DUNCAN, R. and HERSHEY, J.W.B. (1984)
Heat shock-induced translational alterations in HeLa cells.
J. Biol. Chem., 259, 11882-11889.
- FINLEY, D.A., CIECHANOVER, A. and VARSHAVSKY, A. (1984)
Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutants is 85.
Cell, 37, 43-55.
- FINLEY, D. and VARSHAVSKY, A. (1985)
The ubiquitin system: functions and mechanisms.
Trends in Biochem. Sci., 10, 343-.
- FINLEY, D., OZKAYNAK, E. and VARSHAVSKY, A. (1987)
The yeast polyubiquitin gene is essential for the resistance to high temperatures, starvation and other stresses.
Cell, 48, 1035-.
- FLOHE, L. (1982)
Glutathione peroxidase brought into focus.
in: *Free radicals in biology*. Volume V Edited par PRYOR, W.A., 223-254, 1982.
- FRANK, L. (1978)
Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species.
Am. Physiol. Soc., 45, 699-704.
- FRANK, L. (1985)
Effect of oxygen on the newborn.
Fed. Proc., 44, 2328-2334.
- FREEMAN, B.A. and CRAPO, J.D. (1982)
Biology of disease: free radicals and tissue injury.
Lab. Invest., 47, 412-426.
- FREEMAN, M.L. and SCIDMORE, N.C. (1987)
Inhibition of heat shock protein synthesis and thermotolerance by cycloheximide.
Rad. Res., 112, 564-574.
- FRIDOVICH, I. (1985)
Superoxide dismutase: regularities and irregularities.
The Harvey lectures, 79, 51-75.
- FRIDOVICH, I. (1988)
Superoxide dismutase.
Advanced in enzymology and related areas of molecular biology, 58, 61-97.
- GALIAZZA, F., SCHIESSER, A. and ROHILIO, G. (1987)
Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions.
Biochim. Biophys. Res. Comm., 147, 1200-1205.

- GUEDON, F.G., GLISON, G.J.P., EBEL, J.P., BEFORT, N.M-T. and REMY, P.M. (1986)
Lack of correlation between extensive accumulation of bisnucleotide polyphosphates and the heat-shock response in eukariotics.
J. Biol. Chem., 261, 16459-16465.
- GOOCHER, C.F. and PASSINI, C.A. (1988)
Intracellular proteins produced by mammalian cells in response to environmental stress.
Biotechnology Prog., 4, 189-201.
- HASSAM, H.M. and FRIDOVICH, I. (1987)
Regulation of synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Induction by methyl viologen.
J. Bio. Chem., 252, 7661-7672.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M. (1985)
in: Free radicals in biology and medicine. Clarendon press, 1985.
- HAYFLIK, L. (1965)
The limited *in vitro* life time of human diploid cell strains.
Exp. Cell. Res., 37, 614-636.
- HIGHTOWER, L.T. and WHITE, F.P. (1981)
Cellular responses to stress : comparison of a family of 11-73 kDa protein family synthesized in rat tissue slices and in conavane treated in culture.
J. Cell. Physiol., 102, 407-427.
- HONDA, K-I., HATAYAMA, T. and YUKIODA, M. (1988)
Characterisation of a 42°C specific HSP of mammalian cells.
J. Biochem, 103, 81-85.
- HOUSSET, B. and JUNOD, A.F. (1982)
Effects of culture conditions and hyperoxia on antioxidant enzymes in pig pulmonary artery and aortic endothelium.
Biochem. Biophys. Acta, 716, 283-289.
- HOUBEN, A., RAES, M., HOUBION, A. and REMACLE, J. (1984)
Alteration of enzymes in ageing human fibroblasts in culture.
II. Conditions for the reversibility and the mechanism of the alteration of glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Mech. Ageing Dev., 25, 35-45.
- HOUSSET, B., ODY, C., RUBIN, D.B., ELEMER, G. and JUNOD, A.F. (1983)
Oxygen toxicity in cultured aortic endothelium: selenium-induced partial protective effect.
J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercice Physiol., 55, 343-352.
- HUNT, C. and MORIMOTO, R.I. (1985 a)
Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6455-6459.
- HUNT, C. and MORIMOTO, R.I. (1985 b)
Major heat shock gene of *Drosophila* and *Escherichia coli* heat inducible DnaK gene are homologues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 848-852.

- ITIKAWA, H. and RYU, J.I. (1979)
Isolation and characterisation of a temperature sensitive dnaK mutant of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 138, 339-344.
- JAMMA, C. (1989)
Le stress de nos cellules.
Science et Avenir, 504, 60-65.
- KAPOOR, M. and LEWIS, J. (1987)
Heat shock induces peroxidase activity in *Neurospora crassa* and confers tolerance toward oxidative stress.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 147, 904-910.
- KAPOOR, M. and SVEENIVASON, G.M. (1988)
The heat shock response of *Neurospora crassa*: stress-induced thermotolerance in relation to peroxidase and superoxidase dismutase levels.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 156, 1097-1102.
- KAPPUS, H. (1985)
Lipide peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance.
in: *Oxydative stress*, Edité par SIES, H., Academic Press, Orlando.
- KOYASU, S., NISHIDA, E., KADOWAKI, T., MATSUZAKI, F., IIDA, K., HARADA, F., KASUGA, M., SAKAI, H. and YAHARA, I. (1986)
Two mammalian heat shock proteins, HSP 90 and HSP 100, are actin-binding proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 8054-8058.
- LADENSTEIN, R., EPP, O., BARTELS, K., JONES, A. and HUBER, R. (1979)
Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2,8Å resolution.
Mol. Biol., 134, 199-218.
- LASZLO, A. (1988)
The relationship of HSP, thermotolerance and protein synthesis.
Exp. Cell. Res., 178, 415-425.
- LEE, A.S. (1987)
Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells.
Trends Biochem. Sci., 12, 20-23.
- LEE, P.C., BOCHNER, B.R. and AMES, B.N. (1983)
AppppA, heat-shock stress and cell division.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7496-7500.
- LI, G.C. and SHRIEVE, D.C. (1982)
Thermal tolerance and specific protein synthesis in Chinese hamster fibroblasts exposed to prolonged hypoxia.
Exp. Cell. Res., 142, 464-468.
- LI, G.C. and HAHN, G.M. (1987)
Influence of temperature on the development and decay of thermotolerance and heat shock proteins.
Radiat. Res., 112, 517-524.
- LINDQUIST, S. (1986)
The heat shock response.
Ann. Rev. Biochem., 55, 1151-1191.

- LINDQUIST, S. and CRAIG, E.A. (1988)
The heat shock response.
Ann. Rev. Genet., 22, 631-677.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGHT, N.J., FAM, A.L. and RONDAL, R.J. (1951)
Protein measurement with folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MBEMBA, F., HOUBION, A., RAES, M. and REMACLE, J. (1985)
Subcellular localisation and modification with ageing of glutathione,
glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human
fibroblasts.
Biochem. Biophys. Acta, 838, 211-220.
- MORGAN, R.W., CHRISTMAN, M.F., JACOBSON, F.S., STORZ, G. and AMES,
B. (1986)
Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimorium* overlap
with heat shock and other stress proyein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8059-8063.
- MICHIELS, C., RAES, M. and REMACLE, J. (1986)
A new experimental model to study oxygen toxicity.
Arch. Int. Physiol. Biochem., 94, 513-551.
- MICHIELS, C., RAES, M, ZACHARY, M-D., DELAIVE, E. and REMACLE, J.
(1988 a)
Microinjection of antibodies against superoxide dismutase and glutathione
peroxidase.
Exp. Cell. Res., 179, 581-589.
- MICHIELS, C. and REMACLE, J. (1988 b)
Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate
their physiological importance.
Eur. J. Biochem., 177, 435-441.
- MOSSER, D.D. and BOLS, N.C. (1988)
Relationship between heat shock protein synthesis and thermotolerance in
rainbow trout fibroblasts.
Journal of comparative physiology B, 158, 457-467.
- MUNRO, S. and PELHAM, H.R.B. (1986)
An HSP 70-like protein in the ER: identity with the 78 Kd Glucose-
Regulated Proyein and Immunoglobuline heavy chain Binding Protein.
Cell, 46, 291-300.
- NEIDHARDT, F.C., VANBOGELEN, R.A. and VAUGHN, V. (1984)
The genetics and regulation of heat shock proteins.
Ann. Rev. Genet., 18, 295-329.
- NEVES, A.M., BARAHONA, I., GALEGO, L. and RODRIGUES-POUSADA, C.
(1987)
Ubiquitin genes in *Tetrahymena pyriformis* and their expression during heat
shock.
Gene, 73, 87-96.
- OMAR, R.A., YANO, S. and KIKKAWA, Y. (1987)
Antioxidants enzymes and survival of normal and simian virus 40-
transformed mouse embryo cells after hyperthermia.
Cancer Res., 47, 3473-3478.

- PELHAM, H.R.B. (1982)
A regulatory upstream promoter element in *Drosophila* hsp 70 heat shock gene.
Cell, 30, 517-528.
- PELHAM, H. (1988)
Coming from cold.
Nature, 322, 776-777.
- PIGEOLET, E. (1986)
Rapport d'activité I.R.S.I.A. 1985-86.
Faculté Notre-Dame de la Paix Namur.
- PIGEOLET, E., CORBISIER, P., HOUBION, A., LAMBERT, D., MICHIELS, C., RAES, M., ZACHARY, M-D. and REMACLE, J. (1989)
Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals.
Mech. Age. Dev., (sous presse).
- PLACER, Z., CUSHMAN, L and JOHNSON, C. (1966)
Estimation of production of lipid peroxydation (malondialdehyde) in biochemical systems.
Anal. Bioch., 116, 359-364.
- POLLA, B.S. (1988)
A role for heat shock proteins in inflammation.
Immunology today, 9, 134-137.
- PRADUE, M.L. (1988)
The heat shock response in biology and human disease: a meeting review.
Genes and development, 2, 783-785.
- PRIVALLE, C.T. and FRIDOVICH, I. (1987)
Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2723-2726.
- RAES, M., MICHIELS, C. and REMACLE, J. (1987)
Comparative study of the enzymatic systems against oxygen derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase.
Free Radical Biology & Medicine, 3, 3-7.
- RECHSTEINER, M. (1987)
Ubiquitin-mediated pathway for intracellular proteolysis.
Ann. Rev. Cell Biol., 3, 1-30.
- RISTER, M. and BACHNER, R.L. (1976)
The alteration of superoxyde dismutase, catalase, glutathione peroxydase and NADP(H) cytochrome c reductase in guinea pig, polymorphonuclear and alveolar macrophages during hyperoxia.
J. Clin. Invest., 58, 1174-1184.
- SAEDI, M.S., SMITH, C.G., FRAMPTON, J., CHAMBERS, I., HARRISON, P.R. and SUNDE, R.A. (1988)
Effect of Selenium status on mRNA levels for glutathione peroxidase in rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 153, 855-861.

- SANCHEZ, E.R., MESKINCHI, S., TIENRUNGROJ, W., SCHLESINGER, M.J. and TOFT, D.O. (1987)
Relationship of the 90 kDa Murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the HeLa cells glucocorticoid receptor.
J. Biol. Chem., 262, 6986-6991.
- SCIANDRA, J.J., SUBJEK, J.R. and HUGHES, C. (1984)
Induction of glucose-regulated proteins during anaerobic exposure and heat shock proteins after reoxygenation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4843-4847.
- SCHLESINGER, M.J. (1986)
Heat shock proteins: the search for functions.
J. Cell. Biol., 103, 321-325.
- SCHULTE-FOHLIENDE, D. and VON SONNTAG, C. (1985)
Radiolysis of DNA and model systems in the presence of oxygen.
in: Oxidative stress. Edité par SIES, H., 11-40.
- SCOTT, D.L., KELLEHER, J. and LOSOWSKY, M. (1977)
The influence of dietary Selenium and vitamin E on glutathione peroxidase and glutathione in rat liver.
Biochem. Biophys. Acta, 497, 218-224.
- SIES, H. (1985)
Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs.
in: Oxidative stress. Edité par SIES, H., 73-90.
- SKELLY, S., COLEMAN, T., FU, C-F., BROT, N. and WEISSBACH, H. (1987)
Correlation between the 32 kDa σ factor levels and *in vitro* expression of *Escherichia coli* heat shock genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 8365-8369.
- SKELLY, S., FU, C-F., BALIE, B., REDFIELD, B., COLEMAN, T. BROT, N. and WEISSBACH, H. (1988)
Antibody to σ_{32} cross-reacts with DnaK: association of DnaK protein with *E. coli* RNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5497-5501.
- SLATER, T.F. (1984)
Free radical mechanisms in tissue injury.
Biochem. J., 222, 1-15.
- SOMVILLE, M., HOUBEN, A., RAES, M., HOUBION, A., HENIN, V. and REMACLE, J. (1985)
Alteration of enzymes in ageing human fibroblasts in culture.
III. Modification of superoxyde dismutase as an environmental and reversible process.
Mech. Ageing Dev., 29, 35-51.
- SORGER, P.K. and PELHAM, H.R.B. (1987)
Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major hsp70 like protein in unstressed rat cells.
EMBO, 6, 993-998.
- TANGUAY, R.M. (1988)
Transcriptional activation of heat-shock genes in eukaryotes.
Biochem. Cell. Biol., 66, 584-593.