

## Protéines de stress : soi, non-soi et réponse immune

Les *heat shock proteins* (HSP), ou protéines de stress, sont des chaperons moléculaires qui s'associent à d'autres protéines, ayant perdu (dénaturation thermique ou oxydative) ou n'ayant pas encore acquis (biosynthèse) leur conformation tridimensionnelle. Elles favorisent, soit leur assemblage, leur repliement ou leur transport dans les différents organites intracellulaires, soit leur dégradation. Leur expression constitutive et leur conservation extrême au cours de l'évolution suggèrent qu'elles jouent un rôle essentiel dans la vie cellulaire. Exprimées à la surface des cellules présentatrices de l'antigène ou des cellules tumorales, les protéines de stress pourraient intervenir dans la réponse immune spécifique, comme molécules présentatrices de l'antigène elles-mêmes, ou comme molécules accessoires, nécessaires aux interactions entre les différentes cellules immunitaires. Elles constituent aussi des antigènes puissants pour l'activation lymphocytaire. La stimulation des lymphocytes T spécifiques des HSP pourrait amplifier la réponse immunitaire et participer à la surveillance immune, à l'élimination des cellules infectées (cellules T cytotoxiques), à la protection (immunité de vaccination), mais aussi à des phénomènes d'auto-immunité par mimétisme moléculaire entre les HSP des pathogènes et celles de l'hôte (cellules T auxiliaires), enfin à la protection précoce au niveau des épithéliums (cellules T  $\gamma\delta$ ).

Muriel R. Jacquier-Sarlin  
Barbara S. Polla

### ADRESSE

M.R. Jacquier-Sarlin : docteur de l'université Joseph-Fourier. B.S. Polla : docteur de l'université de Genève, directeur de recherche à l'Inserm. Unité d'allergologie, hôpital cantonal universitaire, 1211 Genève 14, Suisse.

m/s n° 1 vol. 10, janvier 94

**L**a synthèse des protéines du choc thermique (*heat shock proteins*, HSP), initialement décrite en réponse à des traitements qui accélèrent la dénaturation des protéines (comme le choc thermique), est un moyen de défense généralisé, développé par la cellule pour faire face à la grande diversité des agressions auxquelles elle peut être soumise. Les HSP sont d'ailleurs aussi appelées protéines « de stress » (nomenclature moins restrictive que HSP).

Les protéines de stress s'associent à d'autres protéines, ayant perdu (dénaturation) ou n'ayant pas encore acquis (biosynthèse) leur conformation tridimensionnelle. La finalité de ces interactions moléculaires est multiple : prévenir l'aggrégation des protéines altérées ou en cours de biosynthèse, éliminer les protéines anormales reconnues comme étrangères (*non-soi*) et/ou participer au transfert des protéines du cytoplasme vers la membrane plasmique ou vers des organites tels

## RÉFÉRENCES

1. Ellis RJ, Van Der Vies SM. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 1991 ; 60 : 321-47.
2. Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. Transcriptional regulation of heat shock genes. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 21987-90.
3. Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990 ; 32 : 242-51.
4. Rees AD, Donati Y, Lombardi G, Lamb J, Polla BS, Lechler R. Stress-induced modulation of antigen-presenting cell function. *Immunology* 1991 ; 74 : 386-92.
5. Flajnick MF, Canel C, Kramer J, Kasahara M. Which came first, MHC class I or class II ? *Immunogenetics* 1991 ; 33 : 295-300.
6. Buchmeier NA, Heffron F. Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 1990 ; 248 : 730-3.
7. Kuhn MS, Kathariou S, Goebel W. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1989 ; 57 : 55-61.
8. Chappell TG, Welch WJ, Schlossman DM, Palter KB, Schlesinger MJ, Rothman JE. Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* 1986 ; 45 : 3-13.
9. Vanbuskirk AM, DeNagel DC, Guagliardi LE, Brodsky FM, Pierce SK. Cellular and subcellular distribution of PBP72/74, a peptide-binding protein that plays a role in antigen processing. *J Immunol* 1991 ; 146 : 500-6.
10. Roosnek E, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A. Kinetics of MHC-antigen complex formation on antigen-presenting cells. *J Immunol* 1988 ; 140 : 4079-82.
11. Buss S, Sette A, Colon SM, Jenis DM, Grey HM. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 1986 ; 47 : 1071-7.
12. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 1987 ; 329 : 506-12.
13. Vanbuskirk AM, Crump BL, Margoliash E, Pierce S. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. *J Exp Med* 1989 ; 170 : 1799-809.
14. Domanico SZ, DeNagel DC, Dahlseid JN, Green JM, Pierce SK. Cloning of the gene encoding Peptide-Binding-Protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. *Mol Cell Biol* 1993 ; 3598-610.

que les mitochondries, le réticulum endoplasmique, les lysosomes ou le noyau. C'est sur la base de ces interactions que les HSP ont été baptisées chaperons moléculaires [1]. Les HSP ont été extrêmement conservées à travers l'évolution, et la plupart des propriétés fonctionnelles et structurales des protéines bactériennes se retrouvent chez leurs homologues eucaryotes. Par ailleurs, ces protéines ubiquitaires sont également des antigènes majeurs lors d'infections bactériennes ou parasitaires. L'immunogénicité des HSP (du *soi* ou du *non-soi*) ouvre des nouvelles perspectives d'études que peuvent explorer aussi bien l'immunologie cellulaire, que l'immunologie infectieuse et l'auto-immunité (figure 1).

## La réponse heat shock

L'exposition cellulaire à une élévation de température ou à d'autres agressions induit dans toute cellule une réponse instantanée et transitoire appelée réponse *heat shock*. Cette réponse se traduit par la diminution de la traduction des ARN messagers et de la synthèse des protéines cellulaires normales, par l'inhibition de certaines activités enzymatiques et par des altérations morphologiques (modifications du cytosquelette et de la chromatine). De façon quasi simultanée, la cellule met en place un système de protection caractérisé par l'induction de la transcription d'une famille de gènes spécifiques qui aboutit à la synthèse

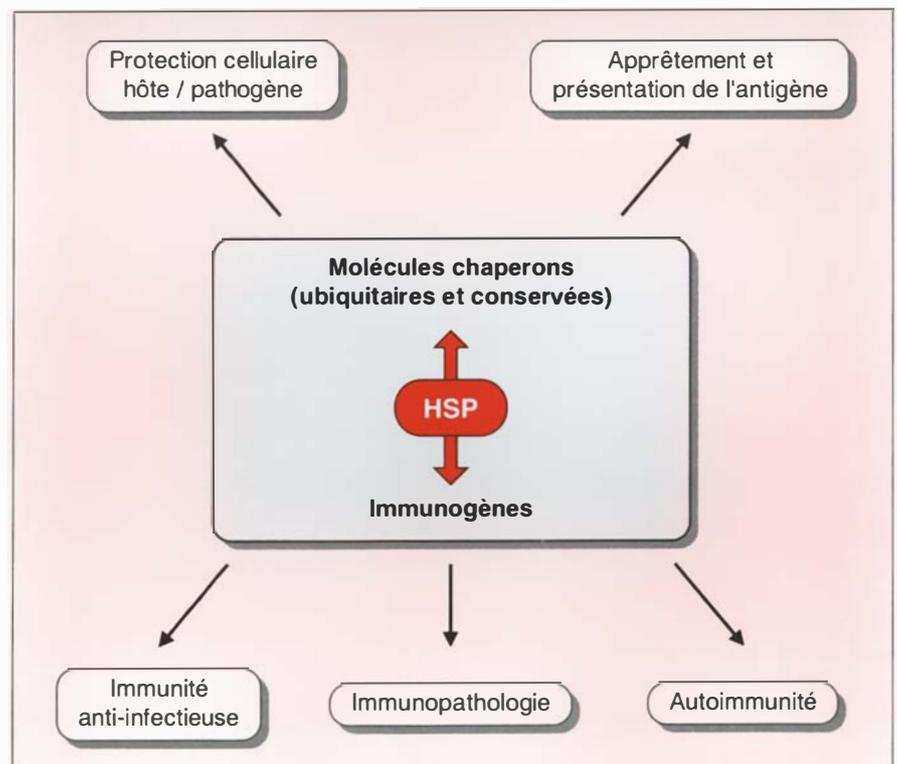


Figure 1. **Les différentes implications des HSP au cours de la réponse immunitaire.** Les HSP possèdent deux propriétés essentielles à l'origine de leurs diverses fonctions dans la réponse immunitaire. Le fait qu'elles soient de remarquables chaperons moléculaires leur permet de participer à des processus aussi complexes que la présentation de l'antigène et la protection cellulaire. Ce potentiel protecteur s'exerce aussi bien dans la cellule stressée (restauration des protéines cellulaires endommagées lors du stress, dégradation des molécules anormales) que dans l'agent pathogène (survie des bactéries). Les HSP sont les cibles préférentielles d'une réponse immunitaire spécifique (lymphocytes T et anticorps anti-HSP), alors que le caractère ubiquitaire et conservé de ces protéines peut être à l'origine de processus immunitaires contradictoires comme la surveillance et la protection immunes, d'une part, et l'auto-immunité, d'autre part.

puis à l'accumulation intracellulaire des protéines de stress. Cette phase d'adaptation est nécessaire à la restauration progressive des fonctions cellulaires normales.

Les facteurs susceptibles d'engendrer ce type de réponse peuvent être regroupés en trois catégories (figure 2): (1) en l'absence d'agression, le cycle et la différenciation cellulaires ou les phases précoces de l'embryogenèse et de la spermatogenèse; (2) les agressions de l'environnement, dont les exemples les plus classiques sont le choc thermique et les radicaux libres de l'oxygène; (3) les agressions engendrées par des états pathologiques tels que fièvre, inflammation ou ischémie-reperfusion. Face à la diversité de

ces inducteurs, un des objectifs majeurs reste la compréhension des mécanismes par lesquels l'agression est détectée par la cellule et l'information transmise au système transcriptionnel.

L'activation transcriptionnelle des gènes *heat shock* a surtout été étudiée pour un groupe de protéines d'environ 70 kDa correspondant à la famille des HSP70 [2]. Plusieurs gènes codant pour des membres de cette famille ont été clonés chez les mammifères et chez les organismes inférieurs et les éléments responsables du contrôle de l'activation de la transcription de ces gènes ont été caractérisés.

Chez l'homme, deux facteurs *heat shock* (HSF) ont été décrits avec des

rôles fonctionnels distincts. Alors que l'affinité de HSF1 pour l'ADN nécessite une agression cellulaire, celle de HSF2 est constitutive. Comme d'autres éléments régulateurs transcriptionnels inductibles, les HSF sont synthétisés et stockés sous une forme latente en absence d'agression. La capacité de liaison à l'ADN est acquise après activation (choc thermique); dans ces conditions, on observe un changement de conformation du HSF1 qui s'associe pour constituer des homotrimères capables de se fixer sur des sites spécifiques dits *heat shock elements* (HSE) composés de trois modules de cinq paires de bases (nGAAn) agencés selon le modèle: nGAAnnTTCnn-GAAn. Malgré une homologie totale inférieure à 40 %, tous les HSF conservent en commun deux domaines: le site de liaison à l'ADN et la séquence hydrophobe impliquée dans l'oligomérisation du HSF. La mise en évidence d'une association entre les HSP et le facteur HSF1, ainsi que leurs caractéristiques de chaperon moléculaire, suggèrent que les protéines de stress pourraient participer au contrôle de leur propre synthèse, soit en maintenant les HSF1 dans leur forme inactive, soit en favorisant leur oligomérisation.

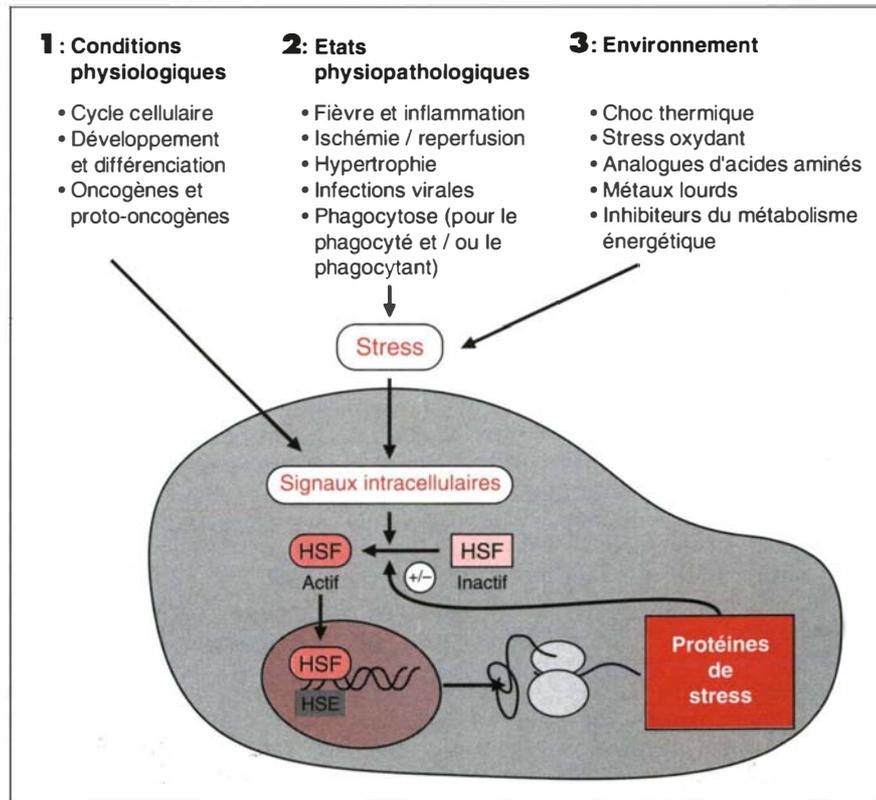


Figure 2. **Classification des différents inducteurs de la réponse cellulaire au stress** (adaptée avec permission de Morimoto et al. [35]). Les inducteurs connus pour entraîner une augmentation de la synthèse des protéines de stress peuvent être classés en trois groupes: (1) certaines conditions physiologiques comme la croissance cellulaire ou le développement; (2) certains états physiopathologiques ou maladies; (3) certaines agressions provenant de l'environnement. Chacune de ces conditions induit une oligomérisation du facteur HSF qui pénètre alors dans le noyau pour se lier à la séquence HSE située dans la région promotrice des gènes *heat shock*. Cela conduit à l'induction de l'expression des gènes *heat shock* et à la synthèse des HSP. Comme cela a été décrit dans le texte, l'activation du HSF suite à une agression cellulaire concerne exclusivement HSF1.

### Structure et fonctions des HSP

Les HSP sont habituellement classées en familles, selon leur poids moléculaire apparent sur gels d'électrophorèse, leurs principaux agents inducteurs et leurs fonctions (Tableau 1). La famille des HSP70 contient des protéines constitutives (*heat shock cognate*, HSC), des protéines inductibles et des protéines contrôlées par le glucose (*glucose regulated proteins*, GRP). Jusqu'à présent dix gènes codant pour des HSP70 ont été localisés dans le génome humain, sur les chromosomes 5, 6, 14 et 21. Ceux répertoriés sur le chromosome 6 sont situés dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [3], ce qui a fait envisager des mécanismes de régulation communs pour l'expression des molécules du CMH et des HSP. Nous avons montré que l'exposition

## RÉFÉRENCES

15. Munro S, Pelham HRB. An HSP70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 1986; 46: 291-300.
16. Lanctôt P, Crine P. La rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique. *médecine/sciences* 1993; 9: 1249-52.
17. Mayer A, Siegel NR, Schwartz AL, Ciechanover A. Degradation of proteins with acetylated amino termini by the ubiquitin system. *Science* 1989; 244: 1480-3.
18. Townsend A, Ohlen C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Karre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989; 340: 443-8.
19. Driscoll J, Goldberg A. The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J Biol Chem* 1990; 265: 4789-92.
20. Momburg F, Ortiz-Navarrete V, Neefjes J, Goulmy E, Van de Wal Y, Spits H, Powis SJ, Butcher GW, Howard JC, Walden P, Hämmerling G. Proteasome subunits encoded by the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation. *Nature* 1992; 360: 174-7.
21. Michalek MT, Benacerraf BJ, Rock KL. The class II MHC-restricted presentation of endogenously synthesized ovalbumin displays clonal variation, requires endosomal/lysosomal processing, and is up-regulated by heat shock. *J Immunol* 1992; 148: 1016-24.
22. Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 1989; 246: 382-5.
23. Munk ME, Schoel B, Modrow S, Karr RW, Young RA, Kaufmann SHE. T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self epitopes shared by the mycobacterial and human 65 kDa heat shock protein. *J Immunol* 1989; 143: 2844-9.
24. Donati YRA, Kantengwa S, Polla BS. Phagocytosis and heat shock response in human monocytes-macrophages. *Pathobiology* 1991; 59: 156-61.
25. Koga T, Wand-Wurttenberger A, de Bruyn J, Munk ME, Schoel B, Kaufmann SHE. T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages. *Science* 1989; 245: 1112-5.
- de cellules B à un choc thermique ou au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) augmentait l'expression des molécules de classe II à la surface de ces cellules [4].
- L'analogie avec les molécules du CMH se poursuit au niveau structural: l'extrémité hétérogène C-terminale des HSP contient le site de liaison au substrat, lequel est apparenté à la gouttière des molécules HLA de classe I qui fixe les peptides immunogènes [5]. Les régions reconnues par les HSP correspondent à des sites structuraux hydrophobes normalement enfouis dans la molécule et qui deviennent accessibles après dénaturation ou dégradation. L'interaction des HSP avec ces protéines dénaturées ou dépliées favorise soit leur assemblage, leur repliement ou leur transport dans les différents organites intracellulaires, soit leur dégradation. Cette interaction est ensuite rompue avec hydrolyse d'ATP. En effet, les HSP70 contiennent à leur extrémité N-terminale un domaine commun très conservé correspondant à un site de liaison à l'ATP et à l'activité ATPasique.
- L'expression constitutive de la plupart des HSP indique que ces protéines jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de la cellule, et cela même en dehors de toute agression, en participant, entre autres, à la biosynthèse des protéines, à la transmission des signaux ou à la prolifération cellulaire. Après une agression cellulaire, ce rôle des HSP deviendrait plus important encore, et c'est ainsi qu'elles représenteraient un système de protection universel.
- Après une infection bactérienne, différents mécanismes de défense (radicaux libres de l'oxygène, cytokines, protéases...) sont développés par la cellule-hôte. La production des radicaux libres de l'oxygène provoque une dénaturation des protéines et, de ce fait, l'induction de la synthèse des HSP. Ces HSP nouvellement synthétisées permettraient à la cellule-hôte de maintenir l'intégrité structurelle et fonctionnelle des protéines cellulaires et participeraient à l'élimination du pathogène, soit en favorisant le catabolisme des protéines bactériennes altérées par
- les radicaux libres de l'oxygène et/ou les protéases, soit en participant à l'apprêtement et à la présentation des antigènes bactériens.
- Ainsi, pour survivre à l'intérieur de la cellule-hôte, et notamment après l'explosion oxydative phagocytaire, *Salmonella typhimurium* synthétise les HSP70 et HSP60. Des mutants de *S. typhimurium*, déficients pour l'induction de ces HSP en réponse à l'agression oxydative, sont incapables de survivre et de se multiplier à l'intérieur de macrophages [6]. De même la survie intracellulaire de *Listeria monocytogenes* après infection d'une cellule-hôte nécessite la synthèse d'une protéine de 58 kDa identifiée comme la listériolysine. Des mutants de *Listeria*, déficients pour la production de listériolysine, sont incapables de survivre dans les macrophages [7]. Le fait que cette protéine soit également induite après un choc thermique suggère qu'il s'agit aussi d'une protéine de stress.
- Ces deux exemples indiquent que les HSP pourraient favoriser la survie des bactéries dans l'environnement intracellulaire hostile des cellules-hôtes, soit en maintenant la structure de protéines bactériennes essentielles (HSP de *S. typhimurium*), soit en produisant des facteurs responsables de la lyse des membranes des phagosomes (listériolysine de *Listeria*). Dans ces conditions, les HSP peuvent être considérées comme des facteurs de virulence.

### Les HSP et la présentation de l'antigène

L'activation des lymphocytes T nécessite une étape importante au cours de laquelle l'antigène est dégradé en fragments peptidiques capables de s'associer aux molécules de classe I ou II du CMH, conduisant à la formation d'un complexe bimoléculaire reconnu par le récepteur des cellules T. Il a longtemps été admis que les molécules de classe I du CMH présentent des peptides d'antigènes endogènes (protéines virales ou antigènes tumoraux) à des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), alors que les molécules de classe II du CMH présentent des

Tableau I

## PRINCIPALES PROTÉINES DE STRESS, LEURS FONCTIONS ET LEURS INDUCTEURS RESPECTIFS

Protéines de stress	Fonctions	Inducteurs
<b>Famille HSP</b> <b>HSP 110</b> (110 kDa) <b>HSP 90</b> (83-90 kDa)  <b>HSP 70</b> (68-73 kDa)  HSC 70-73 prp 73 PBP 72-74 <b>HSP 65</b>  <b>HSP 47</b> <b>HSP de bas poids moléculaire</b> (20-28 kDa) <b>Ferritine</b> <b>Ubiquitine</b> (8 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chaperon moléculaire (noyau)</li> <li>• Associée au récepteur des stéroïdes</li> <li>• Antigène tumoral ?</li> <li>• Chaperon moléculaire (cytoplasme et noyau) <ul style="list-style-type: none"> <li>- assemblage des protéines</li> <li>- translocation des protéines</li> <li>- maintien de la solubilité des protéines nucléaires et cytosoliques</li> <li>- <i>clathrin uncoating ATPase</i></li> <li>- ciblage des protéines vers les lysosomes</li> <li>- apprêtement de l'antigène</li> </ul> </li> <li>• Chaperon moléculaire (mitochondrie)</li> <li>• Antigène immunodominant</li> <li>• Protéine de liaison du collagène</li> <li>• Chaperons moléculaires</li> <li>• Constitution du protéasome</li> <li>• Stockage du fer</li> <li>• Dégradation protéique</li> <li>• Constituant du protéasome</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Choc thermique</li> <li>• Drogues antimitotiques</li> <li>• Ischémie-reperfusion, radicaux libres de l'oxygène</li> <li>• Protéines dénaturées</li> <li>• Inhibiteurs de la phosphorylation oxydative</li>   <li>• Inflammation</li> <li>• Cytokines*</li>   <li>• Fer</li> <li>• Choc thermique</li> <li>• Protéines dénaturées</li> </ul>
<b>Famille GRP</b> <b>GRP 96</b> (HSP 90-LIKE) <b>GRP 78</b> (BiP, HSP 70-LIKE)  <b>GRP 75</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antigène tumoral ?</li> <li>• Association aux chaînes lourdes des immunoglobulines</li> <li>• Chaperon moléculaire (RE)</li> <li>• Chaperon moléculaire (mitochondrie)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Privation de glucose</li> <li>• Ionophores du calcium</li> </ul>
<b>Métallothionéines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antioxydant</li> <li>• Détoxification des métaux lourds</li> <li>• Protection de l'ADN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Métaux lourds</li> <li>• Cytokines (IL6)</li> </ul>
<b>Enzymes</b>		
<b>Superoxyde dismutase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dismutation des superoxydes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Choc thermique (bactéries), radicaux libres de l'oxygène, TNF<math>\alpha</math></li> </ul>
<b>Hème oxygénase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dégradation de l'hème</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Choc thermique (rat), hémine, UV</li> <li>• superoxydes, cadmium</li> </ul>

\* Induction spécifique dans certaines cellules par IL1, IL2, TNF $\alpha$ .

peptides d'antigènes exogènes responsables de l'activation des cellules T auxiliaires et de l'amplification de la réponse immune contre l'antigène originel.

L'effet chaperon des HSP70 dans l'apprêtement et la présentation de l'antigène a d'abord été suggéré pour des antigènes exogènes. En effet, Chappell *et al.* [8] démontrèrent, par des techniques de copurification, que l'HSP72 était identique à la *clathrin uncoating ATPase*. Cette protéine participe à l'endocytose spécifique des antigènes exogènes, par des récepteurs liés à des puits recouverts de clathrine. Après son internalisation, l'antigène est ciblé et transporté vers un compartiment acide, tels les endosomes et/ou les lysosomes. L'antigène va alors subir une protéolyse limitée

avant de s'associer aux molécules de classe II du CMH. Différentes protéines de la famille des HSP70 pourraient participer à l'apprêtement et à la présentation de l'antigène (*figure 3*).

Des données récentes concernant les cinétiques d'association des peptides avec les molécules de classe II du CMH renforcent l'hypothèse du rôle des HSP et plus particulièrement de la PBP72/74 (*peptide binding protein*) dans ce processus [9]. Il a été démontré qu'un peptide synthétique peut s'associer en quelques minutes avec les molécules de classe II exprimées à la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène, sous forme de complexes fonctionnels capables d'activer des cellules T spécifiques. La dissociation de ces complexes est également très rapide (complète en

quatre heures) et ne peut être uniquement le fait du *turnover* des molécules de classe II [10]. Des expériences réalisées avec des molécules de classe II purifiées et en solution ou incorporées dans des membranes synthétiques indiquent qu'après plusieurs heures d'incubation, seulement 1 % à 10 % de ces molécules de classe II ont lié des peptides antigéniques exogènes [11]. L'incapacité de ces molécules à fixer davantage de peptides est en partie expliquée par le fait que le site d'interaction est déjà occupé, que ce soit par un peptide issu d'un antigène endogène ou d'un antigène exogène [12]. Les cellules présentatrices de l'antigène ont donc la capacité de former ou de dissocier des complexes peptides/molécules de classe II beaucoup plus rapide-

## RÉFÉRENCES

26. Haregewoin A, Singh B, Radhey S, Gupta S, Finberg RW. A mycobacterial heat-shock protein-responsive T cell clone also responds to the homologous human heat-shock protein: a possible link between infection and autoimmunity. *J Infect Dis* 1991; 163: 156-60.
27. Porcelli S, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 1992; 360: 593-7.
28. Janis EM, Kaufmann SHE, Scharzt RJ, Pardoll DM. Activation of T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1989; 244: 713-6.
29. Barrios C, Lussow AR, Embden JV, Van der Zee R, Rappuoli R, Costantino P, Louis JA, Lambert PH, Del Giudice G. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1365-72.
30. Li Z, Srivastava PK. Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *EMBO J* 1993; 12: 3143-51.
31. Katalin VL, Lowrie DB, Stokes RW, Colston MJ. Tumor cells transfected with a bacterial heat-shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors. *J Exp Med* 1993; 178: 343-8.
32. Van Eden W, Thole JER, van der Zee R, Noordzij A, van Embden JDA, Hensen EJ, Cohen IR. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 1988; 331: 171-3.
33. Elias D, Markovits D, Reshef T, Van der Zee R, Cohen IR. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1576-80.
34. Muller S. Place et rôle de l'ubiquitine dans le développement de l'auto-immunité au cours de la maladie lupique. *médecine/sciences* 1992; 8: 223-32.
35. Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. Transcriptional regulation of heat shock genes. *J Biol Chem* 1992; 267: 21987-90.
- ment que des molécules du CMH purifiées. En liant les peptides résultant de la protéolyse de l'antigène, en les transportant dans un compartiment approprié et en facilitant les interactions avec les molécules de classe II, les HSP pourraient rendre compte, tout au moins en partie, des différences observées entre les conditions *in vitro* (membranes et classe II purifiées) et les conditions *in vivo* (cellules présentatrices de l'antigène) (figure 3).
- Dans ce contexte, il est intéressant de rappeler que la PBP72/74 est capable de lier des peptides immunogènes (du cytochrome *c*), ayant de préférence une structure secondaire de type linéaire, mais pas l'antigène natif [13]. L'hydrolyse de l'ATP, préalablement fixé sur la PBP72/74, aboutit à la libération du peptide. La participation de la PBP72/74 dans la présentation de l'antigène est illustrée par les études réalisées avec un sérum de lapin spécifique de la PBP72/74, dont la caractéristique est d'inhiber à 80 % ou 90 % la présentation du cytochrome *c* ou de l'ovalbumine. Le gène codant pour la PBP72/74 vient d'être cloné et permet de confirmer que cette protéine est bien un nouveau membre de la famille des HSP70 [14]. Des analyses complémentaires utilisant des techniques de *Western blot* indiquent que la PBP72/74 est seulement révélée par l'anticorps monoclonal MabN27 spécifique de l'HSP70 constitutive, mais pas par le MAbN15 spécifique de l'HSP70 inductible. D'ailleurs, cette protéine n'est pas surexprimée dans des conditions d'agression. Son expression semble plutôt dépendre du type cellulaire et ne varie nullement en fonction de l'expression des molécules de classe II, bien que sa distribution intracellulaire se superpose avec les compartiments subcellulaires connus pour contenir des molécules de classe II, à savoir: les vésicules d'endocytose, la membrane plasmique ou le réticulum endoplasmique. Le rôle exact de cette protéine reste cependant à définir. Sa nature et sa localisation laissent supposer qu'elle pourrait participer à la biosynthèse et à l'assemblage des molécules de classe II (chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et invarian-
- tes), au transport de ces molécules vers les compartiments acides où se déroule la protéolyse de l'antigène et enfin à la formation du complexe bimoléculaire peptide/molécules de classe II (figure 3). L'expression membranaire de la PBP72/74 évoque aussi une participation des HSP comme molécules présentatrices de l'antigène, similaire à celle des molécules du CMH, ou comme molécules accessoires nécessaires aux interactions entre les différentes cellules immunitaires, dans le cadre d'une présentation déjà restreinte par le CMH (figure 4). La capacité des HSP de lier une grande variété de molécules, dont les peptides, est en accord avec cette possibilité. Par ailleurs, le rôle des HSP dans l'assemblage des molécules du CMH a été démontré pour un autre membre de la famille des HSP70, la GRP78 aussi appelée BiP (*immunoglobulin heavy chain binding protein*) [15]. Il s'agit d'une protéine constitutive de 78kD présentant de fortes homologies avec la PBP72/74. La GRP78 possède une séquence KDEL\* responsable de sa rétention dans le réticulum endoplasmique [16], où elle s'associe à différentes protéines, dont les chaînes lourdes des immunoglobulines et les chaînes naissantes des molécules du CMH. L'intervention des HSP, et plus particulièrement de l'ubiquitine, dans la présentation des antigènes endogènes est controversée. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés (8 kDa) dont une des fonctions serait de faciliter la dégradation protéique [17]. Pour éliminer les protéines destinées au catabolisme, l'ubiquitine les lie de manière covalente (liaison peptidique). La formation de combinés multi-ubiquitinylés par attachement covalent d'un chapelet de molécules d'ubiquitine, liées entre elles au niveau de leur lysine 48, sert de signal d'activation pour la protéolyse. Les antigènes endogènes sont généralement protéolysés dans le cytosol, puis transportés sous forme de peptides dans le réticulum endoplasmique où ils s'associent à une molécule de classe I. Il a été

\* Code des acides aminés: K = Lys; D = Asp; E = Glu; L = Leu; F = Phe; R = Asn; Q = Gln.

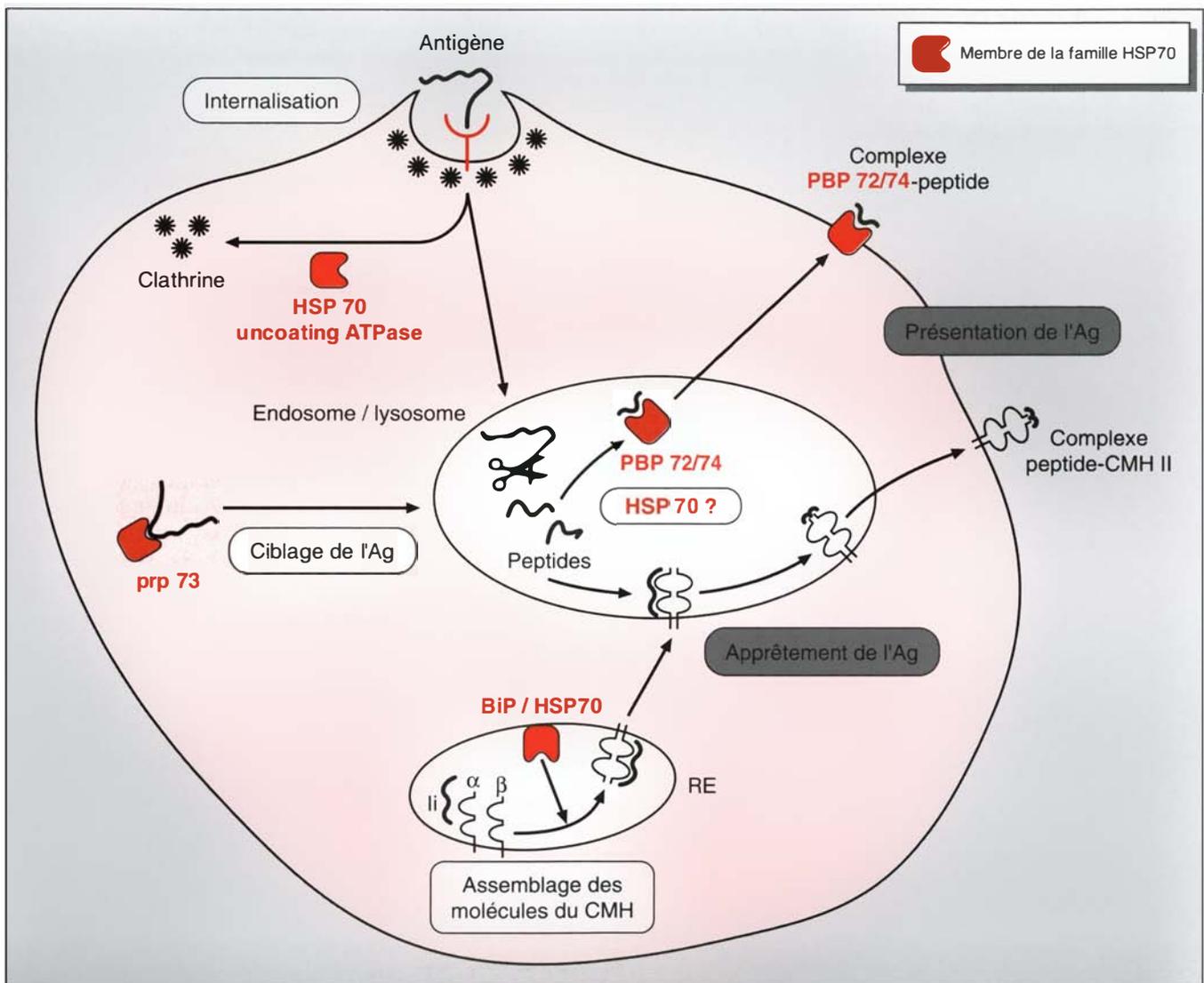


Figure 3. **Rôles des HSP70 dans l'apprêtement et la présentation de l'antigène.** Les antigènes sont internalisés par phagocytose ou endocytose par récepteurs mettant en jeu des puits recouverts de clathrine. La clathrine est ôtée par l'HSP70 uncoating ATPase. L'antigène poursuit son cheminement intracellulaire vers un compartiment acide où il va subir une protéolyse limitée conduisant à la production de peptides capables de s'associer avec des molécules de classe II du CMH. L'HSP70 et plus spécifiquement la PBP72/74 pourrait : (1) protéger l'antigène d'une protéolyse complète ; (2) favoriser la formation du complexe peptide-molécule du CMH ; (3) participer au transport et/ou à la présentation de ce complexe à la surface de la cellule présentatrice. Par ailleurs, la Prp73 permet le ciblage des antigènes cytosoliques vers les lysosomes et la BiP assure l'assemblage correct des molécules du CMH et des immunoglobulines au niveau du réticulum endoplasmique.



entraînant ainsi la stimulation de lymphocytes T cytotoxiques (CTL: CD8) et/ou auxiliaires (CD4+/CD8-) responsables de l'élimination de la cellule infectée et/ou de l'agent infectieux [24, 25].

- Des cellules T périphériques ayant pour récepteur l'hétérodimère  $\gamma\delta$  [26]. Dans ces conditions, l'association de l'antigène protéolysé avec une molécule polymorphe du CMH n'est pas indispensable. Cependant, une association avec la molécule non polymorphe Qa-1 de classe Ib a été observée chez la souris. L'expression de cette molécule est augmentée par le choc thermique. Un équivalent humain pourrait être la molécule CD1b, dont l'analogie avec des molécules de classe I et la modulation par certaines agressions (cytokines) viennent d'être démontrées [27]. Le répertoire des récepteurs  $\gamma\delta$  étant très limité, le fait que les lymphocytes T qui les portent puissent effectivement reconnaître les protéines de stress permet de proposer que ces lymphocytes assureraient une protection initiale contre l'infection, en attendant que les cellules T prennent le relais; il faut d'ailleurs noter qu'après une seconde immunisation avec *M. tuberculosis*, les cellules  $\gamma\delta$  ne prolifèrent plus [28]. Cette hypothèse pourrait rendre compte de la prédominance des lymphocytes T  $\gamma\delta$  au niveau des épithéliums pulmonaires, intestinaux et cutanés. En effet, ces épithéliums, en contact constant et direct avec les agressions potentielles du monde extérieur, devraient être particulièrement dotés en mécanismes de défense immunitaire rapidement efficaces.

L'HSP65 et l'HSP70 sont des antigènes immunodominants dans l'activation lymphocytaire par, respectivement, les bactéries et les parasites. Cette immunogénicité des HSP a été exploitée dans le but d'augmenter l'efficacité des vaccins synthétiques ou recombinants [29]. Pour cela, les HSP ont été utilisées en tant qu'adjuvant lors de l'immunisation. Cependant, l'effet observé avec l'HSP65 nécessite une pré-immunisation, ce qui n'est pas le cas avec l'HSP70. Cette différence de comportement peut provenir, d'une part, de l'existence d'une immuni-

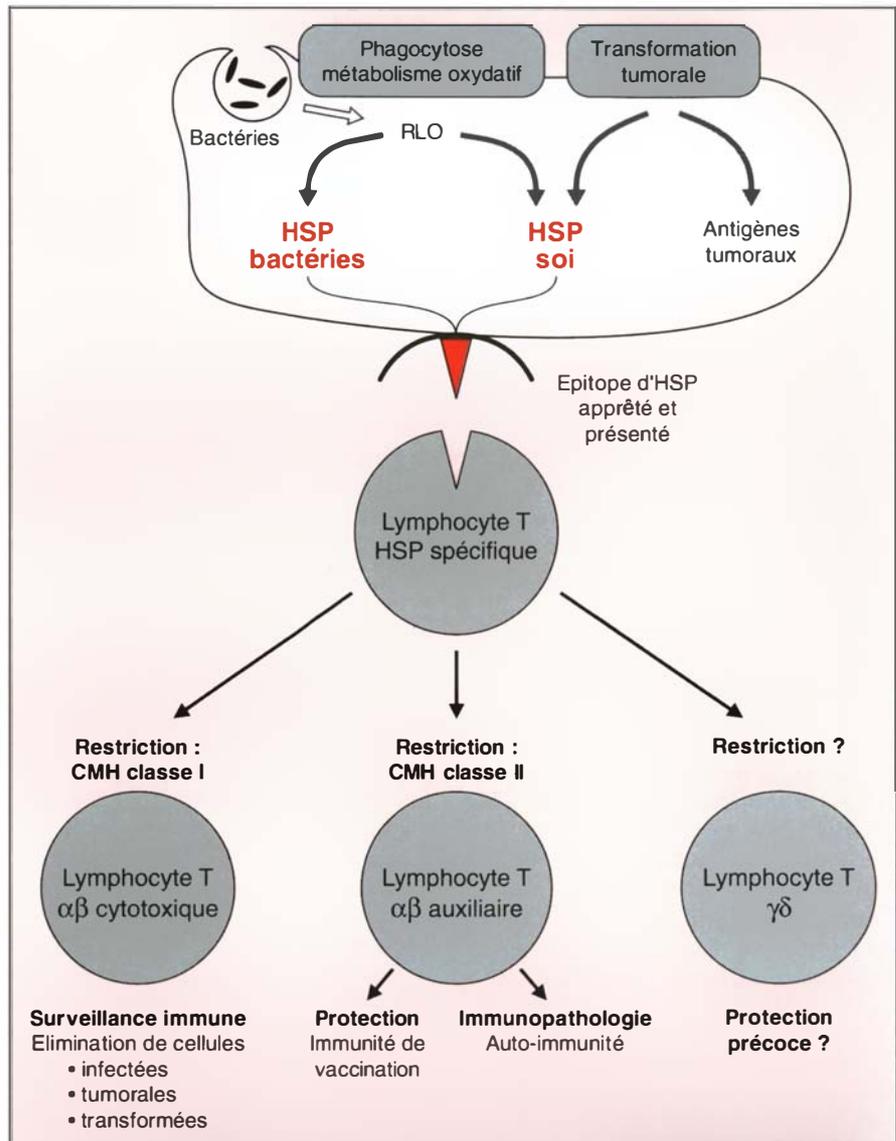


Figure 5. **Les HSP et l'immunité.** Une augmentation de la production des protéines de stress a été observée après transformation cellulaire ou au cours de la phagocytose en réponse probablement à la production intracellulaire de radicaux libres de l'oxygène (RLO) par la cellule hôte. Ces HSP constituent des antigènes potentiels pour l'activation des différentes populations de lymphocytes. La stimulation des lymphocytes T spécifiques des HSP pourrait amplifier la réponse immunitaire et participer à: (1) la surveillance immunitaire et l'élimination des cellules infectées (cellules T cytotoxiques); (2) la protection (immunité de vaccination) mais aussi à des phénomènes d'auto-immunité par mimétisme moléculaire entre les HSP des pathogènes et celles de l'hôte (cellules T auxiliaires); (3) la protection précoce au niveau des épithéliums (cellules T  $\gamma\delta$ ).

sation naturelle contre l'HSP70 mais non contre l'HSP65, d'autre part, d'une fréquence plus importante des clones de lymphocytes T stimulés par l'HSP70. Alors que l'utilisation des HSP65 et des HSP70 induit la production d'anticorps spécifiques de ces protéines, cette réponse n'altère pas, comme il a été démontré pour d'autres adjuvants, l'immunogénicité des peptides vaccinaux. Les HSP, notamment l'HSP70, la p84/86 et surtout la gp96 (les deux dernières sont des membres de la famille des HSP90), sont également des antigènes tumoraux [30]. L'immunisation de souris avec la gp96 purifiée à partir de cellules tumorales murines induit une immunité spécifique de la tumeur originale; cette immunité dépend de lymphocytes T (CD8<sup>+</sup>). Aucune différence structurale n'a été observée entre les gp96 de tissus sains et de tissus tumoraux. L'immunogénicité spécifique de la tumeur ne proviendrait donc pas de la gp96 elle-même, mais serait directement dépendante des peptides associés à cette protéine. L'analyse biochimique des peptides élués à partir des préparations de gp96 provenant de tumeurs différentes a confirmé cette hypothèse. Compte tenu de la localisation de la gp96 dans le réticulum endoplasmique, il est proposé que les molécules de gp96 fixent les peptides immunogènes lors de leur transfert dans le réticulum et permettent leur association avec les molécules de classe I.

D'une façon générale, les antigènes tumoraux sont peu immunogènes, leur reconnaissance et leur élimination par les lymphocytes T (CD8<sup>+</sup>) nécessite la présence d'IL2 et d'IL4. L'immunogénicité des HSP (plus spécifiquement celle des HSP65) a été exploitée comme alternative pour augmenter l'immunité vis-à-vis des cellules tumorales. La transfection d'une lignée tumorale macrophagique murine (J774) avec un gène codant pour l'HSP65 induit une réponse immune efficace contre les antigènes tumoraux associés aux cellules J774 qui normalement n'induisent pas de réponse [31]. Ces cellules surexpriment l'HSP65 et la p53. p53 est une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire

dont la conformation et la fonction sont contrôlées par les HSP. Les tumeurs présentent fréquemment des altérations du gène codant pour la p53 entraînant la production de p53 dysfonctionnelle. Par leur fonction de chaperons moléculaires, les HSP65 et les HSP70 (décrites aussi pour s'associer à la p53) pourraient restaurer la conformation native de p53 et son action anti-proliférative. Le développement et le perfectionnement des techniques de transfection *in vivo* et de l'expression des gènes introduits dans les cellules cibles pourraient déboucher sur l'utilisation des gènes des HSP65 et HSP70 dans l'approche d'une nouvelle stratégie de thérapie immunologique du cancer.

La réponse immunitaire anti-HSP pourrait constituer une première ligne de défense contre les infections et la transformation cellulaire, permettant d'éliminer les micro-organismes (antigènes = HSP exogènes) et les cellules autologues aberrantes (antigènes = HSP endogènes). En dehors des agressions, les cellules normales échapperaient à la reconnaissance par le système immunitaire du fait qu'elles synthétiseraient un taux infra-critique d'HSP. L'immunogénicité des HSP implique un contrôle efficace du système immunitaire dont les contraintes pourraient contribuer à la genèse de maladies auto-immunes (figure 5).

### Les HSP et l'auto-immunité

L'auto-immunité résulte d'un dysfonctionnement du système immunitaire dans lequel la méconnaissance des composants du soi conduit à des maladies caractérisées par la destruction de ses propres antigènes. Dans ces conditions, l'organisme développe une réponse spécifique avec la production d'anticorps dirigés contre l'auto-immunogène. Parmi les auto-anticorps caractéristiques décrits chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, d'arthrite chronique juvénile ou de lupus érythémateux disséminé, nombreux sont ceux dirigés contre les HSP.

Les meilleures preuves de l'implication des protéines de stress dans les

maladies auto-immunes proviennent des modèles animaux. L'apparition, chez le rat, d'une maladie similaire à la polyarthrite rhumatoïde à la suite d'une injection de *Mycobacterium tuberculosis* ou d'extraits de ce dernier, est relayée par des clones T arthritogéniques. La maladie est transférable à l'animal naïf par l'administration de ces clones [32]. L'antigène reconnu par les cellules arthritogéniques est une protéine de 65 kDa, identifiée à l'HSP65 de mycobactéries (appelée GroEL dans le cas d'*E. coli*). L'administration d'HSP65 sans adjuvant prévient chez le rat l'induction de la maladie arthritique lors de réadministration ultérieure de la même protéine, cette fois-ci avec adjuvant. A nouveau, cette protection est relayée par des lymphocytes T spécifiques et transférable par ces cellules. Le mécanisme impliqué dans cette protection est encore inconnu; cependant l'induction de lymphocytes T de phénotype suppresseur est envisagée. Irun Cohen a également suggéré que la réponse immune spécifique d'un antigène de 65 kDa de type HSP serait responsable du diabète insulino-dépendant des souris de souche NOD (*non obese diabetic*) [33], mais cette hypothèse reste fort controversée.

Chez l'homme, l'hypothèse que l'HSP65 joue un rôle dans la pathogénie de l'arthrite rhumatoïde repose sur la mise en évidence d'une proportion très supérieure de cellules T spécifiques de cette protéine dans le liquide synovial par rapport au sang périphérique. La capacité de ces clones T d'induire ou de supprimer la maladie n'a pas été déterminée. Étant donné la reconnaissance privilégiée des HSP par les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , il y a lieu de souligner que, parmi cinq clones T isolés des synoviales de différents patients, un seul avait le phénotype CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> avec un récepteur  $\alpha\beta$ , alors que les quatre autres (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>) exprimaient effectivement un récepteur  $\gamma\delta$ .

Dans le cas du lupus érythémateux disséminé, des anticorps dirigés contre l'HSP90, l'HSP70 et surtout l'ubiquitine ont été mis en évidence. Les anticorps anti-ubiquitine apparaissent souvent avant les anticorps anti-

ADN et fluctuent au cours de la maladie ; ils pourraient constituer des marqueurs précoces des poussées lupiques [34]. Il reste à définir si, dans ce type de maladie, les HSP sont des antigènes pathogènes : la production d'auto-anticorps anti-HSP pourrait aussi provenir d'une immunité croisée résultant d'un processus de mimétisme moléculaire entre les HSP et d'autres auto-antigènes exprimés dans l'organe cible. Cependant, un tel mécanisme de mimétisme ne peut être envisagé pour l'ubiquitine, puisque cette protéine est absente des bactéries ou des virus. Dans ce cas, la mort cellulaire et la libération d'éléments intracellulaires ubiquitinylés pourraient rendre compte de l'induction d'anticorps anti-ubiquitine.

Différentes questions concernant le rôle des HSP dans la réponse immune restent ouvertes. Dans quelles conditions les HSP interviennent-elles dans la présentation de l'antigène ? Les HSP sont-elles les antigènes spécifiques des cellules T  $\gamma\delta$  ? Comment des protéines exprimées de façon constitutive dans tous les types cellulaires peuvent-elles devenir les cibles d'une pathogenèse restreinte à un organe ? Il est possible que la contribution des HSP dans les maladies auto-immunes ne réside pas dans leur immunogénicité mais plutôt dans leur rôle au cours de l'apprêtement et de la présentation de l'antigène. Une certitude cependant : l'immunogénicité des HSP représente un intérêt thérapeutique non négligeable, aussi bien pour la vaccination que pour le traitement des cancers ■

### Remerciements

Nous adressons nos sincères remerciements au Dr F. Russo-Marie (Inserm U322, ICGM, Paris) pour ses conseils et son aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Les travaux mentionnés ont été rendus possibles, entre autres, grâce au soutien du Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

## Summary

### Stress proteins : self, non-self and the immune response

The induced expression of the heat shock gene family is a universal response to cellular stresses such as elevated temperature or oxidative injury. The constitutive expression and evolutionarily conserved nature of heat shock proteins (HSP) suggest that they also play essential roles during normal cellular functions. The expression of HSP in both prokaryotic and eukaryotic cells and their conserved structure is relevant to HSP-specific T cell activation and provides a link between the immune response to infection (immune surveillance, the immune response to non-self) and auto-immunity (cross-reactivity to self-HSP). HSP are potent immunogens for both cytotoxic and helper T cells and promote the activation of  $\gamma\delta$  T cells. These latter cells localize within the epithelia, where encounter between host and pathogens first occurs, and may thus play a role in early immune defences. The intervention of HSP as potential protectors (of host cells [self] or alternatively, of pathogens [non-self]) is suggested by their functions in protein-protein interactions. This « molecular chaperoning » prevents aggregation of denatured proteins and misassembly of nascent peptides and contributes to molecular transport and translocation across cellular membranes. HSP may also « chaperone » antigens and thus participate in antigen processing and presentation.

### TIRÉS A PART

B.S. Polla.