

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine vétérinaire

Titre de la thèse en Français : La « réponse au choc thermique » : contribution à sa caractérisation en tant que biomarqueur de stress et à l'étude de son rôle protecteur vis-à-vis d'une agression pulmonaire par le cadmium.

Titre de la thèse en Anglais : Characterization of Heat shock response as a biomarker of stress and study of its protective role against insult by cadmium.

Candidat : Delphine Wirth

Promoteur : Prof. Pascal Gustin

Co-promoteur : Dr. Elisabeth Christians

Département et Service : Département des Sciences fonctionnelles, Secteur Pharmacologie-Pharmacothérapie-Toxicologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique: 2 octobre 2003

Composition du Jury :

Membres internes à la Faculté de Médecine vétérinaire: P. Gustin, P. Lekeux, F. Bureau, D. Desmecht, L. Grobet, A. Vanderplasschen, N. Antoine.

Membres externes à la Faculté de Médecine vétérinaire: E. Christians (UTSouthwestern Medical Center, USA), A. Delaunois (Lilly Development Center, Louvain-la Neuve), B. Nemery (Laboratorium voor Pneumologie, KULeuven), C. Munaut (CHU, Université de Liège)

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

La « réponse au choc thermique » est caractérisée par l'activation de l'expression de protéines de choc thermique (Hsps), sous le contrôle de facteurs de transcription appelés les « *heat shock factor* » (HSFs) (Feige et al., 1996). Son induction a été observée dans une multitude de cellules et d'organismes exposés à des températures élevées mais aussi à une grande variété d'autres stress. Le lien direct observé entre les dommages cellulaires et l'expression de Hsp70, la plus inductible des Hsps, a suscité un grand intérêt pour celle-ci en tant que biomarqueur de stress en

toxicologie ainsi qu'en médecine (Ryan et Hightower, 1996). Par ailleurs, un rôle protecteur de la « réponse au choc thermique » a été déduit d'études montrant qu'une courte exposition, appelée pré-conditionnement, à un agent inducteur atténue les lésions provoquées par de nombreuses agressions ultérieures de cellules ou d'organismes (Wirth et al., 2003). Ces traitements activent différentes voies potentiellement protectrices rendant difficile l'identification des mécanismes responsables de la protection. Bien que HSF1 et Hsp70 soient reconnus comme des éléments essentiels de la « réponse au choc thermique », leur rôle dans le phénomène de protection *in vivo* reste notamment à définir. Le poumon représentant un organe cible lors d'agressions environnementales, il nous est apparu particulièrement

intéressant d'étudier la « réponse au choc thermique » vis-à-vis de stress pulmonaires induits.

Etant donné la diversité des inducteurs de l'expression de Hsp70, cette réponse est généralement considérée comme non-spécifique vis-à-vis des stress rencontrés. Cependant, la comparaison de plusieurs études effectuées *in vitro* laissait suspecter qu'elle pourrait dépendre du type de stress subi, au moins au niveau des cellules pulmonaires (Wong et Wispe, 1997b). Dans la première partie de ce travail, nous avons testé cette hypothèse *in vivo*, en utilisant des souris transgéniques, dans lesquelles le gène rapporteur de la luciférase est sous le contrôle du promoteur *hsp70.1*.

Etant donné que la « réponse au choc thermique » représente également un système de défense vis-à-vis de divers stress, pour la deuxième partie de ce travail, nous avons examiné son efficacité vis-à-vis d'une agression pulmonaire par le cadmium, lui-même un inducteur de cette réponse. Le rôle de HSF1 dans cet effet potentiel a été déterminé grâce à l'utilisation de souris *knock-out* Hsf1^{-/-}.

Enfin, pour la troisième partie du travail, nous avons voulu mieux comprendre les mécanismes responsables de l'effet protecteur de la « réponse au choc thermique ». Plusieurs études antérieures avaient montré une corrélation entre l'induction de la « réponse au choc thermique » et une inhibition de l'expression de cytokines ainsi que de l'activation de leur principal facteur régulateur, NF- κ B (Lappas *et al.*, 1994 ; Klosterhalfen *et al.*, 1997 ; Wong *et al.*, 1997a). Récemment, une expérience sur fibroblastes embryonnaires Hsf1^{-/-} a remis en doute l'implication de HSF1 dans cette inhibition (Malhotra *et al.*, 2002). Dès lors, nous avons voulu vérifier si les mécanismes protecteurs dépendant de HSF1 impliquent l'inhibition des voies pro-inflammatoires dans le modèle de l'intoxication respiratoire au cadmium.

RÉSULTATS

Les souris transgéniques HSP70.1Luc ont été exposées à un choc thermique, de l'ozone, du paraquat, du parathion ou du cadmium dans le but de vérifier l'hypothèse de la non-spécificité de la « réponse au choc thermique ». L'expression du transgène, facilement évaluée par la mesure de l'activité luciférase dans les poumons, a été significativement stimulée par l'exposition à la chaleur (48 °C, 15 minutes) et par l'administration de cadmium (5 mg/kg, ip). Par contre, ni l'ozone (1 ou 2 ppm pendant 5 heures), ni le paraquat (20 ou 70 mg/kg, ip), ni le parathion (1 ou 5 mg/kg, ip) n'ont pu activer cette réponse, mesurée entre 1 et 24 heures après l'exposition. Des résultats identiques ont été enregistrés pour l'expression du gène endogène *hsp70.1*. Ces résultats indiquent premièrement que la mesure de l'expression du

transgène HSP70.1Luc constitue un outil fiable pour l'étude de l'induction de l'expression de Hsp70 par des stimuli extérieurs au niveau pulmonaire *in vivo*. Deuxièmement, ils remettent en doute le caractère non-spécifique de la « réponse au choc thermique » vis-à-vis des agents responsables de stress cellulaire puisque l'induction de *hsp70.1* apparaît dépendante du type de stress subi. Etant donné que la réponse de Hsp70 est généralement proportionnelle à l'intensité du stress subi, nous avons voulu examiner la relation entre l'induction différentielle de l'expression de Hsp70 et la toxicité pulmonaire de chaque agent testé. Il est apparu que les deux agents inducteurs de l'expression de Hsp70, à savoir le choc thermique et le cadmium administré par voie intrapéritonéale, ont provoqué des manifestations cliniques générales plutôt que des altérations pulmonaires. Par contre, l'ozone, le paraquat et le parathion ont été à l'origine de dysfonctionnements respiratoires et/ou d'une infiltration de cellules inflammatoires au niveau des voies respiratoires. Ces résultats suggèrent que le critère déterminant la spécificité de l'induction de *hsp70.1* ne semble pas lié à l'intensité des lésions provoquées.

Si le cadmium, administré par voie systémique, provoque peu d'effets sur le système respiratoire, son inhalation est connue pour être à l'origine de graves lésions pulmonaires (Lauwerys, 1999). Alors que ce métal est un inducteur puissant de l'expression de Hsp70 dans les poumons, aucune information n'était disponible sur l'efficacité de ce système de défense cellulaire vis-à-vis de la toxicité du cadmium. Nous avons donc examiné, dans un premier temps, si un pré-conditionnement par le choc thermique atténue les altérations pulmonaires provoquées par une instillation intranasale de cadmium. Les résultats démontrent qu'en effet, les modifications de la fonction respiratoire, la cytolysse ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires dans les voies respiratoires, dus à des fortes doses de cadmium (50 et 100 μ g), étaient diminués chez les souris pré-traitées à la chaleur. Ensuite, l'utilisation des souris Hsf1^{-/-} nous a permis de démontrer le rôle essentiel joué par HSF1 dans cette protection puisque, chez ces animaux, le choc thermique n'a eu aucun effet. Etant donné que l'exposition au cadmium induit elle-même une « réponse au choc thermique », nous pouvions suspecter que cette induction peut également offrir une protection vis-à-vis des altérations, au cours de l'agression pulmonaire. La comparaison des courbes dose-effets chez les souris de génotype sauvage et les souris Hsf1^{-/-} exposées au cadmium, offrait l'opportunité de vérifier cette hypothèse. En l'absence de pré-conditionnement, les souris Hsf1^{-/-} ont présenté des altérations pulmonaires plus sévères que les souris de génotype sauvage, après l'instillation de cadmium (voir figure). La protection a été associée d'un point de vue cinétique à une induction de l'expression de Hsp70 dans les poumons des souris de souche sauvage, laquelle était absente chez les souris Hsf1^{-/-}, suggérant un rôle pour ces protéines. Ainsi, cette deuxième étude démontre que « la

réponse au choc thermique », activée préalablement ou au cours de l'agression pulmonaire par le cadmium lui-même, est un système de protection efficace vis-à-vis de la toxicité de ce métal, et que HSF1 est un médiateur majeur de cette protection.

Finalement, le lien entre la réduction du recrutement pulmonaire des cellules inflammatoires dû au cadmium, par la « réponse au choc thermique » sous le contrôle de HSF1, et une inhibition de la cascade pro-inflammatoire a été examiné. La plus grande sensibilité au cadmium des souris *Hsf1*^{-/-} a été associée à une expression plus élevée chez celles-ci de GM-CSF, mais pas de TNF- κ , indiquant un effet répressif spécifique de HSF1. L'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B, particulièrement celle de l'homodimer p50, a également été supérieure dans les poumons des animaux *Hsf1*^{-/-} exposés au cadmium, démontrant pour la première fois que l'inhibition de NF- κ B lors de l'induction de la « réponse au choc thermique » *in vivo* est dirigée, au moins en partie, par HSF1. Nos résultats indiquent que plusieurs mécanismes semblent contribuer au rôle protecteur de la « réponse au choc thermique » vis-à-vis des lésions pulmonaires induites par des toxiques, incluant les fonctions des Hsps, dont l'expression est régulée par HSF1, et une interaction entre ce facteur et la cascade pro-inflammatoire.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La revue de la littérature et les études présentées dans ce travail permettent de mieux cerner l'utilisation potentielle de biomarqueur de stress et le rôle de bio-protecteur de la « réponse au choc thermique » au niveau pulmonaire. Néanmoins, l'intégration de l'ensemble des résultats expérimentaux rassemblés dans ce domaine fait apparaître un paradoxe parfois difficilement interprétable. Du principe que cette réponse, activée dans des circonstances multiples, joue un rôle protecteur contre de nombreuses agressions, naît l'hypothèse que les tissus les plus riches en Hsps après une induction sont aussi les plus résistants au stress. En effet, les travaux consacrés au rôle protecteur de la « réponse au choc thermique » dans le poumon montrent que l'expression de Hsp70 est corrélée avec la résistance de l'organisme au stress imposé (Wong et Wispé, 1997b). Néanmoins, les recherches, se focalisant sur l'utilisation de Hsp70 comme marqueur de stress, montrent que l'expression de cette protéine est proportionnelle aux lésions observées. Ainsi, dans l'étude de certaines pathologies respiratoires, on remarque que les individus les plus gravement atteints sont ceux dont les cellules produisent la plus grande quantité de Hsp70 (Vignola *et al.*, 1995 ; Kindas-Mugge *et al.*, 1996). Des questions fondamentales se dégagent de ces observations. L'expression de Hsp70 est-elle une adaptation ou 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 ?

Ces questions sur la « réponse au choc thermique » révèlent les limites de la compréhension actuelle des mécanismes d'adaptation et du maintien de l'homéostasie cellulaire. Les expériences effectuées dans ce travail peuvent nous aider à émettre une hypothèse. Il est possible que le rapport observé entre l'intensité de la « réponse au choc thermique » et le niveau de sensibilité tissulaire aboutisse à différents résultats, selon l'intensité et la nature du stress imposé. Pour reprendre l'exemple des cinq types de stress que nous avons utilisés, l'exposition de souris à l'ozone, au paraquat ou au parathion, n'a pas induit une surexpression de Hsp70 dans les cellules pulmonaires de ces animaux. Nous avons suggéré que cette absence d'activation était liée au mécanisme de toxicité de ces polluants. En effet, ceux-ci sont connus pour endommager principalement les lipides membranaires, alors que le signal activateur de la « réponse au choc thermique » est une accumulation de protéines dénaturées (Ananthan *et al.*, 1986). Lorsque les souris ont été exposées au choc thermique et/ou au cadmium, dont les premières molécules cibles sont les protéines (Ritchie *et al.*, 1994 ; Quig, 1998), leurs cellules pulmonaires ont surexprimé Hsp70. Cette induction était alors proportionnelle à l'intensité des dommages causés, comme cela a été démontré par les courbes dose-réponses au cadmium. Cependant, certaines souris instillées avec des concentrations de cadmium proches des doses létales (200 μ g/souris) ont présenté des lésions pulmonaires extrêmement sévères et l'expression de Hsp70 dans ces poumons était très faible voire nulle (ces données ne sont pas présentées dans les articles), suggérant qu'un stress trop intense mène à un blocage transcriptionnel dans les cellules qui n'expriment alors plus Hsp70. Par ailleurs, lorsque la « réponse au choc thermique » a été activée, elle a conféré une protection vis-à-vis du stress subi puisque les altérations pulmonaires dues au cadmium étaient plus sévères chez les animaux incapables de synthétiser HSF1, et donc de surexprimer Hsp70. Plusieurs mécanismes paraissent contribuer à cet effet protecteur, incluant la fonction de chaperon moléculaire des Hsps et une inhibition de la cascade pro-inflammatoire, toutes deux contrôlés au moins en partie par HSF1. Néanmoins, selon l'intensité du stress, une même population cellulaire exprimant Hsp70, a pu survivre ou mourir puisque la protection mesurée à faibles doses de cadmium n'a plus été observée à fortes doses. Nous avons montré que lorsque le stress est sévère, les lésions qui en résultent sont trop intenses et rapides pour que la « réponse au choc thermique » procure une protection efficace. Une induction préalable est alors nécessaire pour prévenir ce stress. Il semblerait donc que la protection conférée par Hsp70, lorsqu'elle est induite, soit elle aussi dépendante du degré de stress subi.

Quatre statuts cellulaires pourraient ainsi être définis, en fonction de la nature et du degré de stress subi : (1) dans

les cellules exposées à un stress dont les cibles moléculaires primaires ne sont pas les protéines, la « réponse au choc thermique » n'est pas activée malgré les dommages significatifs observés. Pour ces cellules, Hsp70 ne peut être utilisée en tant que biomarqueur ; (2) dans les cellules exposées à un stress modéré mais ayant pour cible les protéines, la « réponse au choc thermique » est activée et les protège envers ce stress et un stress ultérieur. Pour celles-ci, Hsp70 représente un biomarqueur fiable et les composants de cette réponse sont impliqués dans plusieurs mécanismes efficaces de protection ; (3) dans les cellules exposées à un stress sévère et protéotoxique, la « réponse au choc thermique » est activée mais insuffisamment ou trop tardivement pour les protéger envers ce stress. Hsp70 représente toujours un bon biomarqueur mais cette réponse n'est plus un mécanisme de défense efficace ; (4) dans les cellules exposées à un stress rapidement létal, la « réponse au choc thermique » n'est forcément pas activée.

La « réponse au choc thermique » peut donc être utilisée comme un biomarqueur valable mais « stimulus-dépendent » et représenter 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, ainsi que de la nature et de l'intensité du stress en cause. Il est donc important de standardiser toute situation impliquant cette réponse pour une exploitation optimale des données. Les recherches ultérieures viseront, entre autre, à mieux définir les signaux régissant son induction. L'évaluation cinétique de l'altération des différentes molécules touchées par un grand nombre de composés chimiques capables d'induire l'expression de Hsps permettrait de confirmer notre hypothèse selon laquelle le pouvoir inducteur d'un toxique est lié à son effet direct sur les protéines cellulaires, alors que si cet effet est secondaire à l'altération d'autres molécules, il n'y a pas d'induction. Le modèle transgénique HSP70.1Luc utilisé dans ce travail, pourrait être particulièrement intéressant dans cette optique. La meilleure compréhension de la sélectivité de la « réponse au choc thermique », non seulement préciserait les conditions de son utilisation adéquate en tant que biomarqueur, mais permettrait également le développement de molécules inductrices à finalité thérapeutique. La manipulation sélective

de ce mécanisme de défense cellulaire endogène représente une approche innovatrice pour le contrôle et la prévention de maladies multifactorielles qui causent des lésions tissulaires. Au vu de nos résultats, HSF1 représente une cible idéale pour le traitement au sens large d'une grande variété de pathologies. Des médicaments capables d'activer ce facteur sans être toxiques, pourraient être bénéfiques en condition clinique puisque son activation entraîne une réduction des dommages, liée non seulement à l'expression des Hsps qu'il contrôle mais aussi à son effet anti-inflammatoire. La contribution de ce dernier effet dans le phénomène de protection mériterait néanmoins d'être confirmée. Bien que nous ayons démontré que l'inhibition de la cascade pro-inflammatoire est associée à une diminution des altérations pulmonaires dues au cadmium, le lien causal entre ces deux observations reste à identifier dans ce modèle, mais aussi dans d'autres modèles pathologiques. Une expérience intéressante serait d'injecter HSF1, ou d'utiliser des animaux transgéniques le surexprimant de manière constitutive, pour examiner toutes les conséquences d'une telle situation sur la réponse inflammatoire. L'administration d'anticorps contre les cytokines ou d'inhibiteurs de NF- κ B à des souris *knock-out* pour *Hsf1*, qui lorsqu'elles sont soumises à une stimulation inflammatoire expriment plus de cytokines que les souris de génotype sauvage, permettrait de vérifier l'effet réel de leur inhibition. De plus, les mécanismes moléculaires responsables de l'inhibition de la cascade pro-inflammatoire par HSF1 restent à définir. Par exemple, l'effet de HSF1 sur la dégradation de I- κ B ainsi que sur ses kinases et phosphatases n'est pas connu. Néanmoins, de belles perspectives thérapeutiques se dégagent dès à présent des études sur la « réponse au choc thermique », laissant entrevoir l'utilisation combinatoire de traitements qui la stimulent et d'autres plus conventionnels.

REMERCIEMENTS

Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industriel et dans l'Agriculture (FRIA).

Fonds pour la Recherche scientifique et médicale (FRSM).

Fonds spéciaux pour la Recherche de l'Université de Liège.

RÉFÉRENCES

- 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.
- FEIGE U., MORIMOTO R.I., YAHARA I., POLLA B.S. Stress-inducible cellular responses. Birkhauser : Basel, 1996, 492 p.
- KINDAS-MUGGE I., POHL W.R., ZAVADOVA E., KOHN H.D., FITZAL S., KUMMER F., MICKSCHE M. Alveolar macrophages of patients with adult respiratory distress syndrome express high levels of heat shock protein 72 mRNA. *Shock*, 1996, **5**, 184-189.

- 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.
- 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.
- LAUWERYS R.R. Cadmium. In : Lauwerys R.R., Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. 4^e édition. Masson : Paris, 1999, 171-188.
- MALHOTRA V., EAVES-PYLES T., ODOMS K., QUAID G., SHANLEY T.P., WONG H.R. Heat shock inhibits activation of NF-kappaB in the absence of heat shock factor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, **291**, 453-457.
- QUIG D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern. Med. Rev.*, 1998, **3**, 262-270.
- RYAN J.A., HIGHTOWER L.E. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. *EXS*, 1996, **77**, 411-424.
- RITCHIE K.P., KELLER B.M., SYED K.M., LEPOCK J.R. Hyperthermia (heat shock)-induced protein denaturation in liver, muscle and lens tissue as determined by differential scanning calorimetry. *Int. J. Hyperthermia*, 1994, **10**, 605-618.
- VIGNOLA A.M., CHANEZ P., POLLA B.S., VIC P., GODARD P., BOUSQUET J. Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1995, **13**, 683-691.
- WIRTH D., CHRISTIANS E., DRION P.V., DESSY-DOIZE C., GUSTIN P. Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Ann. Med. Vet.*, 2003, **147**, 127-144.
- 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.*, 1997a, **231**, 257-263.
- WONG H.R., WISPE J.R. The stress response and the lung. *Am. J. Physiol.*, 1997b, **273**, L1-L9.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- WIRTH D., CHRISTIANS E., DESSY C., DELAUNOIS A., GUSTIN P. Use of the HSP70.1Luc for detection of HSP70 gene expression in mouse. Abstract in proceedings of the American Thoracic Society symposium, Toronto, 2000. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **161**, A173.
- WIRTH D., CHRISTIANS E., KIRSCHVINK N., GUSTIN P. Dose-dependent protective role of the Heat shock proteins against cadmium-induced lung injuries. [Abstract] In : Proceedings of the 20th symposium of the veterinary comparative respiratory society, Boston, 2002, 82.
- WIRTH D., CHRISTIANS E., MUNAUT C., DESSY D., 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*, 2002, **7**, 387-395.
- WIRTH D., GUSTIN P., DRION P.V., DESSY-DOIZE C., CHRISTIANS E.S. Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*). I: Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Ann. Med. Vet.*, 2002, **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. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003, **192**, 12-20.
- WIRTH D., CHRISTIANS E.S., DRION P.V., DESSY-DOIZE C., GUSTIN P. Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*). II: Hsp70: biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Ann. Med. Vet.*, 2003, **147**, 127-144.
- WIRTH D., BUREAU F., MELOTTE D., CHRISTIANS E., GUSTIN P. Evidence for a role of Heat shock factor 1 in the inhibition of NF-kappaB pathway during the heat shock response-mediated lung protection. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2004, **287**, L953-61.