

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire.

WIRTH D. *, CHRISTIANS E.S.¹, DRION P.V.***, DESSY-DOIZE C.***, GUSTIN P.*

Université de Liège - Faculté de Médecine Vétérinaire - bd de Colonster, B41, 4000 Liège

* Secteur de Pharmacologie-Pharmacothérapie-Toxicologie, Département des sciences fonctionnelles.

** Secteur de Physiologie de la Reproduction, Département des sciences fonctionnelles ;

*** Secteur d'Histologie et Embryologie, Département de morphologie et pathologie.

¹ Department of Internal Medicine, Molecular Cardiology Research Laboratories, the University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas 75390-8573

Correspondance : Drs P. GUSTIN & D. WIRTH.,

tél. : 0032(0)4/366.41.75 – Fax : 0032(0)4/366.41.76 – Email : p.gustin@ulg.ac.be

RESUME : L'exposition de tout organisme à des températures élevées induit l'expression cellulaire rapide et transitoire de protéines spécifiques, les protéines de choc thermique (Hsps pour "heat shock proteins"). Cette réponse des cellules au choc thermique ou "*heat shock response*" a été initialement découverte chez la drosophile. Les gènes *hsps* furent parmi les premiers gènes eucaryotes à être clonés et utilisés comme paradigme dans l'étude des mécanismes de régulation transcriptionnelle faisant intervenir l'activation d'un ou plusieurs "*heat shock factors*" (HSFs). C'est plus récemment que l'étude des fonctions des Hsps, particulièrement Hsp70, a débuté. Le rôle protecteur de celle-ci, lié à sa fonction de "chaperon" protéique, a été déduit d'expériences montrant que l'induction de l'expression de Hsp70 lors d'un stress était associée au développement d'une tolérance cellulaire vis-à-vis d'un stress ultérieur. En plus d'un intérêt fondamental pour la compréhension de la "réponse au choc thermique", deux axes de recherche appliquée se sont développés visant à investiguer la possibilité d'utiliser l'expression de Hsp70 comme biomarqueur de souffrance cellulaire d'une part et, d'autre part, d'exploiter ses fonctions comme moyen de protection des cellules contre divers types d'agressions. Cette revue décrit l'historique des découvertes sur la "réponse au choc thermique", le mécanisme régulant l'expression de Hsp70 ainsi que les perspectives intéressantes s'ouvrant à l'utilisation de l'expression de Hsp70 en tant que biomarqueur et outil thérapeutique.

INTRODUCTION

Les cellules de tout organisme vivent dans des conditions environnementales physiologiques normalement stables mais n'excluant pas des agressions aiguës ou chroniques. Cette situation impose une faculté d'adaptation indispensable pour la survie, nécessitant la mise en œuvre de mécanismes permettant la détection du stress, quelle qu'en soit la nature, et les réponses adéquates visant à en

moduler les effets. La première description des manifestations cellulaires de la "réponse au choc thermique" ("*heat shock response*") a été fournie, en 1962, par Ritossa. Ce dernier observa une série d'élargissements ou renflements ("*puffing*") au niveau de certains des chromosomes géants des glandes salivaires de drosophiles soumises à un choc thermique. Au cours de la décennie suivante, plusieurs observations importantes ont permis de préciser la nature de ce phénomène. Il a ainsi été montré que les renflements étaient (a) induits par plusieurs autres stress que l'hyperthermie, (b) produits endéans

quelques minutes après le stress, (c) associés à une nouvelle synthèse de RNA, (d) trouvés dans différentes espèces de drosophiles et dans beaucoup de tissus différents, et (e) accompagnés par la régression d'autres renflements présents avant le stress (Ritossa F., 1962; Berendes, 1965; Berendes, 1968; Ashburner, 1970; Leenders et Berendes, 1972). Il a été déduit que ces élargissements chromosomiques correspondaient à l'induction rapide et vigoureuse de l'activité de gènes spécifiques lors de stress (les "*heat shock genes*"), accompagnée par la répression d'autres séquences géniques.

Foot notes : Nomenclature des Hsps

Hsp : désigne une protéine de choc thermique

HSP : désigne une famille de Hsps

hsp : désigne un gène codant pour une Hsp

HSF : désigne un facteur de transcription de la "réponse au choc thermique"

Douze ans après l'observation de Ritossa, Tissieres et ses collaborateurs (1974) ouvraient la voie de l'exploration par l'analyse moléculaire de cette réponse en démontrant que l'apparition de ces renflements coïncidait avec la synthèse d'un petit nombre de nouvelles protéines distinctes, qualifiées de "heat shock proteins" (Hsps) et purifiées chez la drosophile. Au départ, la "réponse au choc thermique" a soulevé un grand intérêt, surtout en tant que modèle pour l'investigation de la structure et la régulation de gènes inductibles. Les gènes *hsp*s de la drosophile ont été parmi les premiers à avoir été clonés chez les eucaryotes (Livak *et al.*, 1978; Schedl et Donelson, 1978; Moran *et al.*, 1979; Pelham, 1982). A la suite de ces travaux, l'existence de ce phénomène, d'abord rapporté chez un insecte, a été confirmée chez les levures (Miller *et al.*, 1979), dans les cellules d'oiseaux en culture (Kelley *et al.*, 1980), et finalement dans une variété extraordinaire de tissus et d'organismes allant des archéobactéries jusqu'à l'homme. La première mise en évidence de l'universalité de la "réponse au choc thermique" fut rapportée par Schlesinger et collaborateurs en 1982.

Il est intéressant de noter que la température d'induction des *hsp*s est intimement liée à l'environnement habituel de l'espèce considérée. Ainsi, chez la drosophile, l'induction se produit entre 33 et 37°C, températures fréquentes lors des jours chauds d'été (Lindquist, 1980). Chez les bactéries thermophiles dont la croissance se fait à 50°C, les gènes *hsp*s sont activés quand les températures atteignent 60°C (Daniels *et al.*, 1984) alors qu'ils le sont dès 25°C chez les bactéries de l'arctique (Cloutier *et al.*, 1992). Chez les mammifères, l'expression des Hsps est observée aux températures enregistrées au cours de la fièvre (Blake *et al.*, 1990). En plus du choc thermique, de nombreux stress, tels que l'exposition à certains agents chimiques, physiques, et biologiques, ont été identifiés comme inducteurs de la synthèse de Hsps (tableau 1). Tous ces inducteurs ont, semble-t-il, pour point commun un effet altérant les structures protéiques

(Feige *et al.*, 1996). Vu le lien direct avec le stress cellulaire, ce caractère inductible de certaines Hsps a soulevé un intérêt particulier pour la recherche sur l'utilisation de leur expression comme biomarqueur de la souffrance cellulaire, en toxicologie notamment, mais également dans le domaine médical où les Hsps ont été étudiées à des fins de diagnostic.

Ces premières découvertes consacrées aux aspects génétiques de la "réponse au choc thermique" semblaient présenter celle-ci comme un mécanisme d'adaptation général à des conditions pouvant conduire à des dommages cellulaires. Les expériences visant à mettre en évidence les fonctions des Hsps sont apparues un peu plus tard. L'ubiquité de ces protéines ainsi que leur conservation remarquable au cours de la phylogénèse suggèrent leur importance pour la survie de l'organisme. Par exemple, les gènes *hsp70* montrent 50% d'homologie de séquence entre celui de l'humain et le gène correspondant d'*E. Coli* et plus de 70% avec celui de la drosophile (Hunt et Morimoto, 1985). Le rôle cytoprotecteur attribué à l'expression des Hsps a pu être déduit de la découverte d'un phénomène particulier, désigné par le vocable de "thermotolérance" et mis en évidence pour la première fois par Li et Werb en 1982 dans des fibroblastes de hamster. Ainsi, après une courte exposition de ces cellules à un choc thermique subléthal, une résistance transitoire aux effets cytotoxiques d'un nouveau stress thermique, à priori léthal, apparaît. Le parallélisme entre la cinétique de l'induction de Hsps et celle de la thermotolérance suggère leur participation dans ce phénomène (Li et Werb, 1982; Weber, 1992), qui fut ensuite reproduit dans divers types cellulaires et dans une large variété d'organismes, avant d'être élargi à d'autres types de stress. De ces observations naquit une nouvelle notion, la "tolérance croisée", basée sur le fait que la synthèse accrue des Hsps induite par une forme de stress peut conférer une protection envers des dommages causés par d'autres agressions. Le rôle protecteur des Hsps est attribué à une propriété fonctionnelle qui leur est

commune et définie par le terme de "chaperon moléculaire". Les Hsps interagissent avec les protéines immatures ou anormales, inhibant ainsi leur agrégation et augmentant l'efficacité de leur (re)-mise en conformation tridimensionnelle adéquate (Gething et Sambrook, 1992; Wirth *et al.*, 2002b). A travers les années, la plus grande compréhension du phénomène de tolérance conférée par l'induction des Hsps a ouvert de nouvelles voies de recherches basées sur son utilisation dans de nombreux domaines de la médecine thérapeutique.

Les six familles principales de Hsps déterminées chez les mammifères (HSP110, 90, 70, 60, 47 kDa et HSP 25-30 kDa) ont été décrites en détail dans notre précédente synthèse (Wirth *et al.*, 2002b). La famille HSP70 représente certainement la famille de Hsps la plus étudiée et la plus conservée sur le plan phylogénétique. Vu le grand intérêt pour le caractère inductible de l'expression de Hsp70, rassemblant deux protéines non-distinguables entre elles codées par *hsp70.1* et *hsp70.3* (Gunther et Walter, 1994), et vu le rôle critique lui ayant été attribué dans la réponse cellulaire aux situations de stress aigu, c'est à cette catégorie de protéines que sera consacrée la suite de cette synthèse.

REGULATION DE L'EXPRESSION DE HSP70

Signal inducteur

La plupart des protéines de choc thermique sont exprimées de manière constitutive et participent au maintien de l'homéostasie cellulaire (Tanguay *et al.*, 1993; Wickner *et al.*, 1999). Dans des conditions normales, le degré d'expression de Hsp70 est dépendant de l'activité métabolique. L'exposition d'une cellule à un traitement toxique induit trois étapes successives (Burel *et al.*, 1992). La première étape dite d'**altération** se traduit, au niveau moléculaire, par la dégradation de protéines ayant pour conséquence la perte de leur fonction et la formation d'agrégats protéiques

insolubles (Nguyen *et al.*, 1989). Dans un second temps, la "réponse au choc thermique" proprement dite se caractérise par l'activation transcriptionnelle des gènes *hsps* aboutissant, notamment, à la synthèse de Hsp70, détectable à ce moment dans la cellule à des taux bien plus élevés que dans des conditions normales. Enfin, la phase de **récupération**, durant laquelle les altérations morphologiques sont corrigées, termine le processus. Les protéines retrouvent des activités enzymatiques similaires à leurs valeurs initiales (Nguyen *et al.*, 1989). L'activation des gènes *hsps* est alors interrompue.

Une tâche capitale pour la compréhension de la "réponse au choc thermique" a été de déterminer le signal déclenchant l'activation de la synthèse de Hsps sous des conditions normales ou de stress. Sachant que bon nombre d'inducteurs de cette réponse peuvent affecter la conformation des protéines cellulaires, Hightower (1980) suggéra que l'accumulation des protéines anormalement conformées durant la phase d'altération pouvait constituer ce *primum movens*. Cette hypothèse fut par la suite confirmée à plusieurs reprises, notamment de manière très explicite par l'injection de protéines dénaturées dans des cellules non-stressées, résultant en l'induction des gènes *hsps* (Ananthan *et al.*, 1986; Mifflin et Cohen, 1994). De manière générale, deux situations peuvent activer la synthèse de Hsps, à savoir : l'augmentation de la demande pour la synthèse, le repliement et la sécrétion de protéines, et la perturbation de la maturation protéique aboutissant à l'accumulation de protéines anormalement conformées. Le signal moléculaire, capable de déclencher la synthèse de Hsp70, semble donc être un déséquilibre dans l'homéostasie des protéines, et ce pour beaucoup, sinon tous les inducteurs. Une étude de Freeman et collaborateurs (1995), se focalisant sur le stress oxydant comme inducteur de Hsps, indique que ce serait plus précisément l'oxydation des groupements thiols des protéines qui représente le signal initial, menant à la formation de ponts disulfures anormaux et ainsi à la

déstabilisation et la dénaturation de ces protéines. Il a alors été suggéré que l'oxydation des groupements thiols protéiques et non protéiques soit le signal commun responsable de l'activation de la "réponse au choc thermique" par ses inducteurs (Zou *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 2000). Cette dernière généralisation reste cependant controversée.

Heat shock factor

Chez les eucaryotes supérieurs, la régulation de l'expression de Hsp70 se fait au niveau transcriptionnel. L'ARN messager des gènes *hsps* inductibles ne comportant pas d'intron, il ne nécessite pas de maturation nucléaire et est rapidement disponible dans le cytoplasme où sa séquence "leader" favorise sa traduction

(McGarry et Lindquist, 1985). L'induction des *hsps* requiert l'activation et la translocation dans le noyau d'un facteur de transcription, HSF pour "heat shock factor". Celui-ci reconnaît alors des séquences spécifiques, présentes en copies multiples dans le promoteur d'un gène *hsp*, les HSEs pour "heat shock elements" (Wu, 1995) (figure 1). Alors qu'un seul type d'HSF a été décrit chez la levure et la drosophile, une famille multigénique d'HSF a été identifiée chez les plantes et les animaux (pour une revue, voir Morimoto, 1998; Wu, 1995) : HSF1 et HSF2 sont présents chez les mammifères, et HSF3 est caractérisé uniquement dans les cellules d'oiseaux. Un facteur additionnel HSF4 a été décrit récemment dans les cellules humaines. HSF1 et 3 fonctionnent comme des activateurs

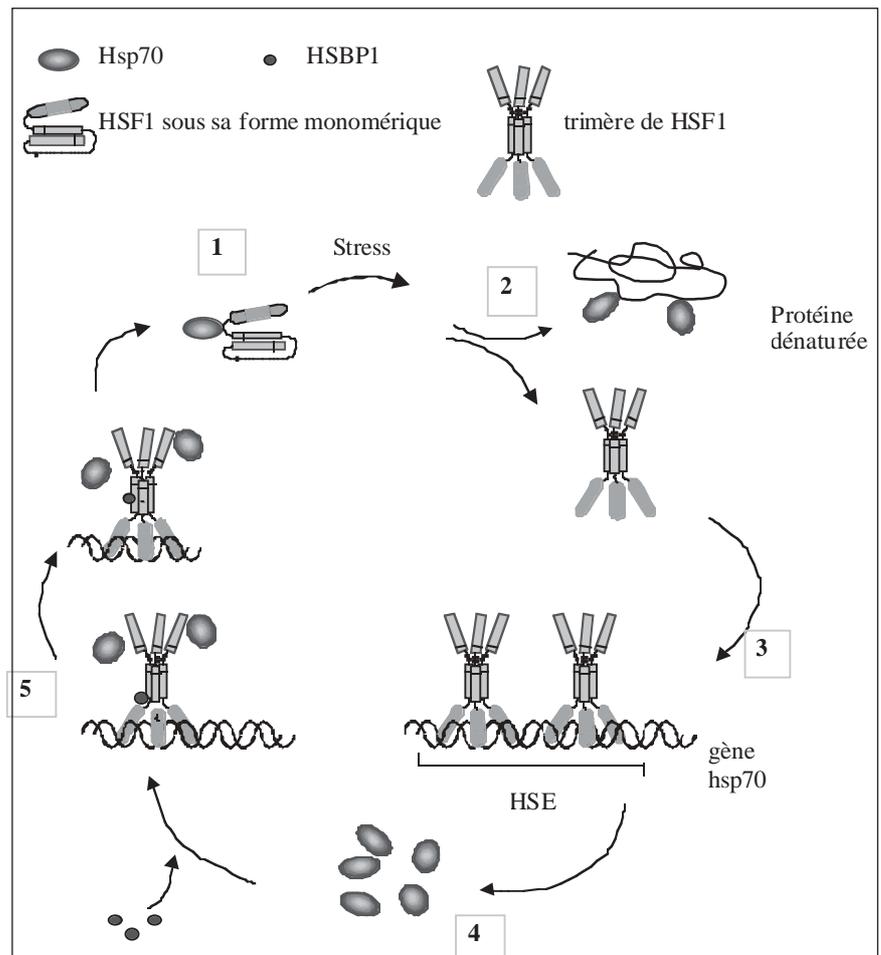


Figure 1: Cycle de régulation de HSF1 d'après Morimoto et collaborateurs (1998). (1) Dans les conditions physiologiques, la forme monomérique de HSF1 est maintenue dans un état inerte par une liaison à Hsp70 (et à un co-chaperon Hdj-1). (2) Lors de stress, le recrutement cellulaire de Hsp70 pour prévenir l'agrégation de protéines endommagées libère HSF1 qui est alors trimérisé. (3) Cette libération active HSF1 pour sa liaison aux HSEs. (4) Il s'ensuit une transcription des gènes *hsps* inductibles et une accumulation cellulaire de Hsps, dont Hsp70. (5) Une fois les corrections protéiques accomplies, les Hsp70 se lient à nouveau et en grand nombre au domaine de transactivation de HSF1 qui est dès lors inhibé. La dissociation des trimères de HSF1 est conditionnée par le facteur HSBP1 (heat shock factor binding protein 1), complétant ainsi le cycle de régulation de HSF1.

transcriptionnels répondant au stress, alors que HSF2 est activé durant des stades spécifiques du développement embryonnaire et durant la différenciation cellulaire et l'inhibition du protéasome dépendant de l'ubiquitine (Morimoto, 1998). HSF4 agirait plutôt comme un inhibiteur (Nakai *et al.*, 1997). Quoiqu'il en soit, en ce qui concerne la réponse au stress, HSF1 semble le principal facteur d'activation transcriptionnel chez les mammifères. En effet, la déficience pour le gène *Hsf1* abolit totalement l'induction de l'expression des principales Hsps après un choc thermique ainsi que la thermotolérance (McMillan *et al.*, 1998 ; Xiao *et al.*, 1999).

HSF1 est composé de plusieurs domaines auxquels une fonction spécifique est attribuée: un domaine de liaison à l'ADN, un second responsable de la trimérisation de HSF qui est une étape nécessaire à son activation, un troisième permettant l'activation transcriptionnelle et, adjacent à ce dernier, une séquence dont le rôle semble être de supprimer l'activité de HSF par le biais d'une liaison avec le domaine de trimérisation (Morimoto, 1998) (figure 1). En l'absence de stimulation, HSF1 existe dans le cytoplasme et le noyau sous forme de

monomère inerte manquant d'activité transcriptionnelle. L'activité de liaison au DNA ainsi que le domaine de transactivation transcriptionnelle sont réprimés par des interactions intramoléculaires et une phosphorylation constitutive des résidus sérine. Le choc thermique et d'autres stress causent une dérépression de HSF1 menant à la formation d'un trimère ayant une haute affinité pour les HSEs des promoteurs de gènes *hsp*s ; une hyperphosphorylation des résidus de sérine résulte ensuite en la compétence transcriptionnelle proprement dite.

La compréhension des événements régissant le cycle d'activation-désactivation de HSF1 a révélé que les chaperons moléculaires tels que les Hsp70 semblent jouer un rôle direct dans la régulation de leur propre expression (Craig et Gross, 1991) (figure 1). D'autres facteurs intervenant également dans ce cycle de régulation ont été récemment décrits, tel le facteur HSBP1 (*heat shock factor binding protein 1*) (Satyal *et al.*, 1998). Si les connaissances portant sur les facteurs de régulation négative de HSF1 évoluent rapidement, celles concernant les éléments activateurs sont à ce jour peu avancées. En effet,

alors que la phosphorylation inducible paraît être importante pour l'activation transcriptionnelle de HSF1 (Cotto *et al.*, 1996), les sites importants ainsi que les kinases/phosphatases impliquées ne sont pas encore identifiés.

L'identification des mécanismes contrôlant l'activation de HSF1 constituera un avancement majeur dans la compréhension de la régulation de la "heat shock response" dans les cellules de mammifères et dans la mise au point de nouvelles molécules inductrices.

HSP70 : BIOMARQUEUR CELLULAIRE DU STRESS

Biomarqueur d'effet en toxicologie

Considérant que l'induction de l'expression de Hsp70 représente un mécanisme de défense commun à de nombreuses cellules et activé uniquement au moment d'un stress dont la nature est très variable, il n'est pas étonnant de constater qu'une attention considérable a rapidement été portée sur cette réponse en tant que biomarqueur potentiel. Une définition du biomarqueur adaptée à l'écotoxicologie a été proposée par Depledge (1994). Le biomarqueur toxicologique serait la réponse biologique (biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale) qui, dans un tissu, dans les liquides corporels ou au niveau d'un organisme dans son ensemble, donne une mesure d'exposition à un toxique et/ou d'effets produits par un ou plusieurs polluants. Les biomarqueurs sont des outils importants en toxicologie. Ils permettent d'améliorer l'évaluation du risque d'altérations cellulaires résultant d'une exposition à des xénobiotiques. Beaucoup de molécules intracellulaires ont été proposées ou utilisées comme biomarqueurs. Par exemple, les enzymes cytochrome P450, les métallothionéines et les enzymes antioxydants, qui ont pour fonction de complexer ou de métaboliser des composés nocifs, appartiennent à la catégorie des biomarqueurs d'exposition. Ils indiquent la présence de xénobiotiques plutôt que leur toxicité.

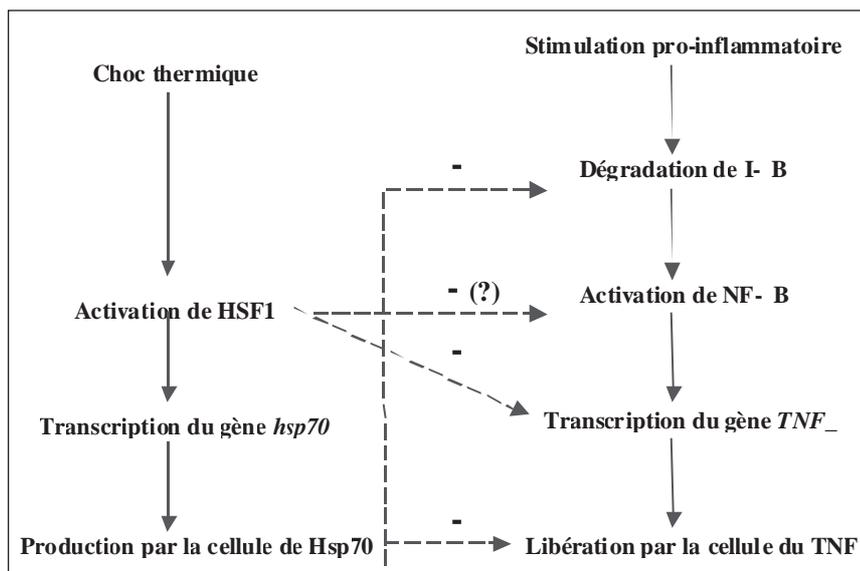


Figure 2: Cycle de régulation de HSF1 d'après Morimoto et collaborateurs (1998). (1) Dans les conditions physiologiques, la forme monomérique de HSF1 est maintenue dans un état inerte par une liaison à Hsp70 (et à un co-chaperon Hdj-1). (2) Lors de stress, le recrutement cellulaire de Hsp70 pour prévenir l'agrégation de protéines endommagées libère HSF1 qui est alors trimérisé. (3) Cette libération active HSF1 pour sa liaison aux HSEs. (4) Il s'ensuit une transcription des gènes *hsp* inductibles et une accumulation cellulaire de Hsp, dont Hsp70. (5) Une fois les corrections protéiques accomplies, les Hsp70 se lient à nouveau et en grand nombre au domaine de transactivation de HSF1 qui est dès lors inhibé. La dissociation des trimères de HSF1 est conditionnée par le facteur HSBP1 (*heat shock factor binding protein 1*), complétant ainsi le cycle de régulation de HSF1.

Tableau I : Principaux inducteurs de la synthèse des protéines de choc thermique

Conditions de stress	Etats physiopathologiques	Conditions physiologiques
Choc thermique	Fièvre, inflammation	Cycle cellulaire
Métaux lourds	Ischémie-reperfusion,	Développement embryonnaire
Ethanol	Hypoxie	Différenciation cellulaire
Arsénite	Infection bactérienne, virale	Stimulation hormonale,
Oxydants, radicaux libres	Cancer	Facteurs de croissance
Radiations		
Analogues d'acides aminés		
Ionophores		
Déplétion d'ATP		
Hydroxylamine		
Médicaments antinéoplasiques		
Exercice		

En revanche, le mécanisme d'induction et la fonction d'Hsp70 introduisent un lien direct entre les dommages protéiques et le niveau d'expression d'Hsp70. Cette dégradation protéique représente un effet négatif du toxique présent dans l'environnement cellulaire qui peut être détecté par la cellule et contre lequel elle se défend par l'expression de Hsp70 qui prévient et répare ces dommages. Le monitoring de l'induction de Hsp70 dans les cellules peut donc être considéré comme un biomarqueur moléculaire d'effet et être exploité pour le développement de nouveaux tests toxicologiques.

Plusieurs modèles biologiques, comme des lignées cellulaires en culture ou des organismes entiers, ont été utilisés pour tester l'utilisation des Hsps comme biomarqueurs d'effets de polluants environnementaux (pour une revue, voir Sanders, 1993; Ryan et Hightower, 1996). Les perspectives se dégageant des principales études réalisées dans ce domaine sont très brièvement évoquées dans le tableau 2. Après avoir testé et constaté la grande diversité des agents inducteurs de la synthèse des Hsp70 et la sensibilité de cette réponse par rapport à des critères conventionnels tels que la croissance, la survie ou la capacité de reproduction, ces protéines ont été proposées comme marqueurs sensibles et précoces d'effets non-spécifiques dans les études de toxicité environnementale (Ryan et Hightower, 1996). La sensibilité de ce

marqueur a notamment été démontrée par des expériences exposant des cellules à une gamme de concentrations croissantes en toxique où l'induction de Hsp70 commençait, pour les métaux lourds, à des doses inférieures à celles révélant une cytotoxicité détectable au niveau cellulaire (Ait-Aissa *et al.*, 2000). La précocité peut, quant à elle, être illustrée par des exemples résultant de deux études de Goering et collaborateurs (1992; 1993) réalisées chez le rat et qui ont montré que l'expression de Hsp70 dans le foie ou le rein, après une exposition des animaux au cadmium ou au mercure, précède le moment d'apparition des signes détectables d'hépatotoxicité et de néphrotoxicité. De plus, la durée de l'activation du gène *hsp70* serait proportionnelle à la quantité de protéines endommagées, laquelle reflèterait, à son tour, l'intensité et la durée du stress subi. Des expériences exposant des organismes à une agression chimique ont en effet montré que la réponse Hsp70 était "concentration- et durée-dépendante" (Snyder *et al.*, 2001). Cette caractéristique est un avantage majeur du système Hsp70 en tant que biomarqueur.

La conception de modèles transgéniques pour l'évaluation de la toxicité de composés chimiques ou de médicaments a fourni une alternative intéressante à l'expérimentation animale conventionnelle. Ainsi, des transgènes composés d'un gène rapporteur

sous le contrôle du promoteur du gène *hsp70* ont été développés et introduits dans des cellules et des organismes (Fischbach *et al.*, 1993; Sacco *et al.*, 1997; Link *et al.*, 1999; Wirth *et al.*, 2002a). L'activité transcriptionnelle du promoteur *hsp70* peut ainsi être évaluée par la mesure de la quantité du produit rapporteur exprimé qui lui est directement proportionnelle. Les avantages des produits rapporteurs utilisés, tel que l'hormone de croissance (GH) (Sacco *et al.*, 1997), la luciférase (Wirth *et al.*, 2002a), et la "green fluorescent protein" (GFP) (Fischbach *et al.*, 1993; Link *et al.*, 1999), sont d'être facilement décelés dans un tissu par dosage colorimétrique et/ou aisément accessible *in vivo*. L'utilisation de ces transgènes facilite donc grandement l'étude au niveau plasmatique, tissulaire, ou cellulaire de l'expression de Hsp70. Comparés aux bio-essais conventionnels, les modèles transgéniques utilisant *hsp70* permettraient aux études toxicologiques d'être effectuées plus rapidement et de réduire les besoins en animaux de laboratoire ou en matériel biologique, ainsi que de générer davantage de données, vu la facilité des méthodes de mesures.

Une nuance est cependant à apporter à ces observations prometteuses en soulignant le fait que tous les types de stress cellulaires de même que tous les toxiques n'induisent pas systématiquement une expression de Hsp70,

Tableau II : Modèles testés pour l'utilisation de Hsp70 comme biomarqueur en toxicologie

Modèles biologiques	Toxiques testés	Paramètres mesurés	Perspectives	Références
Cellules humaines (HT29)	Hyperthermie, hypothermie, éthanol, propanol	Hsp70 taux de croissance	Biomarqueur de pollution	(Delmas <i>et al.</i> , 1995)
Cellules humaines hépatiques (HepG2)	Métaux lourds (CdCl ₂ , NaAsO ₂ , AgNO ₃ , CuCl ₂ , MnCl ₂ , Pb(NO ₃) ₂ , TiNO ₃ , CoCl ₂ , NiCl ₂ , ZnSO ₄ , Hg(NO ₃) ₂ and AlCl ₃)	mRNA de <i>hsp70</i> lactate déhydrogénase (cytotoxicité)	Etude des mécanismes de toxicité	(Steiner <i>et al.</i> , 1998)
	Métaux lourds, hydrocarbonés aromatiques	mRNA de <i>hsp70</i> lésions de l'ADN taux de croissance	Test de criblage pour tester la toxicité de nouvelles molécules	(Todd <i>et al.</i> , 1999)
Oursins	Hyperthermie, hypothermie, eaux polluées, lésions accidentelles	Hsp70	Biomarqueur de stress	(Matranga <i>et al.</i> , 2000)
Poissons (Oreochromis niloticus)	Herbicide oxyfluorfen	Hsp70 dans le foie et les reins	Biomarqueur d'effet de contamination de l'eau	(Hassanein <i>et al.</i> , 1999)
Moules	Hydrocarbonés	Hsp70 mRNA de cytochrome P450	Biomarqueur d'effet de contamination de l'eau	(Snyder <i>et al.</i> , 2001)
Lombrics	Hyperthermie, métaux lourds, chloroacétamide, pentachlorophenol	Hsp70 lésions de toxicité	Biomarqueur d'effet de contamination du sol	(Nadeau <i>et al.</i> , 2001)
Souris	Hyperthermie, cadmium, paraquat, parathion, ozone	mRNA de <i>hsp70</i> dans les poumons fonction respiratoire, inflammation	Biomarqueur d'effet de pollution de l'environnement.	(Wirth <i>et al.</i> , 2002)

dont le caractère universel est à relativiser. De plus, en étudiant l'induction de *hsp70*, sur un même modèle par différents chimiques organiques et inorganiques comme les métaux, les pesticides, l'ozone, les acides..., il est apparu que la réponse était dépendante du toxique utilisé, contredisant de la sorte l'absence de spécificité du système. Non seulement certains toxiques n'induisent pas *hsp70* malgré une cytotoxicité démontrée mais la sensibilité et la précocité de la réponse diffèrent aussi d'un stress à l'autre (Cohen *et al.*, 1991 ; Ait-Aissa *et al.*, 2000 ; Wirth *et al.*, 2002a). Les contradictions relevées dans la littérature concernant le pouvoir inducteur d'un toxique, par exemple l'ozone (Su et Gordon, 1997 ; Wu *et al.*, 1999) et les endotoxines (McComb et Spurlock, 1997 ; Flohe *et al.*, 1999), démontrent bien la nécessité d'évaluer chaque système biologique par un rapport à une série d'agressions avant de le proposer comme bio-indicateur. Bien que la réponse Hsp70

semble stimulus-dépendante, le critère régissant cette dépendance reste à établir plus précisément afin de mieux standardiser ou caractériser l'utilisation de Hsp70 comme biomarqueur.

Biomarqueur de lésions et outil diagnostique en sciences biomédicales

Alors qu'en toxicologie environnementale l'exploitation de l'expression de Hsp70 a pour but de développer un biomarqueur fiable d'effets induits par divers toxiques présents dans l'environnement cellulaire, en médecine, le but poursuivi dans le cadre d'études biomédicales est tout autre et consiste à démontrer que, dans des organismes multicellulaires, l'expression de Hsp70 dans un organe ou un tissu peut être prédictive de lésions survenant au cours d'une pathologie. L'exemple le plus pertinent et le plus étudié est certainement l'étude de la réponse Hsp70 dans différents tissus ayant subi une période d'ischémie et

de reperfusion. Ainsi, chez le rat, une ischémie transitoire du cerveau provoque une expression de Hsp70 (Dienel *et al.*, 1986) dont l'intensité varie d'une région à l'autre du cerveau selon le type cellulaire endommagé. Il semble que cette localisation spécifique soit corrélée à la vulnérabilité cellulaire à l'ischémie (Sharp *et al.*, 1993), mais aussi à d'autres types de stress comme une hyperthermie, une hémorragie, une incision chirurgicale ou une injection d'acide (Brown, 1990 ; Rajdev et Sharp, 2000). Inversement, les jeunes gerbilles de 7 jours dont le cerveau est connu pour sa résistance à l'ischémie-reperfusion ne produisent pas de Hsp70 (Soriano *et al.*, 1994). Cette protéine a donc été considérée comme marqueur fiable de lésion cellulaire pouvant aider à identifier des aires de sensibilité à certains stress (Rajdev et Sharp, 2000). Des observations comparables ont été obtenues dans le rein, le foie et le cœur subissant une ischémie-reperfusion (Broughan *et al.*, 1996 ;

Tableau III : Modèles expérimentaux démontrant la tolérance conférée par un choc thermique sublétalement vis-à-vis d'une exposition ultérieure à divers stress

Nature du stress	Paramètres modifiés par un choc thermique	Références
Choc thermique létalement	Mortalité ↓	(King <i>et al.</i> , 2002 ; Li <i>et al.</i> , 1983)
Pancréatite induite par administration de ceruléine	Lésions pancréatiques ↓	(Wagner <i>et al.</i> , 1996)
ARDS par instillation de phospholipase A ₂	Mortalité ↓ inflammation pulmonaire ↓ lésions pulmonaires ↓	(Villar <i>et al.</i> , 1993)
Choc septique	Lésions pulmonaires ↓ mortalité ↓	(Koh <i>et al.</i> , 1999) (Hotchkiss <i>et al.</i> , 1993 ; Chu <i>et al.</i> , 1997)
Transplantation de poumon	Lésions d'ischémie/reperfusion ↓	(Hiratsuka <i>et al.</i> , 1998)
Ischémie de rein	Lésions ↓	(Perdrizet <i>et al.</i> , 1990)
Ischémie de foie	Lésions ↓	(Saad <i>et al.</i> , 1995)
Ischémie du coeur	Taille de l'infarctus ↓, contractilité ↑	(Currie <i>et al.</i> , 1988 ; Marber <i>et al.</i> , 1993 ; Hutter <i>et al.</i> , 1994)

Nishizawa *et al.*, 1996 ; Akcetin *et al.*, 2000). La notion de proportionnalité entre l'expression de Hsp70 et le degré de lésions est aussi à souligner. Leoni et collaborateurs (2000) ont montré, par exemple, que l'expression de Hsp70 dans le foie et dans le cerveau après différents chocs thermiques était dépendante de la température corporelle atteinte et que la plus forte induction de Hsp70 correspondait à l'étendue des dégâts cellulaires les plus importants. Ces observations ont permis aux cliniciens d'envisager l'utilisation de l'expression de protéines de stress comme indicateur sensible de lésions *in vivo*, pouvant être utilisé comme outil diagnostique. Un autre domaine médical dans lequel Hsp70 a été envisagée est celui de la cancérologie. En effet, pour un type de tumeur donné, la modification de l'expression de Hsp70 peut être un marqueur du processus tumoral et constituer à ce titre un outil pronostique (Ciocca *et al.*, 1993 ; Kim *et al.*, 1998 ; Vargas-Roig

et al., 1998 ; Jolly et Morimoto, 2000). Il s'agit là de champs d'investigation qui doivent encore être explorés.

Effet protecteur des Hsp70

Il est maintenant établi que l'expression de Hsp70 par la cellule lors de stress, reflétant les lésions cellulaires, a pour but de s'en protéger. Bien que les mécanismes ne soient pas encore clairement identifiés, les preuves attestant de l'effet protecteur de Hsp70 sont maintenant nombreuses. Les passer en revue de manière exhaustive donnerait à cette synthèse un caractère descriptif n'aidant pas toujours à donner une vue d'ensemble qui manque encore parfois dans ce domaine. Nous avons préféré nous limiter aux études basées sur l'analyse de modèles expérimentaux ayant un lien direct avec des situations pathologiques majeures comme l'ischémie ou le choc septique.

Le phénomène de la "thermotolérance", démontré aussi bien *in vitro* (Li et Werb, 1982) qu'*in vivo* (Li *et al.*, 1983), a été signalé ci-dessus et est défini comme la capacité d'une cellule ou d'un organisme à résister à une agression thermique après une pré-exposition à un choc thermique sublétalement. Par la suite, de nombreux exemples de "tolérance croisée", acquise le plus souvent après un choc thermique, vis-à-vis d'agressions diverses ont été accumulés. Les principaux sont résumés dans le tableau 3. La protection contre les lésions induites par une ischémie suivie d'une reperfusion a été un domaine particulièrement étudié jusqu'ici et qui introduit une notion supplémentaire de tolérance induite, non seulement par un choc thermique, mais aussi par des stress d'autres natures. Ainsi, ayant observé que l'ischémie provoquait elle-même une expression accrue de Hsp70 au niveau du coeur et du cerveau, il a ensuite été démontré qu'un arrêt circulatoire de courte

durée protégeait aussi des lésions provoquées par un infarctus sévère ultérieur dans ces deux organes (Marber *et al.*, 1993; Nishi *et al.*, 1993). La tolérance conférée par une exposition à une large gamme d'autres inducteurs de la "réponse au choc thermique" a également été testée et les expériences s'y rapportant seront décrites plus loin.

Cette protection conférée par un premier traitement est corrélée d'un point de vue quantitatif et cinétique à une élévation de l'expression de Hsp70, suggérant une relation causale entre ces deux phénomènes. Cependant, il s'agit là d'un argument strictement circonstanciel. Le plus souvent, ces traitements activent également d'autres voies potentiellement protectrices rendant l'identification des mécanismes responsables difficile. Le recours à la biologie moléculaire apporte des réponses à ce problème. Des souris transgéniques, contenant le gène *hsp70* sous le contrôle d'un promoteur à activité constante comme celui de la β -actine, expriment de manière constitutive une grande quantité de Hsp70. Comparés aux sujets non-transgéniques, ces animaux ont montré une résistance accrue à l'ischémie du cœur (Marber *et al.*, 1995; Plumier *et al.*, 1995) et du cerveau (Rajdev *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001a), démontrant ainsi, en l'absence d'un pré-conditionnement, l'effet protecteur de Hsp70 seule. Inversement, l'inhibition de l'expression ou de l'activité de Hsp70 augmente la sensibilité au stress. Ainsi, l'injection d'anticorps anti-Hsp70, perturbe la fonction de cette protéine et rend des cellules intolérantes au choc thermique (Riabowol *et al.*, 1988). Ce traitement fait également disparaître l'effet bénéfique de la "réponse au choc thermique" induite par une courte période ischémique vis-à-vis d'une ischémie sévère ultérieure, dans le cerveau de gerbille (Nakata *et al.*, 1993). La technique, plus récente, du *knock out*, qui consiste à générer des animaux déficients pour un gène, et donc incapable d'exprimer son produit, a apporté une méthode encore plus efficace pour déterminer le rôle de chaque protéine impliquée dans la "réponse au choc

thermique". En effet, des souris knock out pour le(s) gène(s) *hsp70.1* et/ou *hsp70.3* endogène(s) ou pour le gène de son principal facteur de transcription HSF1 ont montré une plus grande sensibilité au choc thermique, une inhibition de la thermotolérance (Xia *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2001), une sensibilité anormale aux endotoxines (Xiao *et al.*, 1999), au cadmium (Wirth *et al.*, 2003), aux UVB (Kwon *et al.*, 2002), de même qu'une augmentation des lésions dues à l'ischémie du cerveau (Lee *et al.*, 2001b). Outre l'identification du rôle de Hsp70 dans le phénomène de tolérance croisée, ces expériences font aussi apparaître le rôle que peuvent jouer les Hsps dont la synthèse est induite au cours d'une agression vis-à-vis de cette même agression.

Mécanismes de protection mis en œuvre par Hsp70

Le rôle joué par Hsp70 étant démontré, il reste à en comprendre les mécanismes. La fonction de "chaperon" moléculaire apporte des éléments de réponse à ce sujet. L'accumulation de Hsp70 peut, par exemple, rétablir l'activité enzymatique de protéines dénaturées pendant un choc thermique (Nguyen *et al.*, 1989; Souren *et al.*, 1999). Cet exemple fait apparaître que les Hsp70 peuvent être utilisées par la cellule dans un processus de récupération au niveau moléculaire en prévenant les conséquences de l'accumulation et de l'agrégation des protéines altérées (Feige *et al.*, 1996; Morimoto et Santoro, 1998). Cette fonction consiste à maintenir les protéines endommagées dans un état intermédiaire soluble, apte à un repliement adéquat futur (Bukau et Horwich, 1998).

Bien que le mécanisme de protection impliquant les propriétés de "chaperon" moléculaire de Hsp70 soit hautement plausible, il n'y a actuellement aucune information directe pour confirmer son importance *in vivo*. D'autres hypothèses, visant à mieux comprendre des mécanismes indirects et faisant intervenir d'autres molécules connues pour influencer sur la nocivité d'un stress, ont été proposées. Par exemple, dans le cadre des dommages

consécutifs à une période d'ischémie-reperfusion, il y a longtemps que le rôle déterminant du stress oxydant est connu et que les "éboueurs" (*scavengers*) de radicaux libres ont été identifiés comme inhibiteurs des lésions consécutives à ce stress au niveau d'organes vitaux comme le cerveau, le rein et le cœur (Hearse, 1977). Durant la protection apportée par la "réponse au choc thermique", la surexpression des Hsps est corrélée à une augmentation de l'activité enzymatique de la catalase ou de superoxyde dismutases, suggérant des interactions synergiques entre ces deux voies de protection endogène contre le stress oxydant (Loven *et al.*, 1985; Hass et Massaro, 1988; Karmazyn *et al.*, 1990; Currie et Tanguay, 1991). Ainsi, non seulement les Hsps protégeraient contre les effets des radicaux libres mais elles interagiraient également avec d'autres mécanismes impliqués dans leur élimination. A nouveau, il s'agit là d'arguments phénoménologiques ne prouvant pas le lien direct entre la catalase et les Hsps, celui-ci restant de plus controversé (Mocanu *et al.*, 1993; Steare et Yellon, 1994).

Récemment, une interaction entre les Hsps et l'activation de l'apoptose a été démontrée (pour revue, voir Gabai et Sherman, 2002). L'apoptose est un mécanisme d'adaptation, qui consiste en une mort cellulaire programmée, également activé par de nombreux stress. Les Hsp70 semblent capables d'inhiber ce phénomène en interférant avec certaines voies de signalisation responsables de l'activation des caspases, les principaux effecteurs de l'apoptose. Ces Hsps apparaissent ainsi intervenir de manière déterminante dans la régulation de la mort cellulaire, ce phénomène contribuant certainement aussi aux fonctions protectrices reconnues de ces protéines.

Une autre interaction pouvant être impliquée dans les mécanismes de protection liée aux Hsps a été envisagée dans le cadre de la réponse inflammatoire de l'organisme au choc septique, où la cytokine TNF α (*tumor necrosis factor- α*) et son principal facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) jouent un rôle

important (Murphy *et al.*, 1998). L'exposition à un choc thermique ainsi qu'à d'autres inducteurs de la synthèse de Hsp70, réduit une variété de réponses pro-inflammatoires, de même que le taux de mortalité des animaux exposés à des endotoxines. L'expression de plusieurs cytokines et molécules pro-inflammatoires, comme les interleukines IL-1, IL-6, la nitric oxyde synthétase, est inhibée chez ces animaux, en comparaison à ce qui est observé chez ceux qui n'ont pas subi d'hyperthermie préalable (Lappas *et al.*, 1994; Hauser *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1996; Klosterhalfen *et al.*, 1997; LoCicero *et al.*, 1999). Bien que non-élucidés totalement, les mécanismes d'interaction entre la "réponse au choc thermique" et la réponse inflammatoire commencent à être décryptés, donnant lieu à des schémas de travail tels que celui repris dans la figure 2. Par exemple, une liaison intracellulaire entre Hsp70 et TNF α a été observée dans des macrophages activés par une exposition aux endotoxines, prévenant ainsi la libération de cette cytokine (Ribeiro *et al.*, 1996). Etant donné le rôle majeur joué par NF- κ B dans le contrôle de cette réponse inflammatoire, il y a actuellement un intérêt grandissant pour l'effet de la "réponse au choc thermique" sur l'activation de ce facteur (pour revue, voir Malhotra et Wong, 2002). Plusieurs laboratoires indépendants ont ainsi démontré qu'une exposition au choc thermique inhibe l'activation de NF- κ B en réponse à une stimulation pro-inflammatoire (Wong *et al.*, 1997a; Heneka *et al.*, 2000; Pritts *et al.*, 2000). Le mécanisme proximal de cette interaction semble faire intervenir une stabilisation de la protéine inhibitrice de NF- κ B, I- κ B (Wong *et al.*, 1997b; Yoo *et al.*, 2000). Etant donné la fonction de chaperon moléculaire de Hsp70, il est concevable qu'une liaison de celle-ci à I- κ B empêche sa dégradation.

Le fait d'avoir focalisé cette synthèse sur Hsp70 ne doit pas faire oublier que beaucoup d'autres molécules, comme les Hsp25 et Hsp90, l'hème oxygénase, les récepteurs aux glucocorticoïdes, sont synthétisées ou modifiées au cours de la "réponse au

choc thermique" et sont susceptibles de jouer un rôle important dans la protection conférée par cette réponse (Ewing et Maines, 1991; Hu *et al.*, 1996; Wirth *et al.*, 2002b). En outre, HSF1 lui-même peut intervenir de manière directe dans les voies de protection de la "réponse au choc thermique". Par exemple, dans l'investigation de l'inhibition de la voie pro-inflammatoire (figure 2), une répression transcriptionnelle de l'expression des gènes du TNF α et de l'interleukine 1 β par liaison de HSF1 à leur promoteur a été suggérée (Cahill *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2002). Un lien direct entre l'activation de HSF1 et l'inhibition de NF- κ B est aussi suspecté mais reste à démontrer.

Manipulation de l'expression de Hsp70 à des fins thérapeutiques

Les preuves de l'effet protecteur de Hsp70 suggèrent de nouvelles stratégies thérapeutiques reposant sur l'activation de gènes cytoprotecteurs, tels les *hsps*, impliquant simultanément l'inhibition de gènes inflammatoires. Cependant, les pré-conditionnements initialement utilisés pour augmenter l'expression de Hsp70 et induire une tolérance vis-à-vis de stress ultérieurs, tels que le choc thermique ou l'ischémie, ont le désavantage d'être nocifs par eux-mêmes et sont difficilement praticables en clinique.

Dès lors, les recherches s'orientent vers l'utilisation de substances chimiques induisant la synthèse de Hsp70 de manière plus sélective en vue de développer cette nouvelle voie thérapeutique. Certaines molécules pharmacologiquement actives peuvent induire la synthèse de Hsp70 et atténuer les lésions causées par diverses agressions. C'est le cas notamment de l'amphétamine qui, administrée à une dose sub-toxique, protège le cœur de porcelets des lésions d'ischémie-reperfusion (Maulik *et al.*, 1995) ou le foie contre les effets de substances hépatotoxiques (Salminen *et al.*, 1997). De la même manière, l'arsénite améliore la survie de rats subissant un choc septique (Ribeiro *et al.*, 1994). Le bimoclozolol, un dérivé d'hydroxyla-

mine, exerce un effet cytoprotecteur observé sur un modèle d'ischémie chez la souris et de cicatrisation chez le rat diabétique (Vigh *et al.*, 1997). L'herbimycine, un inhibiteur de kinase, diminue chez le rat l'inflammation pulmonaire consécutive à une ischémie-reperfusion (Javadpour *et al.*, 1998). On peut également citer l'effet protecteur de certains AINS (anti-inflammatoires non-stéroïdiens), des inhibiteurs de la serine protéase et des prostaglandines cyclopentones (pour une revue, voir Morimoto et Santoro, 1998), dont l'administration peut être corrélée à une induction de la "réponse au choc thermique". L'exemple des AINS comme l'aspirine et l'indométacine est plus particulier puisqu'ils sont capables d'induire certaines étapes de l'activation de HSF1 (trimérisation, translocation nucléaire et liaison à l'ADN du promoteur *hsp*) mais pas de provoquer sa phosphorylation, étape indispensable à l'expression des gènes *hsps*. Par contre, les cellules traitées avec ces AINS sont mieux préparées à un choc thermique et la transcription des *hsps* est alors augmentée lors d'un stress ultérieur par rapport à des cellules non-traitées (Lee *et al.*, 1995; Cotto *et al.*, 1996).

Tous ces exemples montrent bien que ces recherches n'en sont qu'à leur début. De plus, la plupart des molécules citées possédant beaucoup d'autres propriétés pharmacologiques, l'évaluation du rôle joué par la "réponse au choc thermique" suite à l'administration de ces substances devient dès lors difficile. Dans ce domaine également, la biologie moléculaire ouvre des perspectives très intéressantes. Il a été montré que l'apport de Hsp70 par l'injection d'un vecteur viral contenant *hsp70*, protège le cœur ou le poumon de l'ischémie lorsque le gène est injecté aux animaux donneurs d'organes (Hiratsuka *et al.*, 1999; Jayakumar *et al.*, 2000). Cela représente un des aspects prometteurs de la thérapie génique.

La manipulation sélective de mécanisme de défense cellulaire endogène telle que l'expression de Hsp70 peut représenter une approche innovatrice pour le contrôle et la prévention de

maladies multifactorielles qui causent des lésions tissulaires. Le développement de molécules non-toxiques augmentant l'activité de HSF1 ou l'expression et/ou la fonction de Hsp70 offre de nombreux avantages pour le traitement au sens large puisque ces molécules pourraient être efficaces contre une grande variété de maladies. Elles pourraient être bénéfiques en condition clinique, lors de transplantations par exemple, ou pour le traitement aigu ou chronique de pathologies telles que le choc, les maladies neurodégénératives, l'insuffisance du myocarde et les lésions et traumatismes tissulaires (Morimoto et Santoro, 1998). Ainsi, de belles perspectives existent pour l'utilisation combinatoire de médicaments qui contrôlent la " réponse au choc thermique " et d'autres plus conventionnels.

HSP70 : CONCLUSIONS

Cette revue de la littérature permet de mieux cerner le rôle de biomarqueur et de bio-protecteur des Hsp70. Néanmoins, l'intégration de l'ensemble des résultats expérimentaux rassemblés dans ce domaine fait apparaître un paradoxe parfois difficilement interprétable. Partant du principe que Hsp70 joue un rôle protecteur contre de nombreuses agressions et est synthétisée dans des circonstances multiples, on pourrait supposer que les tissus les plus riches en Hsp70 sont aussi les plus résistants au stress. En effet, les travaux consacrés au rôle protecteur de Hsp70 montrent que son expression maximale mesurée dans certaines cellules cérébrales est corrélée avec leur capacité à survivre au stress de l'ischémie (Vass *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1993). Néanmoins, les recherches, se focalisant sur l'utilisation de Hsp70 comme biomarqueur, montrent que les cellules du cerveau les plus sensibles à l'ischémie sont celles qui produisent la plus grande quantité de ces protéines (Brown, 1990). Des questions fondamentales se dégagent de ces observations. L'expression de Hsp70 est-elle une adaptation ou simplement le reflet d'un état pathologique? Hsp70 est-

elle exprimée dans les cellules qui vont mourir ou survivre? Le moment et le niveau d'expression de Hsp70 ont-ils une influence sur l'effet bénéfique qu'elle peut prodiguer? Il est de plus en plus évident que si l'expression de Hsp70 est proportionnelle aux dommages protéiques, elle représente à son tour une stratégie permettant une récupération plus efficace de ces dommages.

Cette dualité d'interprétation de l'expression de Hsp70 révèle les limites de la compréhension actuelle des mécanismes de défenses cellulaires. Néanmoins les nombreuses études effectuées sur Hsp70 peuvent nous aider à émettre une hypothèse. Il est possible que le rapport observé entre l'expression de Hsp70 et le niveau de sensibilité cellulaire aboutisse à différents résultats pour la cellule, selon l'intensité du stress imposé. Pour reprendre l'exemple ci-dessus, après une brève période d'ischémie, les cellules cérébrales les plus vulnérables expriment Hsp70 en fonction de l'abondance des protéines altérées. Lorsque la période ou la sévérité d'ischémie est plus importante, alors que ces neurones ne montrent plus ou peu d'induction de Hsp70, celle-ci est davantage marquée dans les cellules moins sensibles (Gonzalez *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1992; Kinouchi *et al.*, 1993). Donc, en augmentant progressivement l'intensité d'un stress, l'expression de Hsp70 est induite sélectivement dans différentes populations cellulaires selon leur vulnérabilité à ce stress. Ces données suggèrent également qu'un stress trop intense mène à un blocage transcriptionnel et traductionnel dans les neurones n'exprimant alors plus d'Hsp70. Il est à noter que lorsque Hsp70 est exprimé dans ces différents types cellulaires, elle leur confère une protection vis-à-vis du stress subi puisque chez des animaux déficients en *hsp70.1*, ces cellules sont toutes plus sensibles encore à l'ischémie (Lee *et al.*, 2001b). Néanmoins, certains auteurs décrivent que selon le degré d'ischémie imposé, une même population cellulaire exprimant Hsp70, peut survivre ou mourir en fonction de l'intensité des lésions cellulaires (Planas *et al.*, 1997). On peut dès lors supposer que

lorsque le stress est sévère, les lésions qui en résultent sont trop intenses et/ou rapides pour que les Hsp70 synthétisées procurent une tolérance efficace. Il semblerait donc que la protection conférée par Hsp70, lorsqu'elle est induite, est, elle aussi, dépendante du degré de stress subi.

Quatre statuts pourraient ainsi être définis pour chaque cellule, en fonction du degré de stress subi et de sa sensibilité à ce stress. (1) Les cellules insensibles au stress imposé, n'expriment pas d'Hsp70 puisqu'elles ne présentent aucune lésion. Dans ces cellules, on peut supposer que d'autres mécanismes entrent en jeu pour préserver leurs structures des agressions. (2) Les cellules sensibles soumises à un stress modéré expriment Hsp70 qui les protège envers ce stress et un stress ultérieur. Dans celles-ci, Hsp70 représente un biomarqueur fiable ainsi qu'un mécanisme de protection. (3) Les cellules sensibles soumises à un stress sévère expriment Hsp70 mais insuffisamment pour les protéger envers ce stress. Hsp70 représente toujours un bon biomarqueur mais n'est plus un moyen de protection efficace. (4) Les cellules sensibles subissant rapidement un stress létal n'ont pas le temps de synthétiser Hsp70.

En conclusion, Hsp70 peut constituer un biomarqueur valable ainsi qu'un moyen de protection utile. Son efficacité dans le domaine de la toxicologie ou de la médecine dépendra probablement de la sensibilité de la population cellulaire visée et de l'intensité du stress en cause. Il est donc important de standardiser toute situation impliquant Hsp70 pour une exploitation optimale des données. Les recherches ultérieures viseront à mieux définir les critères de son induction sélective ou encore à développer des substances induisant son effet protecteur mais de nombreuses perspectives intéressantes se dégagent dès à présent des différents domaines de recherche la concernant.

SUMMARY

The heat shock proteins (Hsps). II. Hsp70 : biomarker and actor of cellular stress

The exposure of any organism to high temperature induces rapid and transient cellular overexpression of specific proteins, the heat shock proteins (Hsps). This response, called heat shock response, was initially discovered in *Drosophila*. The genes hsp were among the first euka-

ryotic genes to be cloned and whose regulation, which involves activation of heat shock factor (HSF), was elucidated. More recently, study of Hsp functions, particularly Hsp70, started. Their protective role, related to their molecular chaperon function, was inferred from experiments showing that Hsp70 expression, induced by a first stress, results in a cellular tolerance to second stress. Better understanding of the heat shock

response had led to the development of two search fields on Hsp70 expression : (1) its use as biomarker of cellular stress and (2) the exploitation of its cytoprotective functions against various insults. This review includes historic of the research on the heat shock response, description of regulation mechanism of Hsp70 expression, and the interesting perspectives allocated to Hsp70 as biomarker and therapeutic tool.

BIBLIOGRAPHIE

- AIT-AISSA S., PORCHER J., ARRIGO A., LAMBRE C. Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals : relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology*, 2000, **145**, 147-157.
- AKCETIN Z., PREGLA R., BUSCH A., KESSLER G., HEYNEMANN H., HOLTZ J., BROMME H. Lipid peroxidation and the expressional regulation of the heat-shock response during ischemia-reperfusion of rat kidney. *Urol. Int.*, 2000, **65**, 32-39.
- ANANTHAN J., GOLDBERG A.L., VOELLMY R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 1986, **232**, 522-524.
- ASHBURNER M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses to environmental treatments. *Chromosoma*, 1970, **31**, 356-376.
- BERENDES H.D. The induction of changes in chromosomal activity in different polytene types of cell in *Drosophila hydei*. *Dev. Biol.*, 1965, **11**, 371-384.
- BERENDES H.D. Factors involved in the expression of gene activity in polytene chromosomes. *Chromosoma*, 1968, **24**, 418-437.
- BLAKE M.J., GERSHON D., FARGNOLI J., HOLBROOK N.J. Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats. *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 15275-15279.
- BROUGHAN T.A., JIN G.F., PAPACONSTANTINOU J. Early gene response to hepatic ischemia reperfusion. *J. Surg. Res.*, 1996, **63**, 98-104.
- BROWN I.R. Induction of heat shock (stress) genes in the mammalian brain by hyperthermia and other traumatic events : a current perspective. *J. Neurosci. Res.*, 1990, **27**, 247-255.
- BUKAU B., HORWICH A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998, **92**, 351-366.
- BUREL C., MEZGER V., PINTO M., RALLU M., TRIGON S., MORANGE M. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*, 1992, **48**, 629-634.
- CAHILL C.M., WATERMAN W.R., XIE Y., AURON P.E., CALDERWOOD S.K. Transcriptional repression of the prointerleukin 1beta gene by heat shock factor 1. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 24874-24879.
- CHU E.K., RIBEIRO S.P., SLUTSKY A.S. Heat stress increases survival rates in lipopolysaccharide-stimulated rats. *Crit. Care Med.*, 1997, **25**, 1727-1732.
- CIOCCA D.R., CLARK G.M., TANDON A.K., FUQUA S.A., WELCH W.J., MCGUIRE W.L. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993a, **85**, 570-574.
- CLOUTIER J., PREVOST D., NADEAU P., ANTOUN H. Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**, 2846-2853.
- COHEN D.S., PALMER E., WELCH W.J., SHEPPARD D. The response of guinea pig airway epithelial cells and alveolar macrophages to environmental stress. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1991, **5**, 133-143.
- COTTO J.J., KLINE M., MORIMOTO R.I. Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 3355-3358.
- CRAIG E.A., GROSS C.A. Is hsp70 the cellular thermometer ? *Trends Biochem. Sci.*, 1991, **16**, 135-140.
- CURRIE R.W., KARMAZYN M., KLOC M., MAILER K. Heat-shock response is associated with enhanced post-ischemic ventricular recovery. *Circ. Res.*, 1988, **63**, 543-549.
- CURRIE R.W., TANGUAY R.M. Analysis of RNA for transcripts for catalase and SP71 in rat hearts after in vivo hyperthermia. *Biochem. Cell Biol.*, 1991, **69**, 375-382.

- DANIELS C.J., MCKEE A.H.Z., DOOLITTLE W.F. Archaeobacterial heat shock proteins. *EMBO J.*, 1984, **3**, 745-749.
- DELMAS F., TROCHERIS V., MURAT J.C. Expression of stress proteins in cultured HT29 human cell-line ; a model for studying environmental aggression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1995, **27**, 385-391.
- DEPLEDGE M.H. The rational basis for use of biomarkers as ecological tools. In : Fossi M.C., Leonzio C. (Eds), Non destructive biomarkers in vertebrates. Lewis Publishers : Boca Raton, 1994, 271-295.
- DIENEL G.A., KIESSLING M., JACEWICZ M., PULSINELLI W.A. Synthesis of heat shock proteins in rat brain cortex after transient ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1986, **6**, 505-510.
- EWING J.F., MAINES M.D. Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 5364-5368.
- FEIGE U., MORIMOTO R.I., YAHARA I., POLLA B.S. Stress-inducible cellular responses. Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B.S. (Eds) : Basel, 1996, 492p.
- FISCHBACH M., SABBIONI E., BROMLEY P. Induction of the human growth hormone gene placed under human hsp70 promoter control in mouse cells : a quantitative indicator of metal toxicity. *Cell Biol. Toxicol.*, 1993, **9**, 177-188.
- FLOHE S., DOMINGUEZ F.E., ACKERMANN M., HIRSCH T., BORGERMANN J., SCHADE F.U. Endotoxin tolerance in rats : expression of TNF-alpha, IL-6, IL-10, VCAM- 1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine*, 1999, **11**, 796-804.
- FREEMAN M.L., BORRELLI M.J., SYED K., SENISTERRA G., STAFFORD D.M., LEPOCK J.R. Characterization of a signal generated by oxidation of protein thiols that activates the heat shock transcription factor. *J. Cell Physiol.*, 1995, **164**, 356-366.
- GABAI V.L., SHERMAN M.Y. Invited review : Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J. Appl. Physiol.*, 2002, **92**, 1743-1748.
- GETHING M.J., SAMBROOK J. Protein folding in the cell. *Nature*, 1992, **355**, 33-45.
- GOERING P.L., FISHER B.R., CHAUDHARY P.P., DICK C.A. Relationship between stress protein induction in rat kidney by mercuric chloride and nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992, **113**, 184-191.
- GOERING P.L., FISHER B.R., KISH C.L. Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1993, **122**, 139-148.
- GONZALEZ M.F., LOWENSTEIN D., FERNYAK S., HISANAGA K., SIMON R., SHARP F.R. Induction of heat shock protein 72-like immunoreactivity in the hippocampal formation following transient global ischemia. *Brain Res. Bull.*, 1991, **26**, 241-250.
- GUNTHER E., WALTER L. Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia*, 1994, **50**, 987-1001.
- HASS M.A., MASSARO D. Regulation of the synthesis of superoxide dismutases in rat lungs during oxidant and hyperthermic stresses. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 776-781.
- HASSANEIN H.M., BANHAWY M.A., SOLIMAN F.M., ABDEL-REHIM S.A., MULLER W.E., SCHRODER H.C. Induction of hsp70 by the herbicide oxyfluorfen (Goal) in the Egyptian Nile fish, *Oreochromis niloticus*. *Arch. Environ. Contam Toxicol.*, 1999, **37**, 78-84.
- HAUSER G.J., DAYAO E.K., WASSERLOOS K., PITT B.R., WONG H.R. HSP induction inhibits iNOS mRNA expression and attenuates hypotension in endotoxin-challenged rats. *Am. J. Physiol.*, 1996, **271**, H2529-H2535.
- HEARSE D.J. Reperfusion of the ischemic myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1977, **9**, 605-616.
- HENEKA M.T., SHARP A., KLOCKGETHER T., GAVRILYUK V., FEINSTEIN D.L. The heat shock response inhibits NF-kappaB activation, nitric oxide synthase type 2 expression, and macrophage/ microglial activation in brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2000, **20**, 800-811.
- HIGHTOWER L.E. Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J. Cell Physiol.*, 1980, **102**, 407-427.
- HIRATSUKA M., YANO M., MORA B.N., NAGAHIRO I., COOPER J.D., PATTERSON G.A. Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury. *J. Heart Lung Transplant.*, 1998, **17**, 1238-1246.
- HIRATSUKA M., MORA B.N., YANO M., MOHANAKUMAR T., PATTERSON G.A. Gene transfer of heat shock protein 70 protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.*, 1999, **67**, 1421-1427.
- HOTCHKISS R., NUNNALLY I., LINDQUIST S., TAULIEN J., PERDRIZET G., KARL I. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin. *Am. J. Physiol.*, 1993, **265**, R1447-R1457.
- HU J.L., GUAN X.J., SANCHEZ E.R. Enhancement of glucocorticoid receptor-mediated gene expression by cellular stress : evidence for the involvement of a heat shock-initiated factor or process during recovery from stress. *Cell Stress Chaperones*, 1996, **1**, 197-205.
- HUANG L., MIVECHI N.F., MOSKOPHIDIS D. Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo : analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Mol. Cell Biol.*, 2001, **21**, 8575-8591.
- HUNT C., MORIMOTO R.I. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 6455-6459.
- HUTTER M.M., SIEVERS R.E., BARBOSA V., WOLFE C.L. Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection. *Circulation*, 1994, **89**, 355-360.
- JAVADPOUR M., KELLY C.J., CHEN G., BOUCHIER-HAYES D.J. Herbimycin-A attenuates ischaemia-reperfusion induced pulmonary neutrophil infiltration. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 1998, **16**, 377-382.

- JAYAKUMAR J., SUZUKI K., KHAN M., SMOLENSKI R.T., FARRELL A., LATIF N., RAISKY O., ABUNASRA H., SAMMUT I.A., MURTUZA B., AMRANI M., YACIOUB M.H. Gene therapy for myocardial protection : transfection of donor hearts with heat shock protein 70 gene protects cardiac function against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 2000, **102**, III302-III306.
- JOLLY C., MORIMOTO R.I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, **92**, 1564-1572
- KARMAZYN M., MAILER K., CURRIE R.W. Acquisition and decay of heat-shock-enhanced postischemic ventricular recovery. *Am. J. Physiol.*, 1990, **259**, H424-H431.
- KELLEY P.M., ALIPERTI G., SCHLESINGER M.J. In vitro synthesis of heat-shock proteins by mRNAs from chicken embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, 3230-3233.
- KIM K.K., JANG T.J., KIM J.R. HSP70 and ER expression in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J. Korean Med. Sci.*, 1998, **13**, 383-388.
- KING Y.T., LIN C.S., LIN J.H., LEE W.C. Whole-body hyperthermia-induced thermotolerance is associated with the induction of heat shock protein 70 in mice. *J. Exp. Biol.*, 2002, **205**, 273-278.
- KINOUCI H., SHARP F.R., HILL M.P., KOISTINAHO J., SAGAR S.M., CHAN P.H. Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1993, **13**, 105-115.
- KLOSTERHALFEN B., HAUPTMANN S., OFFNER F.A., AMO-TAKYI B., TONS C., WINKELTAU G., AFFIFY M., KUPPER W., KIRKPATRICK C.J., MITTERMAYER C. Induction of heat shock protein 70 by zinc-bis-(DL-hydrogenaspartate) reduces cytokine liberation, apoptosis, and mortality rate in a rat model of LD100 endotoxemia. *Shock*, 1997, **7**, 254-262.
- KOH Y., LIM C.M., KIM M.J., SHIM T.S., LEE S.D., KIM W.S., KIM D.S., KIM W.D. Heat shock response decreases endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Respirology*, 1999, **4**, 325-330.
- KWON S.B., YOUNG C., KIM D.S., CHOI H.O., KIM K.H., CHUNG J.H., EUN H.C., PARK K.C., OH C.K., SEO J.S. Impaired repair ability of hsp70.1 KO mouse after UVB irradiation. *J. Dermatol. Sci.*, 2002, **28**, 144-151.
- LAPPAS G.D., KARL I.E., HOTCHKISS R.S. Effect of ethanol and sodium arsenite on HSP-72 formation and on survival in a murine endotoxin model. *Shock*, 1994, **2**, 34-39.
- LEE B.S., CHEN J., ANGELIDIS C., JURIVICH D.A., MORIMOTO R.I. Pharmacological modulation of heat shock factor 1 by antiinflammatory drugs results in protection against stress-induced cellular damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 7207-7211.
- LEE J.E., YENARI M.A., SUN G.H., XU L., EMOND M.R., CHENG D., STEINBERG G.K., GIFFARD R.G. Differential neuroprotection from human heat shock protein 70 overexpression in in vitro and in vivo models of ischemia and ischemia-like conditions. *Exp. Neurol.*, 2001a, **170**, 129-139.
- LEE S.H., KIM M., YOON B.W., KIM Y.J., MA S.J., ROH J.K., LEE J.S., SEO J.S. Targeted hsp70.1 disruption increases infarction volume after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 2001b, **32**, 2905-2912.
- LEENDERS H.J., BERENDES H.D. The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in *Drosophila*. I. The induction of gene activity. *Chromosoma*, 1972, **37**, 433-444.
- LEONI S., BRAMBILLA D., RISULEO G., DE FEO G., SCARSELLA G. Effect of different whole body hyperthermic sessions on the heat shock response in mice liver and brain. *Mol. Cell Biochem.*, 2000, **204**, 41-47.
- LI G.C., WERB Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, **79**, 3218-3222.
- LI G.C., MEYER J.L., MAK J.Y., HAHN G.M. Heat-induced protection of mice against thermal death. *Cancer Res.*, 1983, **43**, 5758-5760.
- LI Y., CHOPP M., GARCIA J.H., YOSHIDA Y., ZHANG Z.G., LEVINE S.R. Distribution of the 72-kd heat-shock protein as a function of transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1992, **23**, 1292-1298.
- LI Y., CHOPP M., ZHANG Z.G., ZHANG R.L., GARCIA J.H. Neuronal survival is associated with 72-kDa heat shock protein expression after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Neurol. Sci.*, 1993, **120**, 187-194.
- LINDQUIST S. Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock : implications for regulation. *Dev. Biol.*, 1980, **77**, 463-479.
- LINK C.D., CYPSEYER J.R., JOHNSON C.J., JOHNSON T.E. Direct observation of stress response in *Caenorhabditis elegans* using a reporter transgene. *Cell Stress Chaperones.*, 1999, **4**, 235-242.
- LIVAK K.J., FREUND R., SCHWEBER M., WENSINK P.C., MESELSON M. Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 5613-5617.
- LOCICERO J., III, XU X., ZHANG L. Heat shock protein suppresses the senescent lung cytokine response to acute endotoxemia. *Ann. Thorac. Surg.*, 1999, **68**, 1150-1153.
- LOVEN D.P., LEEPER D.B., OBERLEY L.W. Superoxide dismutase levels in Chinese hamster ovary cells and ovarian carcinoma cells after hyperthermia or exposure to cycloheximide. *Cancer Res.*, 1985, **45**, 3029-3033.
- MALHOTRA V., WONG H.R. Interactions between the heat shock response and the nuclear factor- kappaB signaling pathway. *Crit Care Med.*, 2002, **30**, S89-S95.
- MARBER M.S., LATCHMAN D.S., WALKER J.M., YELLON D.M. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, 1993, **88**, 1264-1272.
- MARBER M.S., MESTRIL R., CHI S.H., SAYEN M.R., YELLON D.M., DILLMANN W.H. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest.*, 1995, **95**, 1446-1456.

- MATRANGA V., TOIA G., BONAVENTURA R., MULLER W.E. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress Chaperones*, 2000, **5**, 113-120.
- MAULIK N., ENGELMAN R.M., WEI Z., LIU X., ROUSOU J.A., FLACK J.E., DEATON D.W., DAS D.K. Drug-induced heat-shock preconditioning improves post-ischemic ventricular recovery after cardiopulmonary bypass. *Circulation*, 1995, **92**, II381-II388.
- MCCOMB M.A., SPURLOCK M.E. Expression of stress proteins in porcine tissues : developmental changes and effect of immunological challenge. *J. Anim Sci.*, 1997, **75**, 195-201.
- MCGARRY T.J., LINDQUIST S. The preferential translation of *Drosophila* hsp70 mRNA requires sequences in the untranslated leader. *Cell*, 1985, **42**, 903-911.
- MCMILLAN D.R., XIAO X., SHAO L., GRAVES K., BENJAMIN I.J. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 7523-7528.
- MIFFLIN L.C., COHEN R.E. Characterization of denatured protein inducers of the heat shock (stress) response in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 15710-15717.
- MILLER M.J., XUONG N.H., GEIDUSCHEK E.P. A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 5222-5225.
- MOCANU M.M., STEARE S.E., EVANS M.C., NUGENT J.H., YELLON D.M. Heat stress attenuates free radical release in the isolated perfused rat heart. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, **15**, 459-463.
- MORAN L., MIRAULT M.E., TISSIERES A., LIS J., SCHEDL P., ARTAVANIS-TSAKONAS S., GEHRING W.J. Physical map of two *D. melanogaster* DNA segments containing sequences coding for the 70,000 dalton heat shock protein. *Cell*, 1979, **17**, 1-8.
- MORIMOTO R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.*, 1998, **12**, 3788-3796.
- MORIMOTO R.I., SANTORO M.G. Stress-inducible responses and heat shock proteins : new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat. Biotechnol.*, 1998, **16**, 833-838.
- MURPHY K., HAUDEK S.B., THOMPSON M., GIROIR B.P. Molecular biology of septic shock. *New Horiz.*, 1998, **6**, 181-193.
- NADEAU D., CORNEAU S., PLANTE I., MORROW G., TANGUAY R.M. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress Chaperones*, 2001, **6**, 153-163.
- NAKAI A., TANABE M., KAWAZOE Y., INAZAWA J., MORIMOTO R.I., NAGATA K. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol. Cell Biol.*, 1997, **17**, 469-481.
- NAKATA N., KATO H., KOGURE K. Inhibition of ischemic tolerance in the gerbil hippocampus by quercetin and anti-heat shock protein-70 antibody. *Neuroreport*, 1993, **4**, 695-698.
- NGUYEN V.T., MORANGE M., BENSUADE O. Protein denaturation during heat shock and related stress. *Escherichia coli* beta-galactosidase and *Photinus pyralis* luciferase inactivation in mouse cells. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 10487-10492.
- NISHI S., TAKI W., UEMURA Y., HIGASHI T., KIKUCHI H., KUDOH H., SATOH M., NAGATA K. Ischemic tolerance due to the induction of HSP70 in a rat ischemic recirculation model. *Brain Res.*, 1993, **615**, 281-288.
- NISHIZAWA J., NAKAI A., HIGASHI T., TANABE M., NOMOTO S., MATSUDA K., BAN T., NAGATA K. Reperfusion causes significant activation of heat shock transcription factor 1 in ischemic rat heart. *Circulation*, 1996, **94**, 2185-2192.
- PELHAM H.R. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell*, 1982, **30**, 517-528.
- PERDRIZET G.A., KANEKO H., BUCKLEY T.M., FISHMAN M.A., SCHWEIZER R.T. Heat shock protects pig kidneys against warm ischemic injury. *Transplant. Proc.*, 1990, **22**, 460-461.
- PLANAS A.M., SORIANO M.A., ESTRADA A., SANZ O., MARTIN F., FERRER I. The heat shock stress response after brain lesions : induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. *Prog. Neurobiol.*, 1997, **51**, 607-636.
- PLUMIER J.C., ROSS B.M., CURRIE R.W., ANGELIDIS C.E., KAZLARIS H., KOLLIAS G., PAGOULATOS G.N. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J. Clin. Invest*, 1995, **95**, 1854-1860.
- PRITTS T.A., WANG Q., SUN X., MOON M.R., FISCHER D.R., FISCHER J.E., WONG H.R., HASSELGREN P.O. Induction of the stress response in vivo decreases nuclear factor-kappa B activity in jejunal mucosa of endotoxemic mice. *Arch. Surg.*, 2000, **135**, 860-866.
- RAJDEV S., HARA K., KOKUBO Y., MESTRIL R., DILLMANN W., WEINSTEIN P.R., SHARP F.R. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann. Neurol.*, 2000, **47**, 782-791.
- RAJDEV S., SHARP F.R. Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol. Pathol.*, 2000, **28**, 105-112.
- RIABOWOL K.T., MIZZEN L.A., WELCH W.J. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science*, 1988, **242**, 433-436.
- RIBEIRO S.P., VILLAR J., DOWNEY G.P., EDELSON J.D., SLUTSKY A.S. Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. *Crit Care Med.*, 1994, **22**, 922-929.

- RIBEIRO S.P., VILLAR J., DOWNEY G.P., EDELSON J.D., SLUTSKY A.S. Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages : evidence for TNF-alpha posttranslational regulation. *Am. J. Respir. Crit Care Med.*, 1996, **154**, 1843-1850.
- RITOSSA F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP and in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, **18**, 571-573.
- RYAN J.A., HIGHTOWER L.E. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. *E.X.S.*, 1996, **77**, 411-424.
- SAAD S., KANAI M., AWANE M., YAMAMOTO Y., MORIMOTO T., ISSELHARD W., MINOR T., TROIDL H., OZAWA K., YAMAOKA Y. Protective effect of heat shock pretreatment with heat shock protein induction before hepatic warm ischemic injury caused by Pringle's maneuver. *Surgery*, 1995, **118**, 510-516.
- SACCO M.G., ZECCA L., BAGNASCO L., CHIESA G., PAROLINI C., BROMLEY P., CATO E.M., RONCUCCI R., CLERICI L.A., VEZZONI P. A transgenic mouse model for the detection of cellular stress induced by toxic inorganic compounds. *Nat. Biotechnol.*, 1997, **15**, 1392-1397.
- SALMINEN W.F., JR., VOELLMY R., ROBERTS S.M. Protection against hepatotoxicity by a single dose of amphetamine : the potential role of heat shock protein induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, **147**, 247-258.
- SANDERS B.M. Stress proteins in aquatic organisms : an environmental perspective. *Crit Rev. Toxicol.*, 1993, **23**, 49-75.
- SATYAL S.H., CHEN D., FOX S.G., KRAMER J.M., MORIMOTO R.I. Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev.*, 1998, **12**, 1962-1974.
- SCHEDL T.B., DONELSON J.E. A cloned *Drosophila* DNA fragment which codes for a 4 S RNA species. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **520**, 539-554.
- SCHLESINGER M.J., ASHBURNER M., TISSIERES A. Heat-Shock from bacteria to Men. Cold Spring Harbor Laboratory : New York, 1982, 286p.
- SHARP F.R., KINOUCI H., KOISTINAHO J., CHAN P.H., SAGAR S.M. HSP70 heat shock gene regulation during ischemia. *Stroke*, 1993, **24**, I72-I75.
- SINGH I.S., HE J.R., CALDERWOOD S., HASDAY J.D. A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor-alpha gene is a transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 4981-4988.
- SNYDER M.J., GIRVETZ E., MULDER E.P. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2001, **41**, 22-29.
- SORIANO M.A., TORTOSA A., PLANAS A.M., RODRIGUEZ-FARRE E., FERRER I. Induction of HSP70 mRNA and HSP70 protein in the hippocampus of the developing gerbil following transient forebrain ischemia. *Brain Res.*, 1994, **653**, 191-198.
- SOUREN J.E., WIEGANT F.A., VAN WIJK R. The role of hsp70 in protection and repair of luciferase activity in vivo ; experimental data and mathematical modelling. *Cell Mol. Life Sci.*, 1999, **55**, 799-811.
- STEARE S.E., YELLON D.M. Increased endogenous catalase activity caused by heat stress does not protect the isolated rat heart against exogenous hydrogen peroxide. *Cardiovasc. Res.*, 1994, **28**, 1096-1101.
- STEINER E., KLEINHAPPL B., GUTSCHI A., MARTH E. Analysis of hsp70 mRNA levels in HepG2 cells exposed to various metals differing in toxicity. *Toxicol. Lett.*, 1998, **96-97**, 169-176.
- STEVENS J.L., LIU H., HALLECK M., BOWES R.C., CHEN Q.M., VAN DE W.B. Linking gene expression to mechanisms of toxicity. *Toxicol. Lett.*, 2000, **112-113**, 479-486.
- SU W.Y., GORDON T. In vivo exposure to ozone produces an increase in a 72-kDa heat shock protein in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.*, 1997, **83**, 707-711.
- TANGUAY R.M., WU Y., KHANDJIAN E.W. Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev. Genet.*, 1993, **14**, 112-118.
- TISSIERES A., MITCHELL H.K., TRACY U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* : Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 1974, **85**, 389-398.
- TODD M.D., LIN X., STANKOWSKI L.F., JR., DESAI M., WOLFGANG G.H. Toxicity Screening of a Combinatorial Library: Correlation of Cytotoxicity and Gene Induction to Compound Structure. *J. Biomol. Screen.*, 1999, **4**, 259-268.
- VARGAS-ROIG L.M., GAGO F.E., TELLO O., AZNAR J.C., CIOCCA D.R. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 1998, **79**, 468-475.
- VASS K., WELCH W.J., NOWAK T.S., JR. Localization of 70-kDa stress protein induction in gerbil brain after ischemia. *Acta Neuropathol.*, 1988, **77**, 128-135.
- VIGH L., LITERATI P.N., HORVATH I., TOROK Z., BALOGH G., GLATZ A., KOVACS E., BOROS I., FERDINANDY P., FARKAS B., JASZLITS L., JEDNAKOVITS A., KORANYI L., MARESCA B. Bimoclolmol: a nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. *Nat. Med.*, 1997, **3**, 1150-1154.
- VILLAR J., EDELSON J.D., POST M., MULLEN J.B., SLUTSKY A.S. Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993, **147**, 177-181.
- WAGNER A.C., WEBER H., JONAS L., NIZZE H., STROWSKI M., FIEDLER F., PRINTZ H., STEFFEN H., GOKE B. Hyperthermia induces heat shock protein expression and protection against cerulein-induced pancreatitis in rats. *Gastroenterology*, 1996, **111**, 1333-1342.
- WEBER L.A. Relationship of heat shock proteins and induced thermal resistance. *Cell Prolif.*, 1992, **25**, 101-113.

- WICKNER S., MAURIZI M.R., GOTTESMAN S. Posttranslational quality control : folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 1999, **286**, 1888-1893.
- WIRTH D., CHRISTIANS E., MUNAUT C., DESSY C., FOIDART J.M., GUSTIN P. Differential heat shock gene hsp70-1 response to toxicants revealed by in vivo study of lungs in transgenic mice. *Cell Stress Chaperones*, 2002a, **7**, 387-395.
- WIRTH D., GUSTIN P., DRION P.V., DESSY-DOIZE C., CHRISTIANS E. Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*). I: Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Ann. Med. Vet.*, 2002b, **146**, 201-216.
- WIRTH D., CHRISTIANS E., LI X., BENJAMIN I.J., GUSTIN P. Use of *Hsf1*^{-/-} mice reveals an essential role for HSF1 to protect lung against Cadmium-induced injury. Accepted pour publication dans *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003.
- WONG H.R., RYAN M., WISPE J.R. Stress response decreases NF-kappaB nuclear translocation and increases I-kappaBalpha expression in A549 cells. *J. Clin. Invest.*, 1997a, **99**, 2423-2428.
- WONG H.R., RYAN M., WISPE J.R. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I kappa-B degradation and NF-kappa B nuclear translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997b, **231**, 257-263.
- WU C. Heat shock transcription factors : structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1995, **11**, 441-469.
- WU R., ZHAO Y.H., PLOPPER C.G., CHANG M.M., CHMIEL K., CROSS J.J., WEIR A., LAST J.A., TARKINGTON B. Differential expression of stress proteins in nonhuman primate lung and conducting airway after ozone exposure. *Am. J. Physiol*, 1999, **277**, L511-L522.
- XIA W., VILABOAN., MARTIN J.L., MESTRIL R., GUO Y., VOELLMY R. Modulation of tolerance by mutant heat shock transcription factors. *Cell Stress Chaperones*, 1999, **4**, 8-18.
- XIAO X., ZUO X., DAVIS A.A., MCMILLAN D.R., CURRY B.B., RICHARDSON J.A., BENJAMIN I.J. HSF1 is required for extra-embryonic development, post-natal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J.*, 1999, **18**, 5943-5952.
- YOO C.G., LEE S., LEE C.T., KIM Y.W., HAN S.K., SHIM Y.S. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I kappa B alpha through preventing I kappa B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J. Immunol.*, 2000, **164**, 5416-5423.
- ZOU J., SALMINEN W.F., ROBERTS S.M., VOELLMY R. Correlation between glutathione oxidation and trimerization of heat shock factor 1, an early step in stress induction of the Hsp response. *Cell Stress Chaperones*, 1998, **3**, 130-141.