

## Les petites protéines de stress : des nouveaux modulateurs de la mort cellulaire

La mort cellulaire est omniprésente et extrêmement contrôlée tout au long de l'ontogénèse car elle joue un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité des organismes [1]. Une cytokine inflammatoire, le TNF (facteur de nécrose tumorale), permet, par exemple, l'élimination de nombreuses cellules cancéreuses « potentiellement dangereuses » en induisant leur « suicide ». Or, un des événements intracellulaires suivant la liaison du TNF à ses récepteurs est la phosphorylation d'une protéine dénommée hsp27. Cette protéine appartient à la famille des petites protéines de stress (shsp: *small heat shock proteins*) caractérisées par un domaine ayant des similitudes avec l' $\alpha$  cristalline de l'œil des vertébrés et par une activité de chaperon [2]. Ces protéines sont regroupées au sein de la super-famille des protéines de stress (ou de choc thermique) regroupant de nombreuses molécules à activité de chaperons, dont hsp70, hsp90 et hsp60 [3]. Pour comprendre la nature de l'implication d'hsp27 dans le signal TNF, nous avons fait synthétiser cette protéine par diverses lignées de fibroblastes murins. Nous avons alors montré que l'expression du gène *HSP27* humain dans ces cellules atténue fortement la mort cellulaire induite par le TNF [4, 5] ainsi que la cytotoxicité induite par l'eau oxygénée [4] ou l'anticancéreux adriamycine. De manière remarquable, l'expression d'autres shsp comme Dhsp27 de *Drosophila melanogaster*, hsp25 murine ou même l' $\alpha$ Bcristalline humaine induit le même effet de protection, suggérant une conservation de cette fonction des shsp tout au long du règne animal.

On distingue classiquement deux processus de mort cellulaire, la nécrose, mort avec rupture précoce des membranes à la suite de stimulus toxiques, et l'apoptose, qui correspond à une auto-élimination des cellules suivant un programme défini, et dans laquelle la membrane reste longtemps intacte [1]. Ayant montré que les shsp interféraient avec la mort induite par le TNF qui, dans notre système expérimental, induisait un processus de nécrose, nous avons étudié les shsp dans un contexte d'apoptose engendrée par la stimulation des récepteurs membranaires Fas/APO-1/CD95 ou par un traitement par la staurosporine, un inhibiteur de protéine kinase. Dans des fibroblastes murins synthétisant les récepteurs Fas de manière constitutive, nous avons alors montré que la surexpression du gène *HSP27* bloque l'apoptose induite par la stimulation des récepteurs Fas et inhibe fortement l'action de la staurosporine [5]. Dans les lignées, l'expression constitutive de hsp27 induirait l'internalisation du récepteur Fos. Notre laboratoire étudie aussi la signification biologique de l'accumulation transitoire de la protéine hsp27 lors des phases précoces de plusieurs processus de différenciation. Nous avons observé qu'une inhibition partielle de l'accumulation de hsp27 lors de la différenciation granulocytaire des cellules leucémiques humaines HL-60 altère le processus de différenciation de ces cellules [6]. En outre, des résultats récents montrent que l'inhibition complète de l'expression de hsp27 lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires murines (ES) conduit à un avortement de

cette différenciation par apoptose massive (manuscrit soumis à publication). Dans ce sens, hsp27 est probablement une des premières protéines connues qui contrôle le passage division/différenciation cellulaire en modulant le processus apoptotique. Ainsi, dans de multiples systèmes d'études, les shsp peuvent apparaître comme de nouveaux inhibiteurs intracellulaires de la mort cellulaire par nécrose ou apoptose.

Cette nouvelle fonction des shsp suggère qu'elles pourraient être impliquées, *in vivo*, dans la régulation de l'intégrité de l'organisme. En effet, des variations du niveau d'expression de *HSP27* pourraient entraîner une modulation de la réaction des cellules à des stimulus de mort cellulaire. Ainsi, au cours de la maturation des lymphocytes B et T, un important processus de mort cellulaire permet l'élimination des cellules « indésirables » *via* des mécanismes impliquant, entre autres, le signal Fas. Or, une accumulation transitoire de protéine hsp27 a lieu au cours de la maturation des cellules B ou T en culture [2], ce qui suggère que, *in vivo*, cette protéine pourrait permettre à certaines de ces cellules d'échapper au processus apoptotique. De même, il est intéressant d'observer que les organes dans lesquels le couple récepteur-ligand Fas est abondamment présent (gonades, système nerveux) sont aussi ceux dans lesquels certaines shsp sont activement synthétisées. En outre, puisque le TNF provoque la destruction de certaines cellules cancéreuses *in vivo*, l'expression du gène *HSP27* pourrait être considérée, soit comme un élément permettant aux cellules saines de ne pas être détruites par le TNF, soit, au contraire, comme un élément permettant à certaines cellules

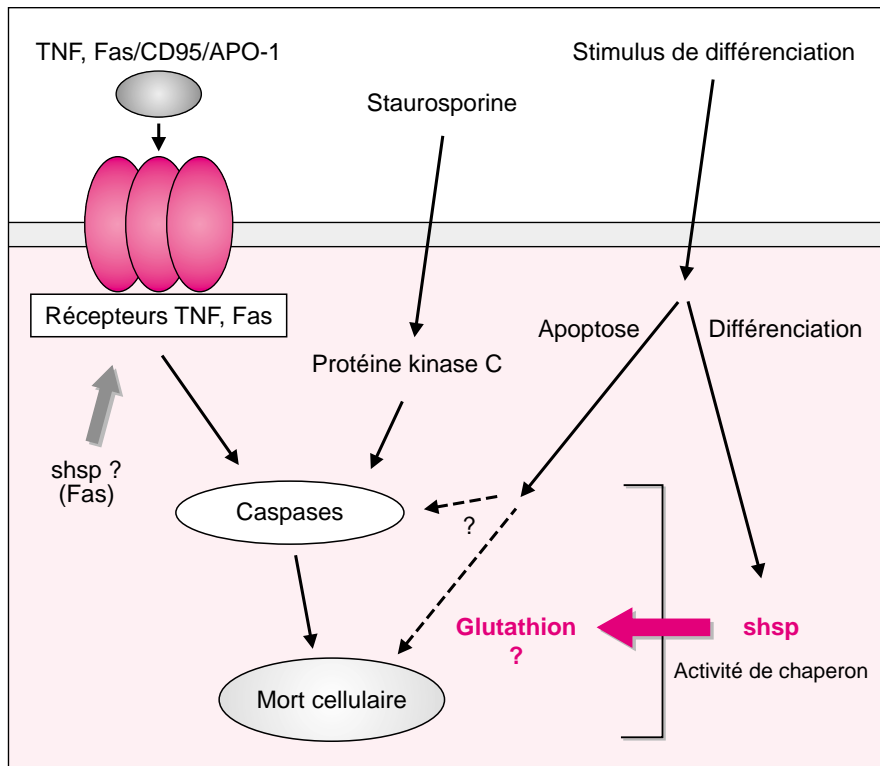


Figure 1. **Mode d'action des shsp.** Le potentiel oxydo-réducteur de la cellule est modifié par l'expression des shsp. Il en découle un état pro-réducteur probablement dû au maintien du glutathion sous sa forme réduite. On ne sait pas encore si ce phénomène résulte de l'activité de chaperon des shsp. Cet état pro-réducteur pourrait jouer un rôle important dans l'activité protectrice des shsp contre différentes formes de mort cellulaire. Le terme « caspase » a remplacé ICE-like protéases, les effecteurs de la cascade apoptotique.

cancéreuses d'échapper à l'immuno-surveillance exercée par cette cytokine. Une approche *in vivo* semble dès lors nécessaire pour répondre à ces multiples interrogations. Enfin, étudiant les mécanismes moléculaires responsables de l'activité protectrice des shsp, nous avons montré que la résistance au TNF induite par les shsp est liée à une baisse du taux intracellulaire des radicaux libres oxygénés (RLO), dérivés de l'oxygène connus pour être les relais de nombreux processus de mort cellulaire [7]. Nous avons montré, en outre, que la diminution des RLO et le blocage de la mort cellulaire qui en résulte dépendent de l'augmentation, stimulée par les shsp, du niveau d'une molécule détoxifiante, le glutathion réduit (GSH) [8]. Cette relation shsp-GSH pourrait peut-être s'étendre à l'ensemble des systèmes dans lesquels les shsp protègent de la mort cellulaire ; en effet, la différen-

ciation cellulaire semble nécessiter une modulation de la concentration intracellulaire du GSH [9] et la voie de transmission du signal Fas provoque un puissant flux sortant de glutathion [10]. Ainsi, l'augmentation de glutathion réduit, induite par les shsp, pourrait expliquer l'effet protecteur de ces protéines vis-à-vis des processus de mort impliquant des variations des paramètres oxydo-réducteurs (figure 1). Comprendre alors la relation entre les shsp et le glutathion est une question que nous tentons aujourd'hui d'élucider.

A.P.A.  
P.M.  
X.P.  
S.C.  
C.K.R.  
S.G.  
C.D.L.

- Schulze-Osthoff K, Krammer PH, Droge W. Divergent signalling via APO/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J* 1994; 13: 4587-96.
- Arrigo AP, Landry J. In: Morimoto R, Tissières A, Georgopoulos C, eds. *Heat shock proteins: structure, function and regulation*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 335-73.
- Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C. *Heat shock proteins and molecular chaperones*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klementz R, Arrigo AP. Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human  $\alpha$ B-Crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J Immunol* 1995; 154: 363-74.
- Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 16510-4.
- Chaufour S, Mehlen P, Arrigo AP. Transient accumulation, phosphorylation and changes in the oligomerization of Hsp27 during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells: possible role in the control of cellular growth and differentiation. *Cell Stress Chap* 1996; 1: 225-35.
- Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7-10.
- Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and  $\alpha$ B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF $\alpha$ -induced cell death. *EMBO J* 1996; 15: 2695-706.
- Esposito F, Agosti V, Morrone G, Morra F, Cuomo C, Russo T, Venuta S, Cimino F. Inhibition of the differentiation of human myeloid cell lines by redox changes induced by glutathione depletion. *Biochem J* 1994; 301: 649-53.
- Van den Dobbelen DJ, Nobel CSI, Schlegel J, Cotgreave IA, Orrenius S, Slater AFG. Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J Biol Chem* 1996; 271: 15420-7.

VIIIth INTERNATIONAL SYMPOSIUM  
ON LUMINESCENCE SPECTROMETRY  
IN BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL  
ANALYSIS-DETECTION TECHNIQUES  
AND APPLICATIONS  
IN CHROMATOGRAPHY  
AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS  
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
(CANARY ISLANDS)

Espagne

26-29 mai 1998

organisé par l'Université de Las Palmas de G.C. (Espagne)  
en collaboration avec l'Université de Ghent (Belgique),  
l'Université de Tokyo (Japon)  
et la Complutense Université de Madrid (Espagne)

Dr José Juan Santana Rodríguez, Symposium Chairman,  
University of Las Palmas de G.C., Department of Chemistry  
Faculty of Marine Sciences,  
35017 Las Palmas de G.C. (Canary Islands), Spain  
Fax: + 34 (9) 28 45 29 22; Tel.: + 34 (9) 28 45 29 15/45 29 00  
E-mail: josejuan.santana@quimica.ulpgc.es