



**HAL**  
open science

# Implication de deux protéines de choc thermique humaines HSP70 et HSP22 dans les voies de la réparation de l'ADN : approche structurale et fonctionnelle

Wendy Rénier

► **To cite this version:**

Wendy Rénier. Implication de deux protéines de choc thermique humaines HSP70 et HSP22 dans les voies de la réparation de l'ADN : approche structurale et fonctionnelle. Ingénierie biomédicale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00109542

**HAL Id: tel-00109542**

**<https://theses.hal.science/tel-00109542>**

Submitted on 24 Oct 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ GRENOBLE 1 - JOSEPH FOURIER**

**U.F.R. de Médecine**

**Doctorat**

**Discipline : Génie Biologique et médical  
Option Biotechnologies**

**Wendy RÉNIER**

---

---

**Implication de deux protéines de choc thermique  
humaines HSP70 et HSP22 dans les voies de la  
réparation de l'ADN : approche structurale et  
fonctionnelle**

---

---

Thèse soutenue le 03 octobre 2006

Laboratoires d'accueil :  
**ESRF Macromolecular Crystallography laboratory et INSERM U647**

Composition du jury :

**Pr. Emmanuel DROUET, UJF, Grenoble**

**Pr. Alain FAVIER, UJF, CEA, Grenoble**

**Pr. Alain CROISY, INSERM U759, Paris**

**Pr. Claire RODRIGUEZ-LAFRASSE, UCB, Lyon**

**Dr. Sean MC SWEENEY, ESRF, Grenoble**

**Pr. Åke KVICK, ESRF, Grenoble**

**Président**

**Examineur**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Directeur de thèse**

**Tuteur**

# Plan

Remerciements

Avant propos

Liste des figures et des tableaux

Liste des abréviations

## Chapitre I

<u>I- Introduction : les voies de la réparation de l'ADN</u>	p 1
I.1- L'ADN	
I.1.1- L'ADN : cible privilégiée	
I.1.2- Les mutations et les lésions de l'ADN	
I.2- Approche radiobiologique	
I.3- Les systèmes de réparation de l'ADN	
I.4- La régulation du cycle cellulaire	
I.5- Les morts cellulaires	
I.6- Les mécanismes de la cancérisation	

## Chapitre II

<u>II.1- Synthèse bibliographique: les HSP, étude structurale</u>	p 25
II.1.1- Introduction sur les Heat Shock Proteins (HSP)	
II.1.2- La fonction chaperonne des protéines HSP	
II.1.3- Rappels portant sur la cristallographie des protéines	
<u>II.2- Matériels et méthodes: les HSP, étude structurale</u>	p 47
<u>II.3- Résultats : HSP, étude structurale</u>	p 53
II.3.1- Préparation à la cristallographie des protéines	
II.3.2- Prédiction de structures	
II.3.2.1- Prédiction de structures pour le domaine C-terminal de la protéine humaine HSP70-1	
II.3.2.2- Prédiction de structures pour la protéine humaine HSP22	
<u>II.4- Discussion et conclusion : les HSP, étude structurale</u>	p 71

## **Chapitre III**

<u>III.1- Synthèse bibliographique : les HSP, implication dans les voies de réparation de l'ADN</u>	p 73
III.1.1- Implication des HSP dans les voies de réparation	
III.1.2- Etude appliquée: le synchrotron de Grenoble (E.S.R.F.)	
<u>III.2- Matériels et méthodes : radiobiologie</u>	p 87
<u>III.3- Résultats: les HSP, implication dans les voies de la réparation de l'ADN</u>	p 100
III.3.1- Implication de HSP70 dans les voies de réparation de l'ADN	
III.3.2- Implication de HSP22 dans les voies de la réparation de l'ADN	
III.3.3- Résultats: synchrotron: impact radiobiologique de la méthode DEI	
III.3.4- Résultats: synchrotron: HSP70 et la « synchrotron PAT-Plat »	
<u>III.4- Discussion et conclusions – radiobiologie : implication dans les voies de la réparation de l'ADN</u>	p 158

## **Chapitre IV**

<u>IV- Conclusion, perspectives</u>	p 163
IV.1- Conclusion	
IV.2- Perspectives	

### Références

- 1- Articles scientifiques
  - 1.1- Les protéines de choc thermique
  - 1.2- Radiobiologie et cancérologie
  - 1.3- Cristallographie des protéines
  - 1.4- Synchrotron
- 2- Livres
- 3- Sites internet

### Annexes

- Annexe I – Mécanismes de la réparation de l'ADN
- Annexe II – Etude structurale
- Annexe III – Fonctionnement du synchrotron

### Liste des communications et liste des publications

### Résumé

Merci à toute l'équipe ESRF ID17, ESRF MX Group et INSERM U647 et tout particulièrement aux membres du jury et à : A. Bravin, J. Balosso, J. Baruchel, P. Coan, A. Croisy, J. Demongeot, E. Drouet, H. Elleaume, F. Estève, A. Favier, Å. Kvik, G. Leonard, S. Larsen, J.F. Lebas, G. Leduc, C. Messina Dos-Santos, S. McSweeney, M. Rénier, C. Rodriguez-Lafrasse, W. Thomlinson.

Merci à ma famille et à mes amis qui m'ont soutenue et aidée durant ces trois années et tout particulièrement à : Anthony, Bill, Caroline, Cédric, Garfield, Heathcliff, Lina, Maria-Ana, Mathieu, Nathalie, Paola, Patricia, Paul-Henri, Philippe, Thierry.

Merci à l'ESRF, à l'EDISCE et à l'UJF pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse.

## Avant propos

Ce travail de thèse répond à un double objectif:

- 1- Les protéines humaines HSP70 et HSP22 sont étudiées d'un point de vue structural.
- 2- L'implication dans les voies de réparation de l'ADN des protéines humaines inductibles par le stress HSP70 et HSP22 est étudiée après différents stress.

Tout au long de leur vie, les êtres vivants sont soumis au stress radiatif. L'ADN est l'une des cibles de cette irradiation continue. Au cours de l'évolution, de **nombreux mécanismes furent mis en place pour réparer l'ADN** et empêcher ainsi la cellule d'enclencher les étapes de mort cellulaire et de la cancérisation. Certains de ces mécanismes **sont détaillés dans le chapitre I.**

Les protéines de choc thermique, aussi appelées HSP (Heat Shock Proteins), sont connues pour jouer un rôle physiologique majeur. Ces protéines, variables en quantité et en variété, participent à de nombreux processus cellulaires destinés à faciliter la survie de la cellule et donc de l'organisme dans son intégrité. **Ces protéines HSP sont décrites dans le chapitre II.1.** C'est dans le but de mieux connaître ces protéines **HSP70-1 et HSP22 que l'étude structurale a été initiée.** Des rappels portant sur la cristallographie des protéines sont présentés au **chapitre II.1** et les méthodes utilisées sont indiquées au **chapitre II.2.** Les résultats obtenus lors des **essais de préparation à la cristallisation** réalisés sur HSP70-1 et HSP22 et les **prédictions de structure (secondaire et tertiaire)** sont exposés au **chapitre II.3.**

Il reste à savoir si les protéines HSP et plus particulièrement **HSP70 et HSP22** sont impliquées dans **les mécanismes de la réparation de l'ADN.** HSP70 et HSP22 ont été choisies pour cette étude par rapport à leur séquence en acides aminés. Des **études appliquées à la médecine** et impliquant les HSP furent menées ensuite dans le cadre notamment d'une méthode d'imagerie **Diffraction Enhanced Imaging (DEI)** permettant l'apport d'une information histologique précise développée sur la ligne biomédicale du **synchrotron ESRF**, et, dans le cadre d'une **nouvelle méthode de thérapie** pour le traitement des glioblastomes, expérimentée au même endroit. Cette partie fait l'objet du troisième chapitre (**III.1**). **Les méthodes employées** sont développées dans le **chapitre III.2.** Les **résultats obtenus** sur ce thème sont contenus dans le **chapitre III.3.**

Ce document de thèse est **conclu** et les **perspectives** sont énoncées au **chapitre IV.**

---

---

# **Involvement of two human heat shock HSP70 and HSP22 in DNA repair pathways: a structural and functional approach**

---

---

## **Foreword**

**This Ph.D. program contains a double objective:**

- 1- Human proteins HSP70 and HSP22 are studied by a structural approach.**
- 2- The involvement in DNA repair pathways of stress inducible human proteins HSP70 and HSP22 is studied after several cellular stresses.**

During their life span, living organisms are subjected to radiative stress. To survive and to assure specie survival, several mechanisms have been developed through evolution. DNA is one of the targets of this radiative stress. In the absence of **DNA repair pathways** DNA bond breaks or damage can lead to loss of genetic information and to cellular destruction. Some of these pathways **are discussed in chapter I.**

Heat Shock Proteins (HSP) are known to play a number of major physiological roles. **The HSP are described in chapter II.1.** In order to increase the knowledge of the proteins **HSP70-1** and **HSP22**, a structural study has been initiated. **A brief overview of protein crystallography** is presented in **chapter II.1** and the methods used are indicated in **chapter II.2**. The results obtained for **crystallization preparation trials** and **structural predictions (secondary and three-dimensional)** are presented in **chapter II.3.**

To demonstrate the role played by HSP, and by **HSP70** and **HSP22** in particular, in **DNA repair pathways. Medical applied studies** involving HSP have been followed, notably based on two novel techniques developed at the **ESRF** biomedical beam line ID17: a histological analysis imaging technique (**DEI**) and a therapy devoted to the cure of glioblastoma (**SSRT**). All this work is contained within chapter III (**III.1**). **The corresponding methods** are developed in **chapter III.2**. **The results** obtained experimentally are described in **chapter III.3.**

This thesis work is **discussed** and **concluded** in **chapter IV.**

## Liste des figures

- Figure 1) De l'ADN au chromosome – p 2
- Figure 2) Le cycle cellulaire (cytométrie en flux) – p 2
- Figure 3) Exemple d'une mutation silencieuse – p 4
- Figure 4) Les remaniements chromosomiques au cours de la méiose : formation d'aberrations chromosomiques – p 4
- Figure 5) Différents types de lésion de l'ADN – p 4
- Figure 6) La radiolyse de l'eau – p 8
- Figure 7) Les systèmes de réparation : NER et BER – p 8
- Figure 8) Les différentes étapes de la recombinaison homologe – p 8
- Figure 9) Les systèmes de réparation : recombinaison homologe et suture – p 10
- Figure 10) Les mécanismes d'hyper recombinaison V(D)J se font avec les mêmes protéines que pour la suture – p 10
- Figure 11) Modèle vertical proposé pour schématiser la réparation de l'ADN – p 16
- Figure 12) Mort cellulaire ou réparation ? – p 16
- Figure 13) Importance de l'ATP dans la mort cellulaire – p 18
- Figure 14) Morts cellulaires, morphologies – p 18
- Figure 15) Schéma simplifié de l'apoptose (localisation : mitochondrie) – p 22
- Figure 16) Caryotype d'une tumeur du colon (Homme) : exemple d'aneuploïdie – p 22
- Figure 17) Contenu en ADN d'une tumeur de l'oesophage (Homme) : exemple d'aneuploïdie – p 22
- Figure 18) Le stress permet la transcription des Heat Shock Proteins – p 26
- Figure 19) Structure (résolue en 1997 par cristallographie par rayons X) de HSP90 associée à la geldanamycine (son inhibiteur) – p 26
- Figure 20) Structures de HSP – p 32
- Figure 21) Fonction des Heat Shock Proteins dans la synthèse protéique – p 36
- Figure 22) Structures secondaires – p 40
- Figure 23) Motif  $\alpha/\beta$ , structure de HSP90, *Homo sapiens sapiens*, (Stebbins C et al, 1997) – p 40
- Figure 24) Exemple de diagramme de solubilité – p 42
- Figure 25) Cristallisation par méthode de diffusion de vapeur – p 42
- Figure 26) Données de diffraction d'une protéine – p 42
- Figure 27) Exemple d'une ligne de lumière du Mocrromolecular Crystallography Group : ID29 (dirigée par Dr Leonard G.) – p 50
- Figure 28) Le "sample changer" – p 50
- Figure 29) Tests d'expression (une nuit à 20°C avec l'IPTG) – p 54
- Figure 30) Tests de solubilité (test de deux concentrations de NaCl: 200 et 500 mM) – p 54
- Figure 31) Tests de purification (sur colonne GSTrap FF (Amersham Pharmacia)) – p 56
- Figure 32) Profil d'élution correspondant – p 56
- Figure 33) Tests de clivage du tag GST à l'aide de la protéase thrombine (gel de protéine classique) – p 57
- Figure 34) Tests de clivage du tag GST à l'aide de la protéase thrombine (Western Blot avec anticorps anti-HSP70-1) – p 57
- Figure 35) Tests de clivage du tag GST à l'aide de la protéase thrombine (anti-GST) – p 58
- Figure 36) Tests de clivage du tag GST à l'aide de la protéase thrombine – p 58
- Figure 37) Tests de PCR avec le plasmide pGex contenant l'insert HSP70-1 – p 60
- Figure 38) Tests de PCR avec l'ADN génomique en vue d'obtenir l'insert HSP22 (test de différentes conditions et de différentes enzymes) – p 60
- Figure 39) Ligation des deux inserts (HSP70-1 et HSP22) ainsi obtenus dans le plasmide pRSET-A – p 60
- Figure 40) Positionnement des SQ/TQ sur le domaine ATPasique (HSP70) - p 62
- Figure 41) Prédiction de repliement (structure secondaire) du domaine C-terminal de HSP70-1 (résidus 383 à 641) – p 62
- Figure 42) Prédiction de repliement secondaire du domaine C-terminal de HSP70-1 (résidus 383 à 641) – p 64



- Figure 43) Prédiction de structure tertiaire du domaine C-terminal de HSP70-1 (résidus 383 à 641) : alignement DnaK, *E.coli* et C-terminal HSP70-1 – p 65
- Figure 44) Prédiction pour la structure tertiaire du domaine C-terminal de HSP70-1 – p 65
- Figure 45) Prédiction de structure secondaire pour HSP22 – p 66
- Figure 46) Prédiction de structure secondaire pour le domaine  $\alpha$ -cristallin (protéine HSP22, résidus 90 à 170) – p 66
- Figure 47) Prédiction de structure tertiaire pour HSP22 et positionnements probables des mutations provoquant des dystrophies motrices – p 67
- Figure 48) Arbre phylogénétique, méthode PHILIP, basé sur sHSP – p 67
- Figure 49) Superposition des structures des sHSP provenant de *T. saginata* et *M. jannaschii* – p 70
- Figure 50) Schéma représentatif de l'imagerie par méthode DEI – p 80
- Figure 51) Exemple d'image obtenue par DEI – p 80
- Figure 52) Molécule de cis-platine (cDDP ; cis-diamino-dichloro-platinum) – p 84
- Figure 53) Géométrie de l'irradiation de la tumeur – Cerveau de rat – p 84
- Figure 54) Schéma représentatif de la « synchrotron PAT-Plat » - p 84
- Figure 55) Survie cellulaire : cellules adhérentes – p 86
- Figure 56) Survie cellulaire : cellules en suspension – p 86
- Figure 57) Principe de l'immunoprécipitation – p 92
- Figure 58) Principe du « Western Blot » - p 92
- Figure 59) Principe de l'immunofluorescence et phénomène de « bleed through » - p 96
- Figure 60) Dispositif en plexiglas utilisé pour l'irradiation des cellules avec la source de rayons X conventionnelle p 98
- Figure 61) Irradiation des cellules: procédure utilisée sur ID17 – p 98
- Figure 62) Expression de HSP70 dans différentes tumeurs – p 100
- Figure 63) Expression de HSP70 stress inductible dans la lignée contrôle 1BR3Neo après irradiation X, influence du temps de réparation – p 100
- Figure 64) Expression de HSP70 stress inductible dans la lignée contrôle 1BR3Neo après irradiation X, influence de la dose – p 100
- Figure 65) Expression de HSP70 stress inductible dans la lignée ATM-/- après irradiation X (30 Gy) – p 102
- Figure 66) Expression de HSP70 stress inductible dans la lignée contrôle 1BR3Neo après irradiation par UV (20 J/m<sup>2</sup>) – p 102
- Figure 67) Test de différentes lignées humaines mutées pour les protéines de réparation de l'ADN – p 104
- Figure 68) La navette nucléaire de HSP70 stress inductible après rayons X – p 104
- Figure 69) La navette nucléaire de HSP70 stress inductible dans des cellules 1BR3 après rayons X (2Gy) – p 106
- Figure 70) La navette nucléaire de HSP70 après UV – p 106
- Figure 71) Expression  $\gamma$ -HSP70-1<sup>Ser254</sup> dans la lignée contrôle 1BR3Neo après irradiation par rayons X (30 Gy) - p 108
- Figure 72) Localisation de  $\gamma$ -HSP70-1<sup>Ser254</sup> dans le témoin 1BR3Neo après irradiation X (10Gy) p108
- Figure 73) ATM phosphoryle HSP72 p108
- Figure 74) Expression de HSP70 dans la lignée 1BR3Neo (contrôle) après irradiation (rayons X ou UV), impact de la wortmannine – p 110
- Figure 75) Expression de HSP70 dans la lignée AT5BIVA (ATM-/-) après irradiation (rayons X), impact de la wortmannine – p 110
- Figure 76) Interaction entre les protéines: immunoprécipitation de HSP70 avec BRCA1 après irradiation par rayons X – p 112
- Figure 77) Immunoprécipitation de HSP70 avec Rad51 dans des extraits nucléaires 1BR3Neo soumis aux rayons X (30Gy) – p 112
- Figure 78) Mutants HSP70 – p 114
- Figure 79) Niveaux d'expression des différents mutants HSP70 - p 114
- Figure 80) Survie à 2 Gy des différents mutants HSP70 – p 115
- Figure 81) Localisation de HSP70 chez les mutants HSP70 – p 115
- Figure 82) Phosphorylation de c-Jun (après 10Gy) pour les différents mutants HSP70 (images) – p 116
- Figure 83) Phosphorylation de c-Jun (après 10Gy) chez les mutants HSP70 (graphique)- p 118

Figure 84) Cycles cellulaires pour les différents mutants après irradiation (10Gy) – p 118  
Figure 85) Phosphorylation de CHK1 (après 10Gy) pour les différents mutants HSP70 (images) – p 119  
Figure 86) Phosphorylation de CHK1 chez les différents mutants HSP70-1 après irradiation (10 Gy) (graphique) – p 119  
Figure 87) Exemple de foci de BRCA1 dans la lignée témoin 1BR3Neo, 4heures après une irradiation de 10 Gy – p 120  
Figure 88) Phosphorylation de BRCA1 chez les mutants HSP70 – p 120  
Figure 89) Phosphorylation de H2Ax après 24 heures après une irradiation de 2 Gy (témoin 1BR3 et mutant siRNA-HSP70) – p 122  
Figure 90)  $\gamma$ H2Ax après 2 Gy et 24 heures (cellules 1BR3-siRNA HSP70), courbes de réparation – p 122  
Figure 91) Expression de HSP22 après irradiation par rayons X (15 Gy) – p 124  
Figure 92) Expression de HSP22 après traitement au cis-platine – p 124  
Figure 93) Localisation de HSP22 après rayons X (2Gy) (images) – p 126  
Figure 94) Localisation de HSP22 après rayons X (2Gy) (graphique) – p 127  
Figure 95) Effets de différentes doses de rayons X sur la localisation de HSP22 (1BR3, 4H) – p 128  
Figure 96) Localisation de HSP22 après UV (20J/m<sup>2</sup>) (images) – p 129  
Figure 97) Localisation de HSP22 après UV (20J/m<sup>2</sup>) (graphique) – p 129  
Figure 98) Localisation de HSP22, 24heures après différents traitements (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (100 $\mu$ M) ou cis-platine (3 $\mu$ M ou 30 $\mu$ M)) – p 130  
Figure 99) Comportement de HSP22 après 15Gy – p 130  
Figure 100) Nombre de foci HSP22 par cellule 1BR3 après irradiation de 2 Gy, en fonction du nombre de passages subis par les cellules – p 131  
Figure 101) Nombre de foci HSP22 par cellule 1BR3 après irradiation de 2 ou 15 Gy (passage=23) – p 132  
Figure 102) Données morphologiques (lymphocytes mutants HSP22) – p 134  
Figure 103) Courbes de survie à 2Gy (lymphocytes mutants HSP22) – p 134  
Figure 104) Cytométrie en flux: lymphocytes mutants HSP22 – p 135  
Figure 105) Localisation de HSP22 chez les lymphocytes mutants HSP22 après irradiation – p 136  
Figure 106) HSP22 et  $\gamma$ -H2Ax à 24 heures après 2Gy – p 138  
Figure 107) Colocalisation avec HSP22 après 2Gy en présence ou non de cDDP (30 $\mu$ M) – p 138  
Figure 108) Colocalisation de MRE11 et de HSP22 dans des cellules 1BR3 après irradiation (2Gy) (images) – p 140  
Figure 109) Colocalisation de MRE11 et de HSP22 dans des cellules 1BR3 après irradiation (2Gy) (graphique) – p 140  
Figure 110) Comportement de HSP22 dans des cellules 1BR3 après rayons X (2Gy) sans (images du haut) ou avec cis-platine (images du bas) – p 142  
Figure 111) Comportement de HSP22 dans des cellules 1BR3 après rayons X (2Gy) avec ou sans cis-platine – p 142  
Figure 112) Comportement de HSP22 après 15Gy dans des cellules de gliome de rat F98 – p 144  
Figure 113) Localisation de HSP22 après 24 heures après irradiation (2 ou 15 Gy) dans des cellules de gliome de rat F98 – p 144  
Figure 114) Effets de l'âge sur l'intensité du marquage de HSP22 dans des cellules primaires (chondrocytes, provenance : hanche) – p 146  
Figure 115) Effets de l'âge sur l'intensité et sur la localisation du marquage HSP22 dans des cellules primaires (chondrocytes, provenance : hanche et fibroblastes 1BR3, provenance : peau) – p 146  
Figure 116) Colocalisation de HSP22 et HSP70 après rayons X (2Gy) – p 147  
Figure 117) Interaction entre les protéines: immunoprécipitation de HSP70 (extraits *cytoplasmiques* de 1BR3Neo) après irradiation par rayons X (30 Gy) ou UV (20 J/m<sup>2</sup>) – p 147  
Figure 118) Images de chondrocytes après irradiation en mode DEI (expérience d'immunofluorescence) – p 148  
Figure 119) Images de fibroblastes de peau 1BR3 après irradiation en mode DEI – p 148  
Figure 120) Histogramme représentant le nombre de foci  $\gamma$ H2Ax par chondrocyte après une irradiation en mode DEI (N=34 cellules par condition) – p 150

- Figure 121) Histogramme représentant le nombre de foci  $\gamma$ H2Ax par fibroblaste après une irradiation en mode DEI (N=34 cellules par condition) – p 150
- Figure 122) Chondrocytes, morphologies anormales après irradiation en mode DEI (temps de réparation égal à 24 heures) – p 152
- Figure 123) Fibroblastes, morphologies anormales après irradiation en mode DEI (temps de réparation égal à 24 heures) – p 152
- Figure 124) Observation des cellules à plus faible grossissement – p 152
- Figure 125) Images de chondrocytes après irradiation en mode DEI (HSP70) – p 153
- Figure 126) Images de fibroblastes après irradiation en mode DEI (HSP70) – p 153
- Figure 127) Effet du cis-platine seul sur la localisation de HSP22 et de HSP70 - p154
- Figure 128) Comparaison entre l'effet de l'irradiation X seule (2Gy) et de l'effet de la combinaison irradiation X (2Gy) + cis-platine (30 $\mu$ M) sur la localisation de HSP70 (images) – p 154
- Figure 129) Comparaison entre l'effet de l'irradiation X seule (2Gy) et de l'effet de la combinaison irradiation X (2Gy) + cis-platine (30 $\mu$ M) sur la localisation de HSP70 (graphique) – p 156
- Figure 130) Résultats obtenus pour le test HSP70-PAT-Plat sur des cellules de rat F98 : impact d'une drogue, la wortmannine – p 156
- Figure 131) Modèle proposé pour la phosphorylation de HSP70 après stress – p 158
- Figure 132) Modèle proposé pour la phosphorylation de HSP22 après irradiation par rayonnement X – p 158
- Figure 133) Proposition de positionnement pour HSP22 et HSP70 dans la réparation de l'ADN (modèle vertical) – p 158.

## Liste des tableaux

- Tableau 1) Différentes lésions de l'ADN et mode de réparation correspondant – p 6
- Tableau 2) Indications concernant différents dommages de l'ADN – p 6
- Tableau 3) Les quatre principaux types de cancers – p 23
- Tableau 4) Surexpression des HSP – p 25
- Tableau 5) Différents aspects de quelques protéines HSP parmi les plus étudiées – p 28
- Tableau 6) Récapitulatif des HSP70 étudiées au cours de cette thèse – p 31
- Tableau 7) Exemple d'un essai de purification de la protéine HSP70-1 – p 59
- Tableau 8) Exemple d'un essai de concentration de la protéine HSP70-1 – p 59
- Tableau 9) Les mutations de HSP70 et les maladies – p 77
- Tableau 10) Quelques fluorochromes – p 96
- Tableau 11) Concentrations de demi inhibition pour la wortmannine – p 109
- Tableau 12) Résumé du comportement de la protéine HSP70 après stress – p 109
- Tableau 13) Récapitulatif des interactions de HSP70 avec les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN après stress – p 111
- Tableau 14) Expression de HSP22 après différents stress (résultats obtenus par Western blots) – p 124
- Tableau 15) Nombre de foci HSP22 par cellule 1BR3 après irradiation de 2 ou 15 Gy – p 132
- Tableau 16) Colocalisation de HSP22 et d'enzymes de réparation de l'ADN ( $\gamma$ DNA-PK et MRE11); preuve de la phosphorylation de HSP22 sur son site SQ (résultats obtenus par immunofluorescence) – p 139
- Tableau 17) Nombre de foci HSP22 dans des cellules 1BR3 après rayons X (2Gy) avec ou sans cis-platine – p 141
- Tableau 18) Nombre moyen de foci  $\gamma$ H2Ax par cellule – p 149.

## Liste des abréviations

\*: explicité en annexe

**Ac**: Anticorps

**ADN**: acide désoxyribonucléique

**ADP**: Adénosine Di-Phosphate

**Ag**: Antigène

**AIF**: apoptose inducing factor

**Apaf**: apoptosis protease activating factor

**ARNm**: acide ribonucléique messenger

**ARNr**: acide ribonucléique ribosomique

**ARNt**: acide ribonucléique de transfert

**ATM**: Ataxia telangiectasia Mutated protein

**ATP**: Adénosine Tri-Phosphate

**ATR**: Ataxia telangiectasia Related protein

**Bag1**: combined Bcl-2 anathogene

**BCR**: Récepteur de lymphocyte B

**BER**: Base Excision repair

**BRCA1/2**: BReast CAncer type1/2 susceptibility protein

**c-Abl**: proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL1

**cDDP**: cis-diamino di-chloro platinum (cis-platine)

**Chk1/2**: Check point kinase 1/2

**c-Jun**: proto-oncogene c-jun (Activator Protein 1)

**CMT**: maladie de Charcot-Marie-Tooth

**CRSSA**: Centre de Recherche du Service de Santé des Armées

**CT**: Computed Tomography

**cvHSP**: cardiovascular HSP

**DEI**: Diffraction Enhanced Imaging

**DMEM**: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DNA-PK**: DNA-dependent Protein Kinase

**DTT**: dithiothreitol

**EBR**: Efficacité Biologique Relative

**EMBL**: European Molecular Biology Laboratory

**ESRF**: European Synchrotron Radiation Facility

**FasL**: Fas Ligand

**FGF-2**: Fibroblast Growth Factor 2

**GrpE**: glucose regulated protein

**GSH**: Glutathion (forme réduite)

**GST**: Glutathion S Transférase

**GTP**: Guanosine Tri-Phosphate

**Gy**: Gray , unité de dose (où un Gray équivaut à un joule par kilogramme 1Gy=1J/kg)

**H2Ax**: histone H2Ax

**γH2Ax**: phospho-histone H2Ax

**HIP**: HCS70 interacting protein

**H Rec**: recombinaison homologue

**HSC70**: Heat Shock Cognate protein 70

**HSE**: Heat Shock Element

**HSF**: Heat Shock Factor

**HSP**: Heat Shock Protein(s)

**HSP70(+)**: mutant de surexpression du gène HSP70-1 entier

**HSP70(Cla1)**: mutant de surexpression du gène HSP70-1 tronqué par l'enzyme de restriction Cla1

**ID**: Insertion Divice

**Ig**: Immunoglobuline

**IP**: ImmunoPrécipitation

**IRM**: Imagerie par Résonance Magnétique

**K141N/E**: mutation faux sens de la protéine HSP22 (remplacement de la lysine K par une asparagine N ou par un acide glutamique E)  
**kDa**: kilo Dalton (où un Dalton équivaut à 1 Da = 1 g/mol)  
**kpbs**: kilo paires de bases  
**LB**: Luria Broth medium (milieu de culture pour les bactéries *E.coli*)  
**MAD**: multiple wavelength anomalous dispersion  
**MAP Kinase**: Mitogen Activated Protein Kinase  
**MAPKAP kinase-2**: Mitogen Activated Protein Kinase Activated kinase 2  
**MIR**: Multiple Isomorphous Replacement  
**MKBP**: myotonic dystrophy protein kinase binding protein  
**Mre11**: Meiotic recombinaison homolog 11  
**MRR**: MisMatch Repair  
**MRT**: Microbeam RadioTherapy  
**MX**: Macromolecular Crystallography  
**NER**: nucleotide excision repair  
**NHEJ**: Non Homologous End Joining  
**NI**: Non Irradié  
**PARP-1**: Poly(ADP-ribose)polymerase 1  
**PAT-Plat**: PhotoAcTivation-Platinum  
**PBS**: Phosphate Buffer Salt  
**PCR**: Polymerase Chain Reaction  
**PDB**: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>)  
**PE**: Plating Efficiency  
**PFA**: paraformaldéhyde  
**pH**: potentiel Hydrogène  
**pI**: point Isoélectrique  
**PI3kinase**: Phosphatidyl-inositol-3 kinase  
**PKC**: protéine kinase C  
**qsp**: quantité suffisante pour  
**R78M**: mutation faux sens de la protéine HSP22 (remplacement de l'arginine R par une méthionine M)  
**Rad51**: RecA homolog  
**RL**: radicaux libres ou **ROS**: Reactive Oxygen Species  
**RPMI**: Roswell Park Memorial Institute medium  
**SAD**: single wavelength anomalous diffraction  
**SDS-PAGE**: Sodium Dodecyl Sulfate Pulse Field Gel Electrophoresis  
**SIR**: Single Isomorphous Replacement  
**siRNA**: Small interfering RiboNucleic Acids  
**sHSP**: small Heat Shock Protein  
**SSRT**: Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy  
**Sv**: Sievert (unité de dose corrigée)  
**SVF**: Sérum de Veau Fœtal  
**TCR**: Récepteur de lymphocyte T  
**TEL**: Transfert d'énergie linéique  
**TEMED**: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine  
**TF**: Transformée de Fourier  
**TNF- $\alpha$** : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
**T<sub>M</sub>**: Melting Temperature  
**tr/min**: tours/minute  
**UV**: Ultra Violet  
**VEGF**: Vascular Endothelial Growth Factor  
**WB**: Western Blot  
**Wr**: facteur de pondération lié à la nature du rayonnement  
**Wt**: facteur de pondération lié à la nature du tissu traversé

## **I- Introduction : les voies de la réparation de l'ADN**

### **I.1- L'ADN**

Depuis l'origine de la vie il y a quelques 3,8 milliards d'années jusqu'à nos jours, les organismes vivants font face à un bombardement continu : particules et photons de toutes énergies. L'ADN se révèle être l'une des cibles de ce stress radiatif constant. En effet, les liaisons covalentes ou de plus faible énergie (ex : les liaisons hydrogènes) de l'ADN sont susceptibles d'être rompues ou endommagées, ce qui entraînerait, sans l'existence d'un moyen de réparation, la perte de l'information génétique et la destruction cellulaire. De nombreux mécanismes de défense se sont développés au cours de l'évolution. Certaines voies cellulaires mises en place pour réparer l'ADN et empêcher ainsi la cellule d'enclencher les étapes de mort cellulaire, pouvant le cas échéant induire la cancérisation, sont détaillées dans ce chapitre I. Les cassures double brin (DSB) se trouvent, dans les dégâts causés à l'ADN, parmi les plus dangereux pour la survie de la cellule et les plus longs à réparer. Ces cassures se réparent généralement par recombinaison homologue (H Rec ; Gatz SA et Wiesmuller L, 2006) ou par suture (NHEJ ; Morrison C *et al*, 1997 ; Lieber MR *et al*, 2004). Il existe d'autres types de dégâts comme les cassures simple brin (SSB) ou les dommages de base (BD) réparés par les voies de réparation correspondantes (H Rec ou BER ou NER).

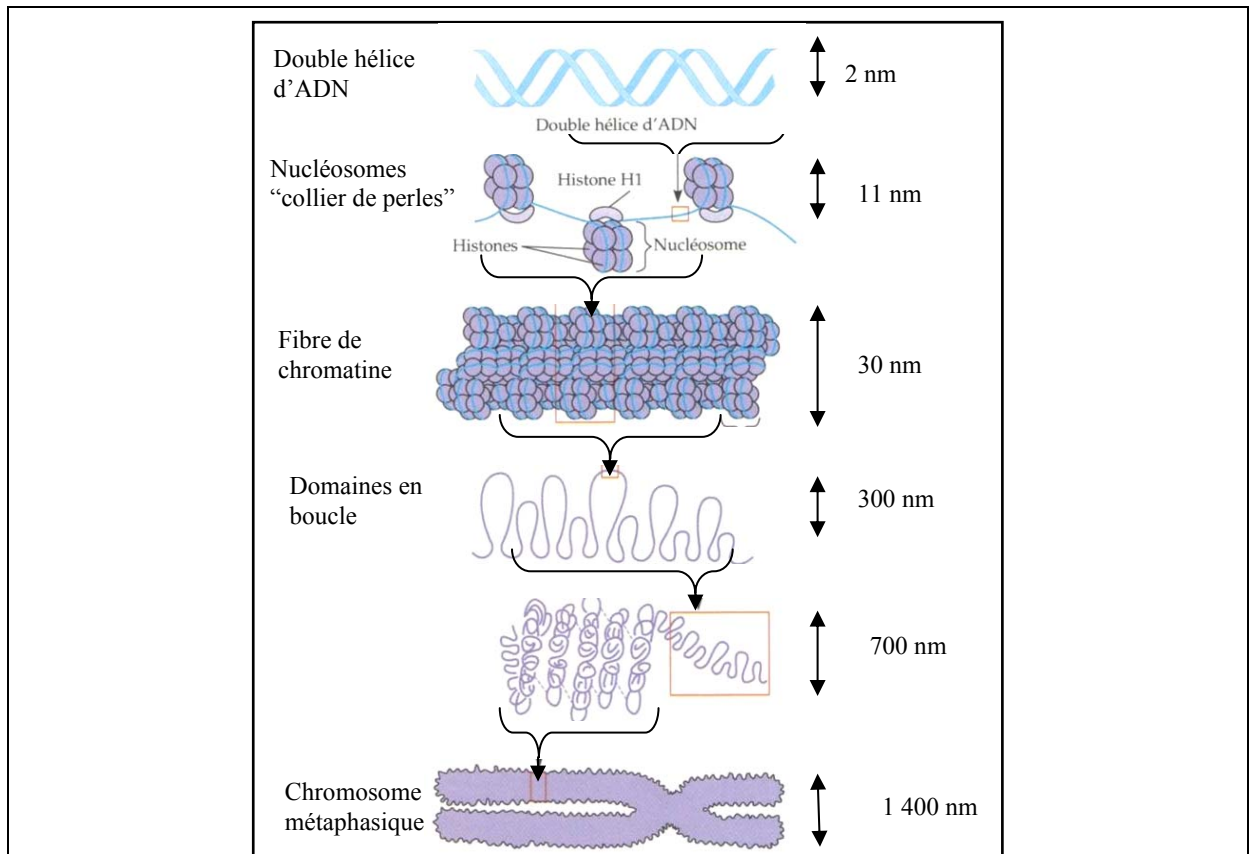
Ce chapitre décrit l'essentiel des connaissances concernant la réponse moléculaire et cellulaire aux irradiations X et UV, en se focalisant sur la gestion des dégâts causés sur l'ADN.

#### **I.1.1- L'ADN : cible privilégiée**

L'ADN de chaque cellule humaine diploïde est constitué de  $3 \cdot 10^9$  paires de bases. L'ADN humain totalise une longueur de 2 mètres et le noyau d'une cellule mesure environ 10  $\mu\text{m}$ . L'ADN s'organise structurellement en adoptant différents degrés de compactage.

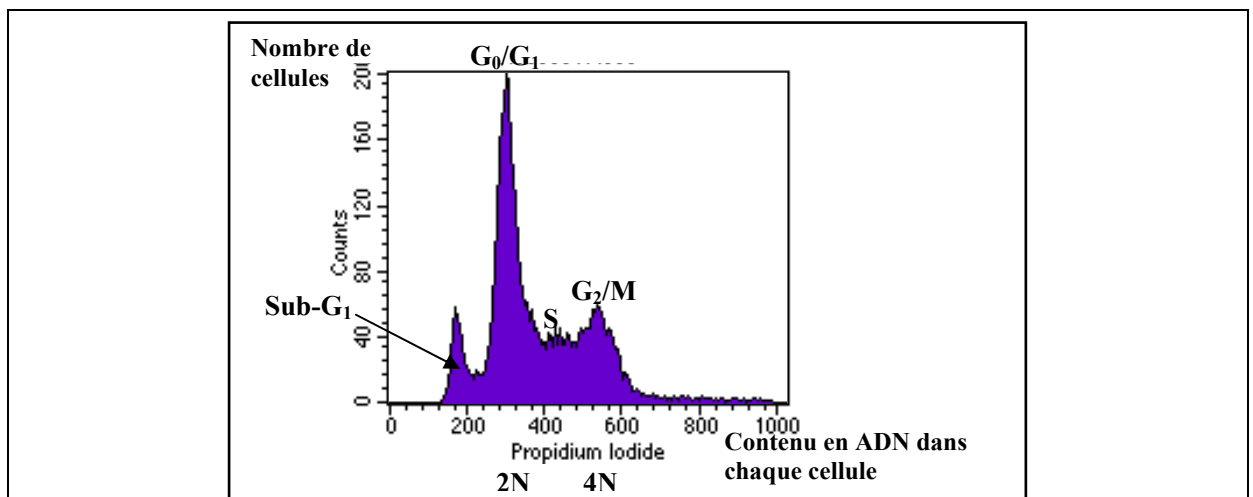
##### **I.1.1.1- Les différents degrés de compactage de l'ADN**

Le compactage de l'ADN est décrit comme étant la somme des différents états que peut prendre l'ADN (figure 1). Le premier degré de compactage est celui de la double hélice de J. Watson et F. Crick qui décrit l'ADN nu des cellules en phase de synthèse (phase S). En phase G<sub>1</sub>, l'ADN est sous forme de *chromatine* : la double hélice d'ADN est enroulée (1,65 tour) autour des nucléosomes (octamères d'histones composées de 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4). L'histone H1 joue un rôle de linker ou lieur. Ce stade est aussi nommé : *collier de perles*. Ensuite, la chromatine s'organise en fibre puis en boucle pour finalement former, à partir de la phase G<sub>2</sub> et pendant la mitose (phase M) : le *chromosome*. Le degré de compactage est essentiel à la réponse aux irradiations. En effet, moins de cassures radioinduites sont observées dans une chromatine plus condensée. Le niveau de compactage de l'ADN varie avec le cycle cellulaire (ou réplication cellulaire). Ainsi, l'effet biologique des irradiations dépend également du cycle cellulaire (à travers l'état de condensation/décondensation de l'ADN).



**Figure 1) De l'ADN au chromosome**

Les différents niveaux de compactage de l'ADN : autour du nucléosome (1,65 tour), chromatine puis chromosome.



**Figure 2) Le cycle cellulaire (cytométrie en flux)**

Distribution des phases du cycle cellulaire dans des fibroblastes humains transformés 1BR3Neo en phase exponentielle de croissance.

### **I.1.1.2- Le cycle cellulaire**

La réalisation du cycle cellulaire peut prendre un temps variable mais il dure en général vingt-quatre heures chez les Mammifères (dont l'Homme). Les cellules au repos sont dites quiescentes et sont en phase  $G_0$  (G pour gap ou growth). Le *cycle cellulaire\** humain est constitué de quatre phases successives (voir annexe I-a A):

- 1- L'interphase ou phase  $G_1$  (environ 15 heures mais peut varier de 90 minutes à plusieurs jours) pendant laquelle l'ADN est compacté sous forme de chromatine.
- 2- La phase S ou phase de synthèse (durée : environ 8 heures) pendant laquelle se fait la réplication de l'ADN.
- 3- La phase  $G_2$  (durée : de 3 à 4 heures) précède la phase M.
- 4- La phase M est aussi nommée *mitose* (durée : 30 minutes environ), qui est la phase durant laquelle une cellule mère donne naissance à deux cellules filles.

Les cellules quiescentes en  $G_0$  reçoivent l'ordre d'entrer en division et entrent en phase  $G_1$ . Au cours de la phase S, les cellules multiplient par deux leur matériel génétique en vue de la division : le matériel génétique passe alors de  $2N$  à  $4N$ . La phase  $G_2$  précède la phase M. La phase de mitose commence par la prophase, qui est la phase pendant laquelle les chromosomes s'apparient par paires. L'enveloppe du noyau se dissout et deux centrioles se positionnent aux deux extrémités de la cellule et projettent des microtubules vers le centre de la cellule, ce qui forme le fuseau mitotique. Vient ensuite la métaphase pendant laquelle les chromosomes appariés se placent (grâce aux microtubules) au centre de la cellule dans le plan équatorial. L'anaphase correspond à la séparation des chromosomes en deux chromatides soeurs au niveau des centromères. Cela se termine alors par la télophase durant laquelle les chromatides appariées migrent vers les pôles opposés de la cellule.

Finalement, la membrane se forme pour séparer les deux cellules filles ainsi obtenues et l'ADN (de nouveau en phase  $G_0$ ) peut se décondenser en chromatine. Le contenu en ADN des cellules peut être analysé par cytométrie en flux en utilisant comme marqueur l'iodure de propidium (agent intercalant des bases de l'ADN) (figure 2). La cytométrie en flux permet de connaître la proportion de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. Cette technique se révèle très utile pour évaluer les arrêts du cycle causés par un stress donné. Le sub- $G_1$  correspond à des corps apoptotiques avec un contenu en ADN inférieur à  $2N$ .

### **I.1.2- Les mutations et les lésions de l'ADN**

Les cellules vivantes ont à faire face aux stress constants qui sont potentiellement générateurs de mutations et qui peuvent aussi générer d'autres types de lésions d'ADN.

#### **I.1.2.1- Les mutations**

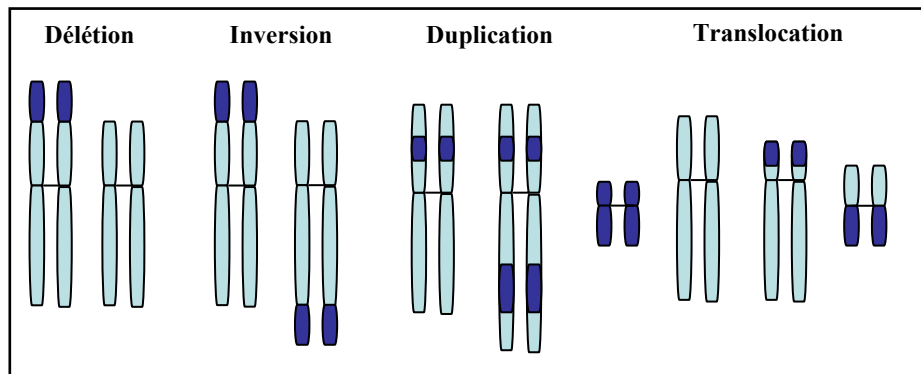
L'environnement de vie et plus particulièrement le stress sont la cause des mutations. Ainsi, par exemple, les UV sont connus pour générer des pontages de thymines. La division cellulaire aussi est fortement génératrice de mutations (surtout pendant la phase S). Le taux de mutation spontané pour un gène par division chez l'homme est de  $10^{-6}$ , sachant qu'il y a  $10^{16}$  divisions cellulaires au cours de la vie et donc  $10^{10}$  probabilités de mutations par gène.



5' ATG CCA AAA GGA GTG TGA 3'  
 Peptide A: Met Pro **Lys** Gly Val (Stop)  
 5' ATG CCA AAG GGA GTG TGA 3'  
 Peptide B: Met Pro **Lys** Gly Val (Stop)

**Figure 3) Exemple d'une mutation silencieuse**

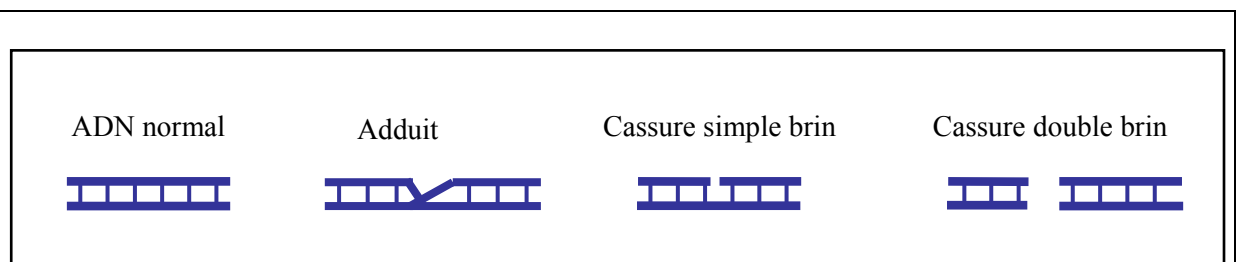
Mutation silencieuse à cause de la redondance du code génétique (les codons AAA et AAG sont traduits en lysine).



**Figure 4) Les remaniements chromosomiques au cours de la méiose : formation d'aberrations chromosomiques**

Nombreux remaniements chromosomiques (au cours de la méiose) :

- délétions (suppressions)
- inversions (renversements)
- duplications (additions)
- translocations de parties de chromosomes (un morceau d'un chromosome « a » va se retrouver sur un autre chromosome « b »).



**Figure 5) Différents types de lésion de l'ADN**

Schéma (non exhaustif) représentant quelques unes des lésions rencontrées sur l'ADN.

La fidélité de l'ADN polymérase est telle qu'elle n'occasionne qu'une seule erreur sur  $10^7$  bases répliquées, lors de la division cellulaire. Deux types de mutations sont distingués: la *mutation récessive* qui se traduit par une absence ou une réduction de fonction et la *mutation dominante* qui se traduit par une nouvelle fonction ou une interférence avec la fonction normale pour la protéine codée par le gène muté. Certaines mutations ne vont pas avoir d'effet. Elles sont alors appelées *mutations silencieuses*. Ceci est dû à la redondance du code génétique. Par exemple, en cas de mutation ponctuelle (remplacement d'une paire de base), le codon traduit peut être le même : la figure 3 représente l'exemple d'une mutation par substitution (remplacement d'un A par un G). Le peptide B est équivalent au peptide A et ce malgré la mutation. Il existe des types de mutations ponctuelles autres que les substitutions de bases telles que les additions de bases et les délétions de bases (ajout ou retrait d'une base). Ces remaniements de l'ADN peuvent générer des mutations entraînant des changements lors de la traduction en protéine : mutation faux-sens (ex : une leucine devient une valine), mutation terminaison de chaîne (ex : une glycine devient un codon stop), ou mutation frame-shift (qui va décaler le cadre de lecture). Les remaniements chromosomiques, qui sont des remaniements d'une plus vaste portion de gène, (figure 4) entraînent eux aussi des mutations (il peut y avoir des délétions d'une partie d'un chromosome ou des inversions ou des translocations ou des substitutions pendant l'appariement par chromosomes homologues durant la métaphase de la méiose). Dans le cas normal, les aberrations chromosomiques les plus graves ne sont pas transmises à la descendance et induisent une mort cellulaire rapide. A priori, seuls les dommages moins importants et moins dangereux pour la survie de l'organisme peuvent être transmis à la descendance.

Remarque : il existe d'autres types de mutations apportant plusieurs copies d'un même chromosome (ex : syndrome de Down). Ces mutations sont, elles aussi, dues à des défauts de méiose (cette division est génératrice de gamètes qui possèdent, par définition, N chromosome après méiose). Dans le cas de la méiose, les mutations produites peuvent potentiellement être transmises à la descendance et peuvent être dans certains cas synonymes d'évolution pour l'espèce. Parfois les mutations (par exemple : induites par le stress) produisent un effet désastreux, notamment lorsqu'elles affectent un gène contrôlant la prolifération cellulaire. Elles sont alors susceptibles d'induire un cancer. Heureusement la plupart de ces mutations sont évitées grâce aux systèmes de réparation de l'ADN, même s'il faut souligner le fait que le taux de réparation diminue sensiblement avec l'âge. C'est pourquoi, il existe de nombreux systèmes de réparation chez tous les êtres vivants. Chez l'Homme un niveau de complexité (des mécanismes de réparation) très élevé est atteint, avec notamment l'institution de voies de réparation transversales en cas de défaillance (par exemple une mutation) affectant une des protéines d'une autre voie de réparation (Karp G., 2004).

### **I.1.2.2- Les différents types biochimiques de dommages de l'ADN**

Il existe plusieurs types biochimiques de dommages de l'ADN connus : les dommages de base (par exemple les dimères de thymines causés par les UV ou les adduits causés par le cis-platine), les cassures simple brin de l'ADN (qui consistent en la rupture de la liaison phosphodiester) et les cassures double brin (les plus difficiles à réparer (voir tableau 1)) (Goodhead DT, 1989). En considérant la figure 5, les dommages situés les plus à droite du schéma correspondent aux dommages longs et difficiles à réparer mais aussi potentiellement dangereux pour la survie de la cellule, voire pour la survie de l'organisme entier. Alors que certaines drogues ou agents chimiques ne produisent qu'un seul type biochimique de lésion de l'ADN, les rayons X se distinguent par la production d'un large spectre de dommages. En

effet, cette diversité peut s'expliquer par la production pour les rayons X de microdépôts d'énergie distribués spatialement de façon aléatoire et différents par leur densité d'énergie. Les travaux du Pr DT Goodhead ont notamment mis en évidence qu'il fallait environ un dépôt de  $100 \text{ eV/nm}^3$  pour créer une cassure double brin.

Stress	Dégâts sur l'ADN	Systèmes de réparation majoritaires
UV	Dommages de base (BD)	BER ou NER
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Cassure simple brin (SSB)	H Rec ou BER
cis-platine	Adduits	H Rec ou NER
Rayons X	Cassure double brin (DSB), BD et SSB	NHEJ ou H REC

**Tableau 1) Différentes lésions de l'ADN et mode de réparation correspondant. À un stress génotoxique donné correspondent généralement un dommage d'ADN biochimique et spécifique et un système de réparation (Lindahl T et Wood RD, 1999).**

**BER: base excision repair (réparation par excision de base)**

**H Rec: homologous recombination (recombinaison homologue)**

**NHEJ: non homologous end joining (suture)**

A l'inverse, seul  $1 \text{ eV/nm}^3$  pourrait être responsable d'un dommage de base (tableau 2) (Goodhead DT, 1989 ; Frankenberg-Schwager M, 1989). Les rayons X produisent plus de petits que de gros microdépôts d'énergie. La fréquence des dommages de base, des cassures simple et double brin suit également cette tendance puisque sont comptabilisés, dans une cellule humaine, environ 10 000 dommages de base, 1 000 cassures simple brin et 40 cassures double brin par Gray (Goodhead DT, 1989 ; Nikjoo H *et al*, 1997). Plus le microdépôt qui a créé le dommage est dense et plus le dommage est long à réparer. Ceci suggère que le principe de la conservation de l'énergie pourrait s'appliquer à la radiobiologie. Néanmoins, ce sont les dommages radioinduits les plus rares qui sont les plus lents à réparer et les plus impliqués dans l'effet létal des radiations ionisantes (Foray N *et al*, 1998).

Dommage causé sur l'ADN	Dommage de base (BD)	Cassure simple brin (SSB)	Cassure double brin (DSB)
Energie nécessaire pour créer le dommage	1 à $10 \text{ eV/nm}^3$	10 à $100 \text{ eV/nm}^3$	+ de $100 \text{ eV/nm}^3$
Nombre de dommages par Gy	$10^3$ à $10^4$ BD/Gy	$10^3$ SSB/Gy	40 DSB/Gy
Temps de réparation pour la moitié des dommages	1 à 10 minutes	10 à 20 minutes	50 à 60 minutes

**Tableau 2) Indications concernant différents dommages de l'ADN. Tableau regroupant des éléments de radiobiologie (d'après Goodhead DT, 1989) et indiquant :**

- énergie nécessaire à la formation des lésions de l'ADN

- nombre de lésions par Gy ( $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule/kg}$ )

- temps de demi réparation pour certains types de lésions de l'ADN.

## I.2- Approche radiobiologique

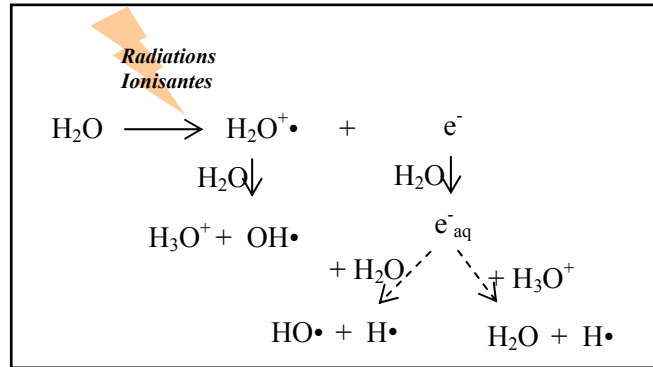
### I.2.1- Définition

La *radiobiologie* est une science née en 1895 avec la découverte du rayonnement X par un physicien Allemand, W.C. Röntgen. Cette science est basée sur l'étude des effets des rayonnements ionisants sur la matière vivante.

Tout rayonnement ionisant est défini comme étant capable d'ioniser la matière qu'il traverse. L'ionisation se traduit par la perte d'un électron. Si cet électron appartient à une liaison covalente, la liaison est rompue. Le rayonnement ionisant regroupe les rayons X, les rayons  $\gamma$  et les rayons UV. Ces trois types de rayonnements (UV et rayons X et  $\gamma$ ) possèdent des longueurs d'onde inférieures à celles du spectre du visible. La dose absorbée est exprimée en Joule/Kg = Gray (noté : « Gy »). L'unité corrigée est le Sievert (noté : « Sv »). Les rayonnements n'ont pas tous la même *efficacité biologique relative* (EBR), c'est-à-dire qu'ils ne vont pas présenter la même efficacité à produire un effet biologique ou pathologique précis. L'EBR est un paramètre complexe, variant avec chaque organe ; c'est pourquoi, dans la pratique, ce paramètre est souvent remplacé par deux paramètres plus simples. Ainsi, le Gray (ou le Sievert) peut être pondéré par un facteur qui est fonction de la nature du rayonnement utilisé :  $Wr$  et par un facteur qui est fonction du type tissulaire traversé :  $Wt$ . Les rayonnements cèdent plus ou moins d'énergie le long de leur parcours. Deux groupes de particules sont distingués : les particules à faible TEL (transfert d'énergie linéique) et les particules à haut TEL. Les particules ayant un faible TEL sont les électrons et les photons, elles ont un  $Wr$  égal à 1. Celles qui ont un haut TEL (dont les neutrons) présentent un  $Wr$  5 à 20 fois supérieur à celui des photons. Le  $Wt$  de l'organisme entier est égal à 1 et ce sont les gonades qui présentent le  $Wt$  le plus important (0,20). Le facteur de pondération tissulaire  $Wt$  traduit l'idée de *radiosensibilité* (sensibilité à l'irradiation) par organe (Galle P et Paulin R, pour le livre « Biophysique : radiobiologie, radiopathologie », éditions Masson, 2000). Les effets des radiations ionisantes sur la matière vivante peuvent être approchés de deux façons différentes : d'un point de vue physique ou d'un point de vue chimique. De plus, deux types d'effets sont définis: l'effet direct et l'effet indirect.

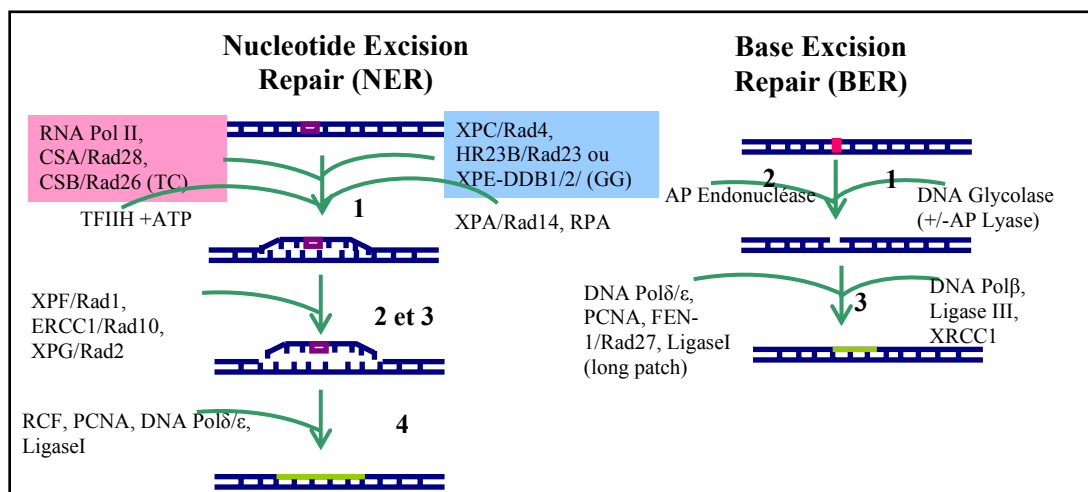
**L'effet direct**, qui a lieu immédiatement après l'irradiation, est défini par les physiciens comme étant l'effet minoritaire puisqu'il ne concernerait que 15 à 20% des lésions radioinduites. Il résulterait de l'interaction directe d'un électron mis en mouvement dans la matière avec la molécule d'ADN et plus particulièrement dans la structure de la double hélice. Le rayonnement correspond à un dépôt d'énergie au niveau de la chaîne d'ADN et entraîne une cassure. Cette rupture peut se faire sur un brin ou bien sur les deux brins. Ce dernier cas est nommé *rupture homologue* si les deux brins présentent des cassures qui sont face à face, et il est nommé *rupture hétérologue* si sur le premier brin la cassure s'est faite en un certain endroit alors qu'elle a eu lieu en un autre endroit sur le second brin.

**L'effet indirect**, toujours selon les physiciens, qui concernerait donc tout le reste des lésions radioinduites, soit de 80 à 85% du total, serait, quant à lui, dû à l'action des produits résultants de la radiolyse de l'eau cellulaire. Ce qui implique que, d'un point de vue chimique cette fois-ci, les lésions radioinduites sont générées par le stress oxydatif. Ceci explique, en effet, pourquoi l'effet indirect se produit en différé. Le principal effet de l'irradiation serait donc la radiolyse de l'eau, ainsi des radicaux libres (RL) seraient obtenus: principalement  $\text{OH}\bullet$  (oxydant) et  $\text{H}\bullet$  (réducteur) (figure 6). Les radicaux libres peuvent former d'autres molécules réactives (ex :  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou non réactives (ex :  $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{H}_2$ ). Le radical  $\text{H}\bullet$  présente un noyau et un électron en périphérie non apparié, il se recombine et donne de l'hydrogène ( $\text{H}_2$ ). Le radical  $\text{OH}\bullet$  se recombine avec lui-même pour donner  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



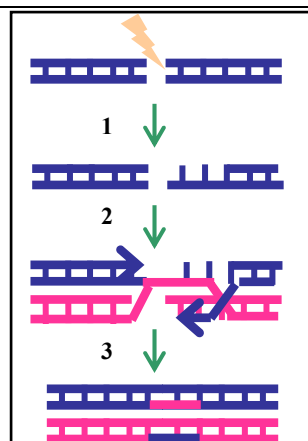
**Figure 6) La radiolyse de l'eau**

Les radiations ionisantes produisent, dans l'eau contenue par la cellule, toute une série de radicaux libres qui induisent des dommages sur l'ADN.



**Figure 7) Les systèmes de réparation : NER et BER**

Les étapes successives de deux voies de réparation (le NER et le BER) sont représentées ci-dessus.



**Figure 8) Les différentes étapes de la recombinaison homologue**

Ce schéma décrit les différentes étapes de la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue :

- 1) Reconnaissance des lésions
- 2) Recherche d'homologie
- 3) Synthèse de brin complémentaire.

Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  est un oxydant très efficace et il est connu pour être très toxique pour l'ADN. L'action des radiations sur la radiolyse va varier en fonction du TEL et de la présence d'oxygène. En absence d' $O_2$ , en cas de TEL faible,  $H_2O$  se recombine et  $H_2O_2$  est produite en faible quantité. En cas de haut TEL, la quantité de  $H_2O_2$  produite est plus importante. L'oxygène joue un rôle clé dans le milieu irradié. Plus il y a d'oxygène dans le milieu plus les phénomènes d'oxydation sont importants. L'oxygène  $O_2$  agit comme un catalyseur.  $O_2$  empêche la recombinaison en  $H_2O$  en captant  $H\bullet$  pour former un radical  $HO_2\bullet$ . Ceci s'accompagne donc de la formation de quantités importantes de  $H_2O_2$  et d'autres peroxydes.

Les RL pourraient aussi entraîner la formation de lésions moléculaires (ex : ADN, lipides). Ainsi  $OH\bullet$  possède la capacité d'oxyder et  $H\bullet$  la capacité de produire des pontages (Galle P et Paulin R pour le livre « Biophysique : radiobiologie, radiopathologie », éditions Masson (2000)). La conséquence de ces altérations serait une erreur de lecture lors de la transcription puis de la traduction donc la formation d'ARN anormaux et par la suite de protéines modifiées (structuralement ou fonctionnellement). Plus récemment, les travaux du Pr DT Goodhead ont montré qu'une nouvelle approche pouvait être envisagée concernant la formation des dommages radioinduits de l'ADN. Ainsi, ces travaux ont pu mettre en évidence l'existence de microdépôts d'énergie pouvant être quantifiées de manière idéale à l'aide de stimulations Monte Carlo (Goodhead DT, 1989). En effet, les premières simulations ont montré que le passage d'un photon dans des milieux biologiques de densités différentes était capable d'induire une succession aléatoire de microdépôts d'énergies variables. Cette variété dans les microdépôts pourrait être potentiellement la cause de la grande hétérogénéité des dégâts créés dans l'ADN.

### **I.3- Les systèmes de réparation de l'ADN**

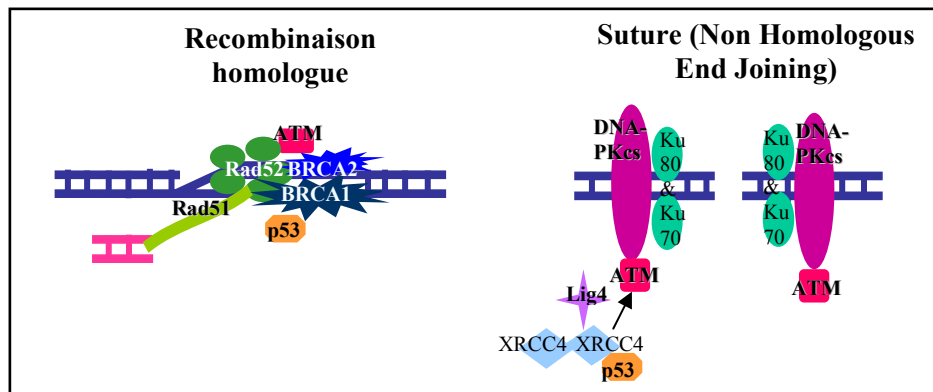
Les systèmes de réparations de l'ADN sont mis en place chez les êtres vivants dans le but de les aider à conserver l'intégrité de leur information génétique suffisamment longtemps que pour pouvoir se reproduire et ainsi assurer la survie de l'espèce.

#### **I.3.1- Les protéines kinases**

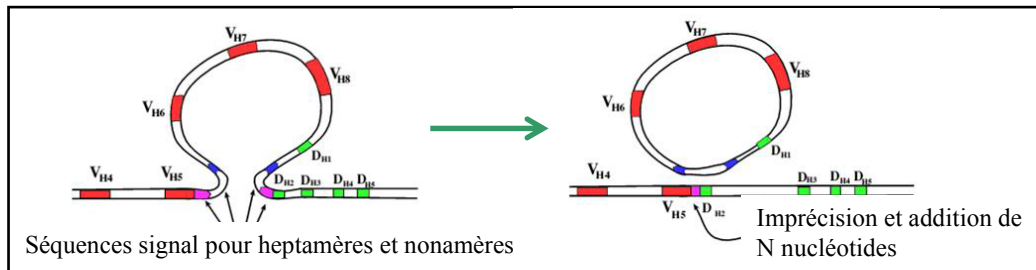
Les protéines kinases sont des acteurs principaux dans les voies de réparation de l'ADN. Les protéines kinases sont des protéines particulières qui modifient la conformation des autres protéines par ajout, avec consommation d'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate), d'un groupe phosphate ( $PO_4$ ) sur certains acides aminés particuliers : la sérine, la thréonine ou la tyrosine. D'autres protéines, nommées les phosphatases, se chargeront ensuite d'enlever le groupe phosphate.

#### **I.3.2- Les systèmes de réparation**

Chacun des types biochimiques des dommages de l'ADN décrits précédemment sont réparés par des systèmes de réparation spécifiques. Les différents systèmes de réparation de l'ADN existants sont tous basés sur le même principe : une reconnaissance du dommage est réalisée par des protéines circulant sur l'ADN (ex : les sous unités Ku80 et Ku70 de DNA-PK), ces protéines s'arrêtent au niveau des lésions puis en recrutent d'autres qui vont alors



**Figure 9) Les systèmes de réparation : recombinaison homologue et suture**  
 Représentation de deux systèmes de réparation humains pour les cassures double brin de l'ADN :  
 - recombinaison homologue (H Rec)  
 - suture (NHEJ).



**Figure 10) Les mécanismes d'hyper recombinaison V(D)J se font avec les mêmes protéines que pour la suture**  
 Réarrangement des anticorps ou immunoglobulines (Ig) des lymphocytes B et génération des BCR et TCR (respectivement les récepteurs des lymphocytes B et les récepteurs des lymphocytes T) par l'utilisation du mécanisme de la réparation par suture (NHEJ) (Morrison C *et al*, 1997 ; Lieber MR *et al*, 2004).

enclencher une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la réparation de la lésion (voir figures 7 à 9).

**Le « Nucleotide Excision Repair » (NER)**, qui se traduit littéralement par réparation par excision de nucléotides, intervient en cas de lésion sur l'ADN. Il nécessite la reconstruction d'une portion plus importante d'ADN simple brin complémentaire que le BER. Le système de réparation NER est connu pour être le système de réparation le plus polyvalent en terme de la diversité des lésions qu'il peut réparer. Ainsi les lésions produites par les dérivés du cis-platine et le rayonnement UV (par exemple les dimères de thymines) sont réparées par le NER (Lindahl T et Wood RD, 1999 ; Friedberg EC, 2001). Le NER est composé de quatre étapes successives : (1) de la reconnaissance des dommages par le complexe XPC-hHR23B, (2) de l'ouverture de l'ADN de part et d'autre de la lésion grâce, entre autre, à l'action des hélicases TFIIH, XPB et XPD (remarque : les protéines XPA et RPA se fixent à l'ADN lors de cette étape), (3) de l'excision d'un nucléotide par des nucléases spécifiques (XPG et ERCC1-XPF) et finalement (4) de la resynthèse de la séquence complémentaire par l'ADN polymérase  $\epsilon/\delta$  et ligation du nucléotide excisé par l'ADN ligase I (Friedberg EC, 2001). Le syndrome de Xeroderma pigmentosum est associé à une déficience de certaines protéines appartenant à cette voie de réparation. La déficience provoquant cette maladie peut intervenir dans les protéines XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E, XP-F et/ou XP-G.

**Le « Base Excision Repair » (BER)** se traduit littéralement par réparation par excision de base. Ce système de réparation de l'ADN est le mécanisme de réparation essentiel pour la réparation des dommages endogènes. Ce système fonctionne en trois étapes : tout d'abord, (1) l'ADN glycolase spécifique va venir couper la liaison qui relie la base endommagée au sucre, la transformant alors en un site abasique, (2) puis l'AP endonucléase coupe les liaisons phosphodiester entourant le site abasique, avec ou sans l'aide d'une AP lyase, et, finalement (3) la base complémentaire est resynthétisée et reliquée à l'aide de, respectivement, des ADN polymérases  $\beta$  et  $\epsilon/\delta$  et des ligases I et III (Simonelli V *et al*, 2005). A ce jour, aucun syndrome associé à cette voie de réparation n'a été répertorié (Friedberg EC, 2001).

**La recombinaison homologue (H Rec)** est une voie de réparation susceptible de réparer les cassures double brin de l'ADN. Elle se décompose en plusieurs étapes successives (figure 8) : (1) ATM prend en charge la reconnaissance des lésions, active le complexe Rad50/Mre11/Nbs1 et provoque l'apparition d'une extrémité 3' qui sera protégée par la protéine RPA. ATM active BRCA1 par phosphorylation. (2) BRCA1 active Rad51. La protéine Rad51 (en collaboration avec d'autres protéines : Rad52 et Rad54) est alors chargée de cette extrémité simple brin : Rad51 recherche l'homologie puis elle va attraper un morceau simple brin jugé homologue et le positionner dans la cassure comme s'il s'agissait d'un ADN simple brin et non plus d'une cassure double brin. (3) Les dernières étapes de la recombinaison font intervenir plusieurs enzymes : une ADN polymérase qui est chargée de synthétiser le brin complémentaire, une ligase pour souder la liaison phosphodiester et des résolvas (qui sont des nucléases) pour séparer les deux ADN double brin homologues. La cassure double brin est ainsi réparée (voir figures 8 et 9). La protéine majeure de cette voie est la protéine Rad51 puisqu'elle possède une activité « recombinase ».

Remarque : les structures intermédiaires sont nommées *jonctions de Holliday* et sont résolues à l'aide des résolvas (Aravind L *et al*, 2000).



De nombreux syndromes correspondent à cette voie de réparation, notamment l'Ataxia telangiectasia en cas de défaut dans les protéines ATM/ATR, le syndrome de Nijmegen associé à la mutation du gène codant pour la protéine NBS1 et l'anémie de Fanconi associée à des défauts dans au moins huit gènes différents dont *brca2* (D'Andrea AD et Grompe M, 2003).

La protéine p53 régule cette voie de réparation en contrôlant la fidélité de l'activité recombinaison homologue de Rad51 (Gatz SA et Wiesmuller L, 2006).

**La réparation par suture (Non Homologous End Joining)** est aussi utilisée pour la réparation des cassures double brin (Lindahl T et Wood RD, 1999 ; Lohrich M et Jeggo PA, 2005). Cette voie de réparation comporte elle aussi plusieurs étapes successives. Tout d'abord, (1) les enzymes chargées de la reconnaissance des lésions (c'est-à-dire les sous unités Ku70/80 de DNA-PK) patrouillent sur l'ADN. Quand elles ont repéré quelque chose d'anormal, (2) ATM est activée et phosphoryle la sous unité DNA-PKcs qui se charge de rapprocher les deux extrémités de la cassure double brin de l'ADN. Ce sont les sous unités Ku qui se chargent de recruter DNA-PKcs. (3) A ce moment, les ligases XRCC4 en dimère et la Ligase4 liguent les extrémités de la cassure (figure 9 ; Ball LG et Xiao W, 2005).

La génération des anticorps et des récepteurs des lymphocytes B et T utilise les mêmes protéines qu'une des voies de réparation de l'ADN après cassures double brin : la suture (Morrison C *et al*, 1997 ; Lieber MR *et al*, 2004 ; figure 10). Dans le cas de l'immunité, les protéines de la recombinaison homologue permettent de générer, grâce à un mécanisme nommé *épissage alternatif* (« splicing » en Anglais), une très grande diversité protéique. L'épissage alternatif a lieu lors de la transcription : un pré-ARNm est synthétisé, celui-ci est épissé pour donner lieu à l'ARNm dit *mature*. L'épissage consiste en l'excision des introns et l'accolement des exons. Les exons ainsi retenus vont permettre à l'ARNm *mature* d'être traduit en protéine. Ce phénomène explique pourquoi plusieurs protéines différentes peuvent être obtenues à partir d'une même séquence génétique, comme c'est le cas pour les anticorps (ou immunoglobulines) produites par les lymphocytes B et pour les récepteurs des lymphocytes. Il apparaît que, grâce à ce mécanisme d'épissage, le nombre théorique d'anticorps est estimé à  $10^9$  différentes molécules pour un même individu. Les réarrangements de la chaîne lourde des Ig se font de la façon suivante : un des gènes D s'associe à un des gènes J et le groupe obtenu s'associe à un des gènes V. Ceci est extrêmement aléatoire, d'autant plus que des nucléotides supplémentaires peuvent s'insérer dans la jonction (notés « N » sur la figure 10). Les enzymes impliquées sont des recombinaisons (spécifiques des lymphocytes), la kinase DNA-PK, des polymérases et des ligases XRCC4 et Lig4. Les recombinaisons reconnaissent les séquences conservées (nonamères et heptamères) qui sont adjacentes aux exons V, D et J. Deux protéines activatrices de la recombinaison (Rag1 et Rag2) jouent aussi un rôle dans le réarrangement (Letonturier P, 2001 ; Morrison C *et al*, 1997 ; Lieber MR *et al*, 2004).

L'Ataxia telangiectasia est l'un des syndromes associés à cette voie de réparation. Cette maladie, aussi nommée syndrome de Louis Barr, se caractérise par une perte de mouvement oculaire, l'apparition de petits vaisseaux sanguins au niveau du globe oculaire et s'accompagne de difficulté motrice. Cette maladie neurodégénérative commence dans l'enfance.

Il existe d'autres voies de réparation comme par exemple la réparation des mésappariements (ou MRR : *mismatch repair*) qui élimine les bases mal appariées apparaissant à la fréquence d'une base sur  $10^7$  au cours de la réplication cellulaire (Hoeijmakers JH, 2001). La synthèse translésionnelle (ou *translesion synthesis*), quant à elle, n'est pas exactement une voie de réparation mais plutôt un mécanisme qui permet de tolérer

certaines lésions de l'ADN et de les répliquer. Ceci sous-entend la formation d'une mutation (Pages V et Fuchs RP, 2002).

### **I.3.3- Les protéines de la signalisation cellulaire étudiées dans cette thèse**

Différentes protéines appartenant aux voies de la réparation de l'ADN furent étudiées lors de cette thèse. Les voici présentées brièvement par ordre alphabétique :

**ATM** (Ataxia telangiectasia mutated protein ; 351 kDa) et **ATR** (Ataxia telangiectasia related protein ; 301 kDa) sont des protéines kinases de réponse aux stress comme les radiations ionisantes, par exemple les rayons X (pour ATM) et les ultraviolets (pour ATR) mais aussi à d'autres types de stress comme par exemple les arrêts du cycle cellulaire et l'hypoxie. Ces deux protéines apparentées à la famille des PI3 kinases (3-phosphatidylinositol kinases) jouent un rôle central dans la reconnaissance des dommages de l'ADN et la phosphorylation initiant la réparation de ces dommages. Ces deux kinases sont activées par les lésions de l'ADN correspondant au stress auquel elles répondent. Ainsi, les coupures double brin vont activer ATM et les dommages de bases et les fourches de réplication non refermées vont activer ATR. ATM n'est pas activée après UV. La mutation du gène codant pour ATM induit une maladie particulière chez l'homme : l'Ataxia telangiectasia (A-T) qui se transmet sur le mode autosomal récessif et qui se traduit pour le patient par une radiosensibilité très importante et une forte prédisposition aux cancers (lymphomes et leucémies principalement). Les lignées cellulaires dérivées de certains de ces patients A-T (comme les lignées AT5BIVA et AT1BR) présentent une radiosensibilité sévère et des défauts dans les arrêts de cycles en G<sub>1</sub>/S et G<sub>2</sub>/M qui se font normalement après exposition aux radiations ionisantes. ATM phosphoryle de nombreux substrats, notamment breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1), serine/threonine protein kinase CHK1 (CHK1), serine/threonine protein kinase CHK2 (CHK2), c-Jun, DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), p53, l'histone H2Ax, NBS1 Rad9, Rad17... (Foray N *et al*, 1997 ; Khanna K *et al*, 1998 ; Cortez D *et al*, 1999, Foray N *et al*, 2003 ; Lavin MF, 2004). Contrairement à ATM, ATR est requise pour la prolifération cellulaire. La délétion d'ATR chez les souris provoque la mort précoce des embryons. CHK1, CHK2, p53 et BRCA1 sont phosphorylées par ATR. ATR régule la protéine CHK1 (Liu Q *et al*, 2000). Dans les lignées cellulaires mutées en ATM (AT5BIVA et AT1BR), ATR n'est pas mutée et lorsque que ces cellules sont soumises à une irradiation par rayons X, c'est ATR qui est quand même activée tardivement par les rayons X et qui prend le relais de ATM entre 4 et 8 heures après irradiation (Foray N *et al*, 2003).

**BRCA1** (breast cancer type 1 susceptibility protein ; 207,7 kDa) est une phosphoprotéine constitutionnelle à localisation nucléaire qui possède deux domaines particuliers : un domaine à doigts de zinc en N-terminal par l'intermédiaire duquel se font les interactions avec les autres protéines et un domaine C-terminal avec des motifs BRCT en tandem. Les motifs BRCT se retrouvent fréquemment dans les protéines de réparation de l'ADN et dans les protéines de contrôle du cycle cellulaire. Les mutations de BRCA1 et de BRCA2 (breast cancer type 2 susceptibility protein) dans les cellules germinatives sont responsables de la plupart de cancers héréditaires du sein et des ovaires. L'exposition aux radiations ionisantes ou à d'autres types de stress génère l'apparition de foci BRCA1 dans le noyau des cellules ayant subi le stress. Les foci sont des points ronds et lumineux apparaissant en cas d'expérience d'immunofluorescence et correspondant le plus souvent à une phosphorylation de protéine (voir chapitre III.2). Les lignées cellulaires mutées pour BRCA1

(par exemple : HCC1937) présentent une hypersensibilité aux rayons X et aux UV (Tibbetts RS *et al*, 2000 ; Xu B *et al*, 2002 ; Yarden RI *et al*, 2002).

Le cycle cellulaire est contrôlé par des protéines (par exemple : p21, p27, p16...) et il existe plusieurs points de contrôle nommés « check points » susceptibles de l'arrêter. La cellule tente de réparer ses lésions d'ADN, si elle le peut. Les protéines CHK1 et CHK2 sont des protéines qui contrôlent le cycle cellulaire à ces différents « check points ». **CHK1** (54,4 kDa) est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire après lésion de l'ADN ou en présence d'ADN non ligué dans la cellule (par exemple lorsque la cellule a été soumise aux UV). CHK1 est phosphorylée par ATR. CHK1 contrôle le passage de la phase G<sub>2</sub> à la phase S en phosphorylant Cdc25C sur la Ser216. Cdc25C est alors exportée en dehors du noyau. Cdc25C est la phosphatase qui induit normalement la phase M. Ceci empêche alors l'activation du complexe Cdk1-cycline B et l'entrée en mitose. CHK1 crée ainsi un retard de la phase S. CHK1 phosphoryle aussi Cdc25A et Cdc25B. (Liu Q *et al*, 2000 ; Zhao H et Piwnica-Worms H, 2001 ; Yarden RI *et al*, 2002). **CHK2** (60,9 kDa) régule les « check points » du cycle cellulaire et l'apoptose en réponse aux lésions de l'ADN notamment aux cassures double brin (qui peuvent être causées entre autres par le rayonnement X). CHK2 contrôle le passage de la phase G<sub>1</sub> à la phase S. CHK2 est phosphorylé par ATM. CHK2 inhibe aussi la phosphatase Cdc25C par phosphorylation sur la Ser216 aussi et empêche l'entrée en mitose (Yang J *et al*, 2003 ; annexe I-a B). CHK2 régule aussi p53 par phosphorylation et jouerait un rôle dans la méiose. Les patients mutés pour le gène *chk2* présentent une prédisposition aux cancers, notamment pour le cancer de la prostate. Souvent, les cellules cancéreuses ignorent ces « check points » (Shieh SY *et al*, 2000). Des mutations de CHK2 ont été aussi retrouvées dans certaines familles présentant le syndrome de Li-Fraumeni. Ce syndrome concerne des associations de cancers de types différents : ostéosarcomes, cancers du sein, leucémies, apparaissant chez les patients jeunes. Environ 50% des individus considérés atteints développent un cancer à 30 ans et 90% à 70 ans. Ce syndrome est, dans le cas normal, généralement associé à des mutations germinales de la protéine p53 (Lee SB *et al*, 2002).

**DNA-PK** (DNA-dependent protein kinase) est un complexe formé de trois sous unités : la sous unité catalytique DNA-PKcs (469 kDa) et **Ku80** et **Ku70** (respectivement 82,6 et 69,7 kDa). Les deux sous unités Ku sont associées et elles se fixent spécifiquement sur les coupures double brin de l'ADN. Ku80 joue un rôle dans la protection des télomères. Les lignées mutées pour DNA-PKcs (par exemple la lignée gliomale MO59J) sont hypersensibles aux rayons X et ne réparent pas bien leur cassures double brin (défauts de suture). DNA-PK joue un rôle majeur dans la recombinaison V(D)J en immunologie (Lieber MR *et al*, 2005). DNA-PKcs est connue pour s'autophosphoryler et pour phosphoryler la protéine de choc thermique HSP90 (Lees-Miller SP et Anderson CW, 1989), la protéine c-Jun (Bannister A.J *et al*, 1993), la protéine p53 (Shieh SY *et al*, 1997) et l'histone H2Ax (Park EJ *et al*, 2003) entre autres. DNA-PK, tout comme ATM et ATR, est apparentée à la famille des phosphatidylinositol-3-kinases (PI3kinases) (Sarkaria JN *et al*, 1998 ; Abraham RT, 2004). Cette enzyme phosphoryle aussi ses substrats sur les sites SQ/TQ (Liu SH, 1993).

La famille protéique **c-Jun** regroupe plusieurs membres dont c-Jun, c-Fos, JunD, Fra-1, Fra-2, FosB, et AP-1 (le facteur de transcription AP-1 (Activator Protein 1) (Bohmann D *et al*, 1987)), entre autres. Ce sont des proto-oncogènes nucléaires. c-Jun interagit avec c-Fos et ces deux protéines forment un hétérodimère. c-Jun est activé par phosphorylation par JNK (mitogen-activated protein kinase Jun) et possède alors une fonction pro-apoptotique. AP-1 est impliqué dans l'induction de l'apoptose après stress, tout comme c-Jun mais pas forcément dans les mêmes conditions (Angel P *et al*, 1988 ; Jacobs-Helber S *et al*, 1998). c-

Jun (35,7 kDa) est un oncogène nucléaire et un régulateur transcriptionnel. Il a la capacité de transformer la cellule (c'est-à-dire la rendre tumorale) s'il est muté ou s'il est exprimé ectopiquement (c'est-à-dire pas à l'endroit habituel).

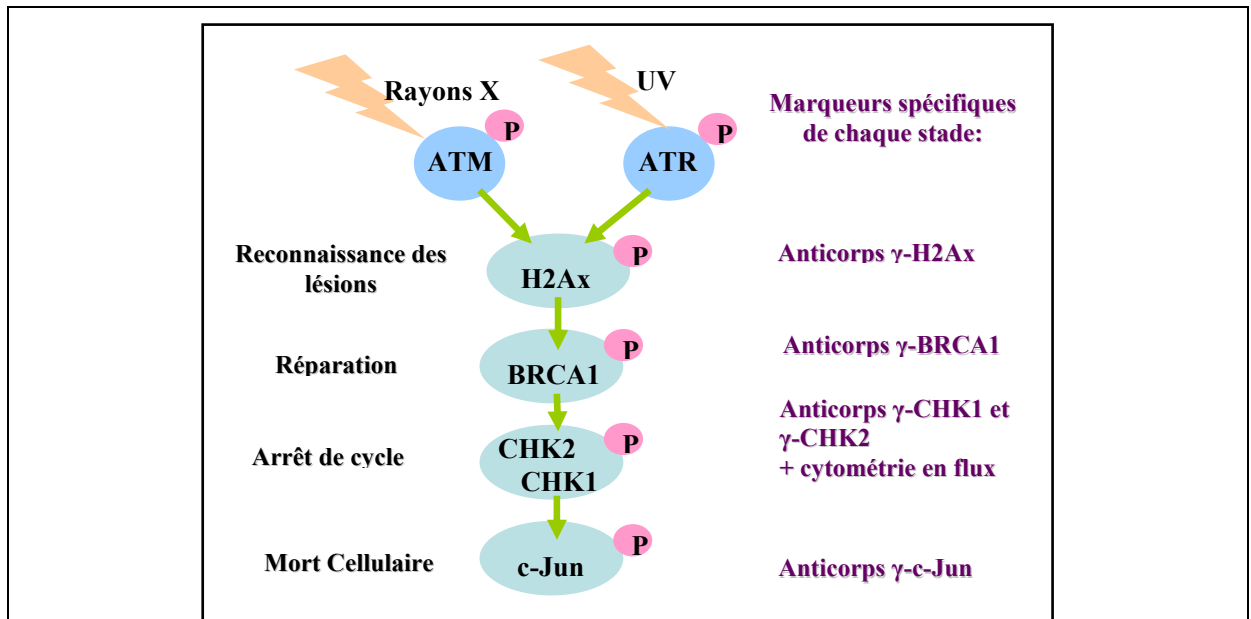
La protéine **MRE11** ou Meiotic Recombination 11 homolog (80,6 kDa) est une nucléase à cofacteur de manganèse. MRE11 est une composante du complexe MRN, avec NBS1 (codée par le gène responsable du syndrome de Nijmegen (Zhang Y *et al*, 2006)) et Rad50. Le complexe MRN joue un rôle central dans la réparation des cassures double brin, la recombinaison homologue, la maintenance de l'intégrité des télomères et la méiose (D'Andrea AD et Grompe M, 2003 ; Lavin MF *et al*, 2004). Le complexe MRN serait capable d'activer ATM. Rad50 servirait sans doute à tenir les extrémités d'ADN à proximité de MRE11. MRE11 présente une activité exonucléase 3'-5' spécifique du double brin de l'ADN et aussi une activité endonucléase spécifique pour l'ADN simple brin (Paull TT, Gellert M *et al* 1998). MRE11 forme des foci en cas de stress génotoxique (Dong Z *et al*, 1999 ; van Veelen LR *et al*, 2005). Des défauts dans le gène codant pour MRE11 produisent une maladie dont les signes cliniques sont proches de l'Ataxia telangiectasia ; cette maladie est nommée « ataxia-telangiectasia-like disorder » (ATLD) (Steward GS *et al*, 1999).

La protéine nucléaire **Rad51** (37,0 kDa) est l'homologue de la protéine de la recombinaison homologue RecA de la bactérie E.coli et participe à la réparation des cassures double brin de l'ADN et plus particulièrement à la recombinaison homologue aussi (Benson FE *et al*, 1994). Rad51 se fixe sur les extrémités simple et double brin de l'ADN et possède une activité ATPasique intrinsèque. Rad51 interagit aussi avec BRCA1, BRCA2 et p53. Rad51 est phosphorylée par Chk1 (Sorensen CS *et al*, 2005). Rad51 possède aussi la particularité de former des *foci* distincts en cas de dommage de l'ADN (Orre LM *et al*, 2006).

#### **I.4- La régulation du cycle cellulaire**

Chez l'Homme, le rythme de division doit être *contrôlé* et ce contrôle est programmé génétiquement. Quand la cellule ne parvient pas à réparer son ADN, elle est forcée d'interrompre son cycle cellulaire, à moins que les dégâts subits par la cellule ne soient trop sérieux et que la cellule devienne tumorale. Ce dernier cas est heureusement rarissime par rapport au nombre total des dommages subits par l'ADN au niveau d'un individu chaque jour. La récente publication du génome humain a déjà révélé que 130 gènes, au moins, sont traduits en protéines participant à la réparation de l'ADN. Les protéines de régulation de la division cellulaire et de la réparation de l'ADN jouent un rôle primordial pour le maintien de l'intégrité de l'information génétique contenue dans les gènes (figure 11). A gauche sont notées les différentes étapes de la réparation et à droite les marqueurs relatifs à ces différentes étapes. Ces étapes consistent en la reconnaissance des lésions de l'ADN, la réparation proprement dite, et, si la réparation ne peut pas se faire, des arrêts du cycle cellulaire peuvent se faire, allant parfois même jusqu'à la mort cellulaire (apoptose).

Après radiations ionisantes, les voies de réparations majoritaires (H Rec et NHEJ) se mettent en place. Il apparaît que la régulation du cycle cellulaire soit un déterminant majeur de la radiosensibilité (Pawlik TM et Keyomarsi K, 2004 ; Yang J *et al*, 2003 et schéma en annexe I-a B).



**Figure 11) Modèle vertical proposé pour schématiser la réparation de l'ADN**

Représentation schématique d'un modèle vertical possible de la réparation de l'ADN (cascade de phosphorylations successives représentées par des disques roses annotés avec la lettre P) (d'après Foray N *et al*, 2003) :

A gauche : les différentes étapes.

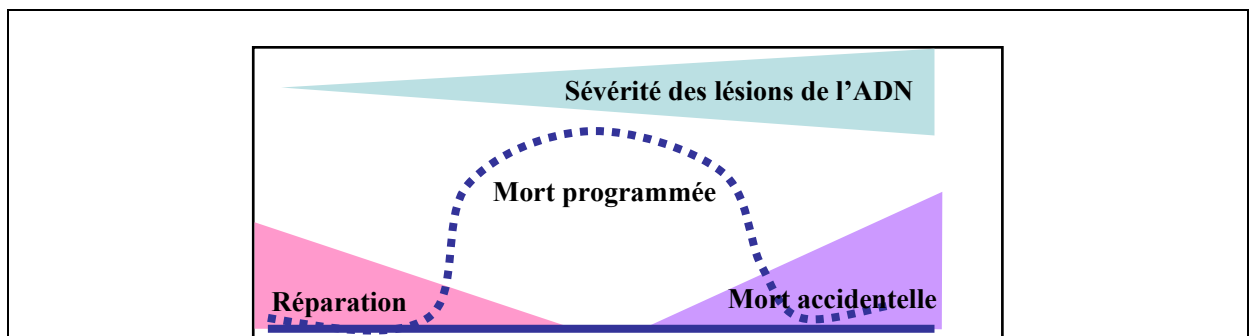
A droite : les marqueurs relatifs aux différentes étapes :

Reconnaissance des lésions de l'ADN

Réparation

Arrêts du cycle cellulaire

Mort cellulaire



**Figure 12) Mort cellulaire ou réparation ?**

Schéma (d'après Murphy M *et al*, 1998) représentant la balance entre les différents types de morts cellulaires et la réparation en fonction de la gravité des lésions encourues par l'ADN de la cellule.

La phase du cycle cellulaire G<sub>2</sub>/M est reconnue pour être la plus radiosensible et la phase S est désignée comme étant la moins radiosensible ; la phase G<sub>1</sub> étant intermédiaire concernant la radiosensibilité (Pawlik TM et Keyomarsi K, 2004).

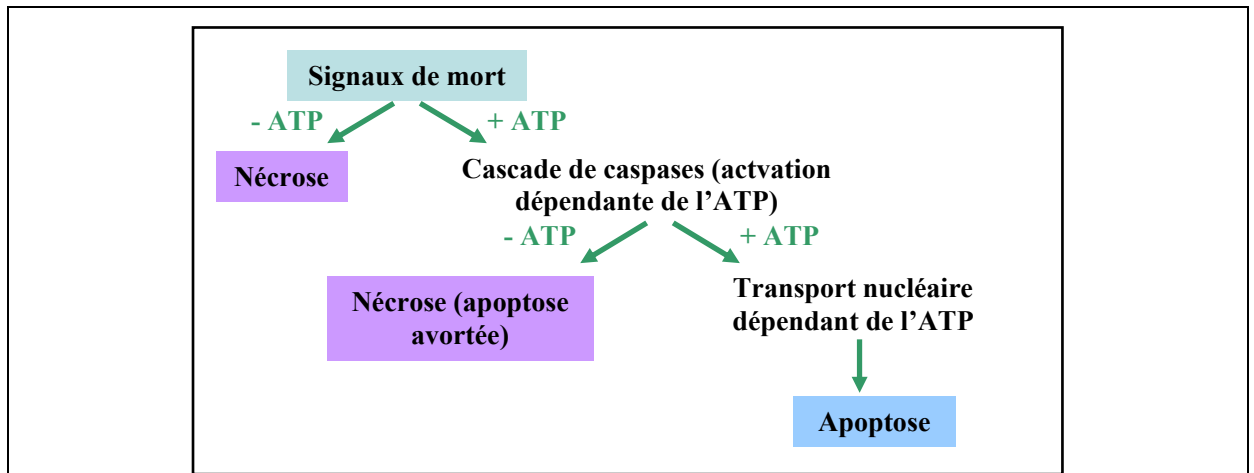
D'une manière plus générale, dans la régulation de la division cellulaire, deux catégories de protéines sont distinguées: les protéines codées par les proto-oncogènes et celles codées par les anti-oncogènes (ou gènes suppresseurs de tumeur). Oncogène vient du Grec *onkos* qui signifie « tumeur ». Les **proto-oncogènes** ou oncogènes cellulaires sont très bien conservés tout au long de l'évolution. Ces gènes cellulaires codent pour des protéines qui ne sont pas encore toutes connues, mais elles jouent un rôle physiologique primordial au niveau de la croissance cellulaire, ainsi qu'au niveau de la différenciation. Les protéines codées par ces oncogènes sont par exemple : des facteurs de croissance (ex. : c-Sis), des récepteurs aux facteurs de croissance (ex. : c-ErbB), des protéines appartenant à la famille des protéines liant le GTP (ex. : c-Ras), des tyrosine kinases (ex : c-abl qui est activée en réponse aux radiations ionisantes dans la voie médiée par ATM (Baskaran R *et al*, 1997 ; Foray N *et al*, 2002)), des protéines appartenant à la famille des protéines nucléaires (ex : c-Bcl2) ou des protéines appartenant aux voies de signalisation (50% des protéines de la signalisation sont des oncogènes cellulaires). Les oncogènes cellulaires peuvent être à l'origine des cancers lorsqu'ils sont mutés et activés constitutivement.

Les **anti-oncogènes** ou gènes suppresseur de tumeur sont caractérisés par le fait que leur absence ou leur déficience soient potentiellement génératrices de cancer. Ils codent pour des protéines ayant un effet répresseur sur certains proto-oncogènes. Les tumeurs observées dans ce type de déficience ont le plus souvent un caractère héréditaire. Il s'agit d'une transmission récessive. Un seul exemplaire du gène normal suffit au bon fonctionnement de la cellule. Les tumeurs s'exprimeront uniquement si la délétion est homozygote. La première délétion est d'origine héréditaire : sur les deux allèles d'un anti-oncogènes transmis par les parents, l'un est défectueux. L'anomalie reste muette tant que l'autre allèle suffit aux besoins cellulaires. Ce sera donc la mutation ou la délétion du deuxième allèle sain situé sur l'autre chromosome qui révélera l'anomalie en déclenchant ou en participant à la cancérogenèse. C'est par exemple le cas pour le rétinoblastome. Le rétinoblastome est le cancer de la rétine qui touche généralement les jeunes enfants. Le gène *rb* responsable de cette maladie est porté par le chromosome 13, bande q14. Cette maladie peut avoir deux origines : elle sera soit *sporadique*, soit *héréditaire*. Dans le cas d'une origine sporadique (c'est-à-dire non héréditaire), le premier événement est somatique et la deuxième mutation se produit par hasard dans un rétinoblaste (cellule de la rétine). Si par contre l'origine est héréditaire, alors le premier événement est germinale et le deuxième événement est une mutation toujours somatique.

## **I.5- Les morts cellulaires**

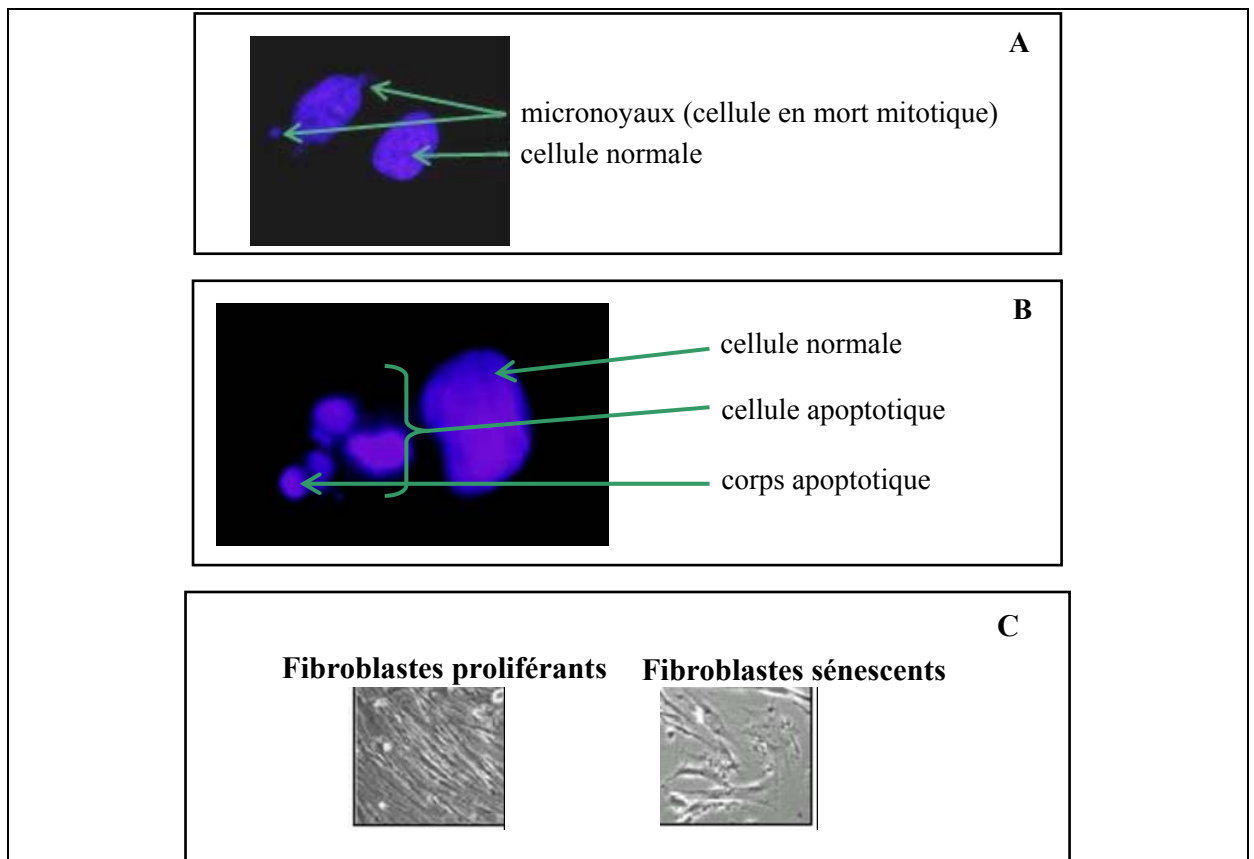
### **I.5.1- Avant propos**

Lorsqu'une cellule ne peut plus réparer son contenu génétique, elle meurt (dans la majorité des cas). Le type de mort cellulaire dépend principalement de deux facteurs : la gravité des lésions de l'ADN et le taux d'ATP intracellulaire. En effet, en cas de stress léger, la cellule est capable de réparer ses lésions d'ADN (Bonfoco E *et al*, 1995). Par contre, en cas de stress plus sévère, il existe deux cas possibles : soit la cellule possède des niveaux d'ATP suffisants et peut donc entrer en apoptose, soit la cellule n'a pas assez d'énergie (sous forme d'ATP) et meurt par nécrose (Tsujiimoto Y *et al*, 1997) (figures 12 et 13).



**Figure 13) Importance de l'ATP dans la mort cellulaire**

Ce schéma souligne l'importance de la présence de l'ATP dans le choix de la mort cellulaire.



**Figure 14) Morts cellulaires, morphologies**

**A) Micronoyaux.** Noyaux de fibroblastes 1BR3 irradiés avec rayons X (temps de réparation = 24 heures ; endoexpression de HSP70), marquage au Dapi (grossissement 1000). Les micronoyaux correspondent à de l'ADN haché qui n'a pas pu être réparé et qui est expulsé hors du noyau.

**B) Cellule apoptotique.** Noyau de lymphocyte CMT M10, photographie prise 24 heures après irradiation de 2Gy), marquage au DAPI (grossissement 1000).

**C) Sénescence.** Fibroblastes (entiers) WI-38 proliférants et fibroblastes (entiers) WI-38 sénescents (provenance : poumon), imagerie par contraste de phase (d'après Place RF *et al*, 2005).

Certaines protéines, comme p53, jouent un rôle clé dans le cycle cellulaire. P53 est fréquemment désigné comme étant le « gardien du génome ». C'est-à-dire que c'est cette protéine qui va prendre la décision d'arrêter, ou non, le cycle cellulaire et elle peut aussi forcer la cellule à entrer en apoptose.

Remarque : la mort immédiate radioinduite est un phénomène rare et ne se produit que pour des doses énormes (de l'ordre de plusieurs centaines de Grays). Néanmoins, deux types cellulaires : les lymphocytes et les ovocytes sont connus pour leur radiosensibilité, ces derniers types cellulaires meurent pour des doses bien plus faibles (de l'ordre du Gy).

## **I.5.2- La mort mitotique et l'oncose**

### **I.5.2.1- La mort mitotique**

La mort mitotique est définie par les radiobiologistes comme étant la mort différée. C'est le cas le plus répandu de mort cellulaire radioinduite (Hopwood LE et Tolmach LJ, 1971). La mort mitotique se traduit par une incapacité à accomplir la mitose. Les cellules irradiées apparaissent normales au point de vue morphologique et fonctionnel. Ce n'est qu'au moment de la mitose que s'exprimeront les lésions (Dikomey E *et al*, 2003). Dans le cas de la mort mitotique, la cellule gonfle puis libère de façon désordonnée son contenu ainsi que son matériel génétique. La mort mitotique est caractérisée phénotypiquement par la présence de micronoyaux. Le nombre de micronoyaux augmente linéairement avec la dose. La létalité augmente proportionnellement avec le nombre de micronoyaux (Balosso J et Foray N, Cancérologie Fondamentale, Collection John Libbey, 2005 ; figure 14). Les étapes finales de la mort mitotique ressemblent morphologiquement à celles d'un autre type de mort cellulaire : l'oncose. Si la cellule lésée peut franchir 6 divisions, alors il n'y a pas mort mitotique. Par contre, cela ne présage pas des anomalies géniques ou chromosomiques dont la cellule peut être porteuse. De même, la cellule peut avoir franchi les premières étapes d'une transformation ; l'apoptose peut intervenir, à ce moment-là, comme mécanisme de contrôle.

### **I.5.2.2- L'oncose**

L'oncose se produit en cas de privation d'énergie ou d'oxygène. Cette autre mort cellulaire accidentelle est caractérisée par (1) une augmentation du volume des organelles (ex : la mitochondrie) et du cytoplasme, (2) par un début de rupture de la membrane cellulaire lié à un dysfonctionnement des pompes ioniques membranaires, (3) par une condensation et une lyse de la chromatine, et finalement (4) par la lyse cellulaire (Von Reckling-Hausen, 1910 ; Van Cruchten S et Van Den Broeck W, 2002).

Remarque : la nécrose correspond à un processus plus tardif et correspond aux dernières phases de l'oncose.

## **I.5.3- L'apoptose**

### **I.5.3.1- Définition**

L'apoptose, aussi appelée *mort cellulaire programmée*, est constituée par une série de processus qui entraînent la mort de la cellule. L'apoptose, contrairement à la nécrose, modifie



la forme des cellules. La chromatine se compacte, le cytoplasme se condense, les membranes nucléaires et cytoplasmiques se détendent puis le noyau se fragmente et des corps apoptotiques composés de débris cytoplasmiques et nucléaires sont relargués dans l'espace intercellulaire. Ces éléments sont phagocytés par les cellules voisines mais n'entraînent pas de réaction inflammatoire. Un phénotype de bourgeonnement du noyau est caractéristique de cette mort cellulaire (figure 14).

L'apoptose se produit le plus souvent au cours des phases du cycle cellulaire G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> (Balosso J et Foray N, Cancérologie Fondamentale, Collection John Libbey, 2005). La voie apoptotique passe le plus souvent par la mitochondrie, les caspases et la protéine Bcl-2 (voir figure 15). Différents signaux de morts (ex : certains stress ou lésions non réparables de l'ADN) ou certaines cytokines pro inflammatoires comme FasL ou TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) ou les granzymes et perforines sécrétées par les macrophages ou par les cellules natural killers) ou l'endonucléase G et mêmes certaines HSP (HSP60mt et HSP10mt) codées par la mitochondrie (voir paragraphe II.2.2) activent, au niveau mitochondrial, la sécrétion de protéines particulières nommées effecteurs communs : notamment le cytochrome c, les caspases et l'AIF (apoptose inducing factor). Le cytochrome c n'a pas qu'une fonction dans la chaîne respiratoire mitochondriale puisqu'il participe à l'activation des caspases via la formation d'un complexe protéique nommé l'*apoptosome* (Liu X *et al*, 1996, Bossy-Wetzel E *et al*, 1998). L'AIF intervient au moment de la condensation de la chromatine et de la fragmentation de l'ADN (Susin SA *et al*, 1999). Les caspases sont les facteurs pro-apoptotiques par excellence, surtout la procaspase-3 après un clivage activateur en caspase-3. Les effecteurs communs déclenchent l'apoptose. Le proto-oncogène **Bcl2** (26,3 kDa) joue un rôle central dans l'apoptose : il contrôle la sécrétion et le relargage dans le cytoplasme des effecteurs communs. La libération des effecteurs communs dans le cytoplasme pourrait être expliquée par une variation du potentiel membranaire (Kim JM *et al*, 2003). Bcl2 (pour B-Cell Lymphoma 2) est une protéine mitochondriale qui permet de réguler l'ouverture des pores de la mitochondrie (Ali ST *et al*, 1997). Certaines protéines appartenant à la famille de Bcl2 possèdent des propriétés anti-apoptotiques (Hockenbery DM *et al*, 1991) et anti-oxydantes (Kim H *et al*, 2005). Ce gène bcl-2 code pour une protéine membranaire dont la fonction principale est d'empêcher l'apoptose dans certains tissus. Les souris KO pour le gène bcl-2 présentent une apoptose généralisée des tissus lymphoïdes. Comme d'autres proto-oncogènes, Bcl-2 devient oncogène quand ses taux d'expression augmentent (ceci peut notamment se produire après une translocation chromosomique).

Remarque : il existe une apoptose indépendante des caspases et qui ressemble morphologiquement à la nécrose d'où son nom d'apoptose « necrosis-like » (McCarthy NJ *et al*, 1997).

### **I.5.3.2- L'apoptose induite par la voie des céramides/sphingolipides**

Une autre voie conduisant à l'apoptose existe cependant : il s'agit de la voie de dégradation des céramides. Cette voie est elle aussi associée à la mitochondrie (Susin SA *et al*, 1999). En effet, les conversions cataboliques des sphingolipides, essentiellement des sphingomyélines, sont génératrices de lipides bioactifs dont certains possèdent un potentiel pro-apoptotique (Alphonse G *et al*, 2004 ; Bionda C *et al*, 2004). Ainsi, par exemple, l'activation de la shingomyélinase neutre associée à l'inhibition de la sphingomyéline synthase, en réponse au TNF- $\alpha$ , aurait la capacité d'induire l'apoptose dans certaines cellules tumorales (Bourteele S *et al*, 2000). La voie du métabolisme des sphingolipides, par sa capacité à moduler les taux endogènes des céramides, apparaît prometteuse notamment pour

la radiothérapie, puisqu'elle offrirait un nouveau moyen de sensibiliser les tumeurs radio-résistantes (Alphonse G *et al*, 2004).

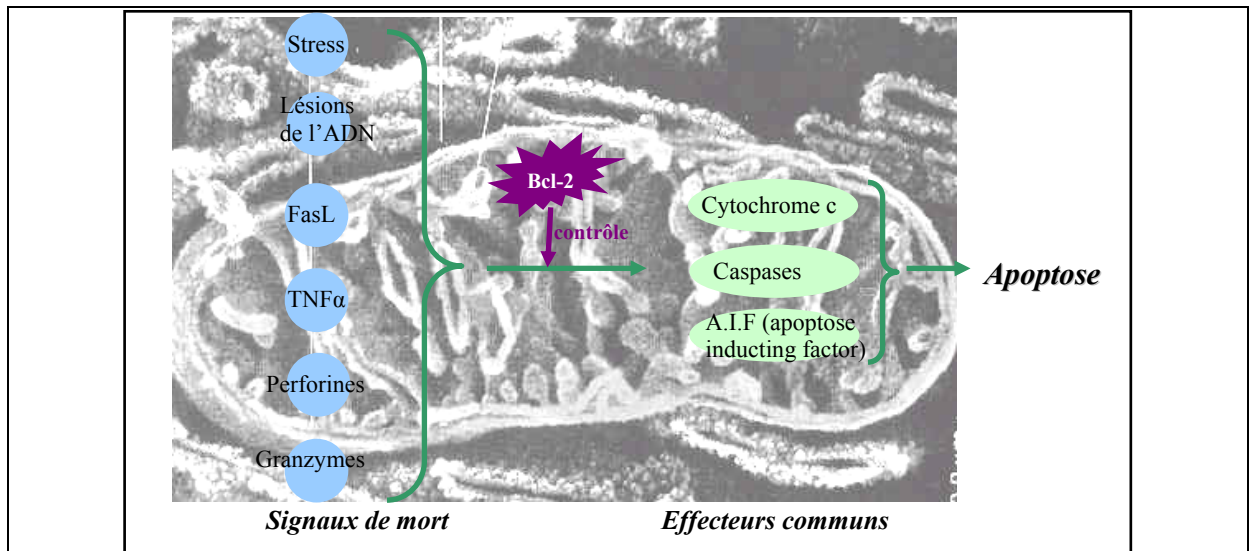
### **I.5.3.3- p53, le gardien du génome**

L'antioncogène p53 (43,6 kDa), reconnu comme tel depuis 1990, arrête le cycle cellulaire en G<sub>1</sub> et permet la réparation de l'ADN momentanément (cas normal) et quand les lésions sont trop importantes, il dirige la cellule vers l'apoptose (Louis DN, 1994). p53 fonctionne comme facteur de transcription en activant le gène qui code pour les protéines p21, Mdm2, Bax.... p53 réprime aussi la transcription de certains autres gènes (ex : *c-fos*, *c-jun*, *bcl2*, *hsp70*...). p21 inhibe le complexe cycline E / Cdk2 contrôlant la progression de la cellule dans le cycle cellulaire (au niveau du passage de la phase G<sub>1</sub> à la phase S). De plus, p21 possède la capacité d'inhiber la réplication des cellules qui sont déjà en phase S. Quand les deux allèles de *p53* sont mutés et donc que p53 est inactive, la cellule n'est plus en mesure de synthétiser l'inhibiteur p21 (Yu J et Zhang L, 2005). Lorsque p53 est mutée (mutation hétérozygote : p53<sup>+/-</sup>), elle est responsable d'un syndrome rare : le syndrome de Li-Fraumeni provoquant une forte incidence de certains cancers, notamment des leucémies et du cancer du sein. Ce syndrome est aussi caractérisé par une radio-résistance accrue (Donaldson SS, 1999 ; Lee SB *et al*, 2002).

Il a été montré que 50% des cancers humains renfermaient une mutation ou une délétion dans les deux allèles du gène p53. Plus de mille mutations différentes de p53 ont été identifiées chez l'homme. Le niveau d'altération de p53 peut être corrélé avec la virulence de la tumeur (invasivité, pouvoir métastatique et survie du patient diminuée). Quand p53 est inopérante, les cellules continuent à se diviser en reproduisant les anomalies du génome. La perte de fonction de p53 peut aussi entraîner la sénescence cellulaire (Gire V, 2005).

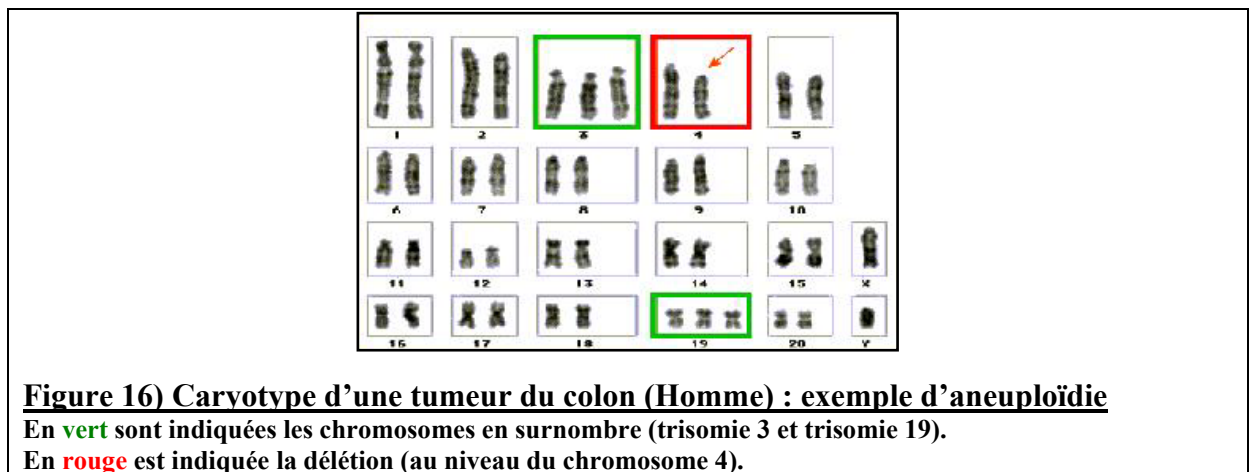
### **I.5.4- La sénescence**

La sénescence répllicative se traduit par un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire. Ainsi, les cellules restent métaboliquement actives pendant un temps relativement long *in vitro*. Il ne s'agit pas exactement d'une mort cellulaire programmée. Ce phénomène est le plus souvent dû, chez les cellules âgées (notamment chez les fibroblastes), au raccourcissement des télomères (ce sont les extrémités des chromosomes) au cours des divisions successives (Gire V, 2005). En effet, à chaque division cellulaire, entre 50 et 200 paires de bases d'ADN télomériques ne sont pas répliquées. Les télomères des cellules germinales sont compris entre 10 et 15 kpbs et le phénomène de sénescence intervient pour des télomères inférieurs à 4-6 kpbs (Campisi J, 2001). Dans les cellules tumorales, la longueur des télomères est stabilisée grâce à l'activation d'une enzyme télomérase. La morphologie de la sénescence est représentée figure 14 (Place RF *et al*, 2005). Les fibroblastes sénescents apparaissent plus rares, moins ordonnés et avec plusieurs ramifications, faisant un peu penser à une forme d'astrocyte. La sénescence s'accompagne d'une réduction de l'activité du protéasome. Toute fois, la sénescence répllicative peut être indépendante de la longueur des télomères. En effet, plusieurs facteurs cellulaires comme les cassures double brin de l'ADN, le stress oxydatif induit par des radicaux libres, ou l'activation non contrôlée de certains oncogènes comme c-Ras, peuvent induire une sénescence répllicative dite *prématurée* (Lundberg AS *et al*, 2000). La sénescence est génétiquement contrôlée.



**Figure 15) Schéma simplifié de l'apoptose (localisation : mitochondrie)**

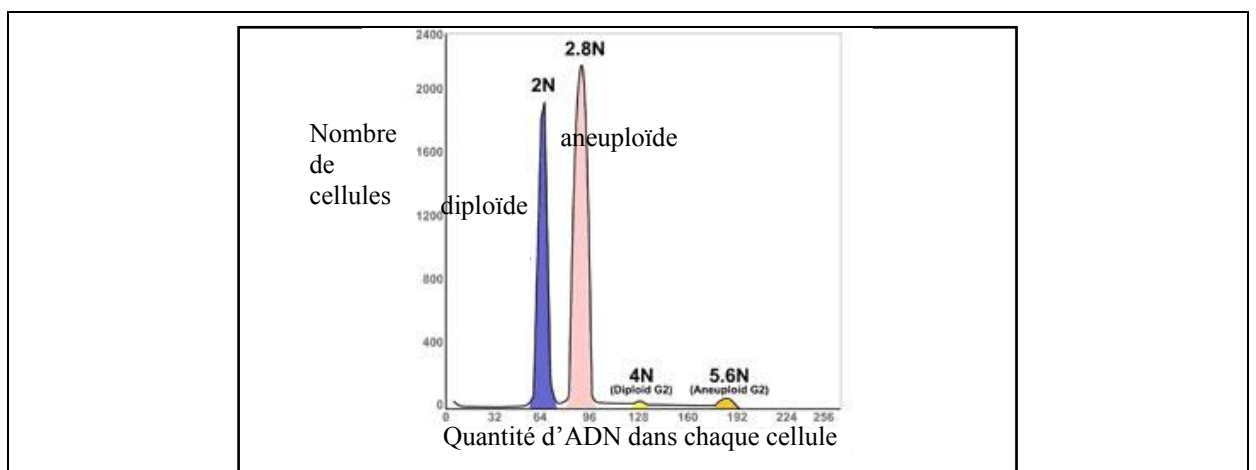
Différents signaux de morts vont activer la sécrétion d'effecteurs qui vont eux-mêmes déclencher l'apoptose. La sécrétion des effecteurs communs est contrôlée par Bcl-2.



**Figure 16) Caryotype d'une tumeur du colon (Homme) : exemple d'aneuploïdie**

En vert sont indiquées les chromosomes en surnombre (trisomie 3 et trisomie 19).

En rouge est indiquée la délétion (au niveau du chromosome 4).



**Figure 17) Contenu en ADN d'une tumeur de l'oesophage (Homme) : exemple d'aneuploïdie**

Cycle cellulaire normal : 2N-4N (cellules diploïdes). Cycle cellulaire anormal : 2,8N-5,6N. Le cycle cellulaire anormal montre la présence de cellules aneuploïdes.

Son activation nécessite plusieurs gènes et notamment p21<sup>WAF1</sup>, p53 et pRb (Guarente L et Kenyon C, 2000 ; Place RF *et al*, 2005). La sénescence pourrait conduire à la cancérisation des cellules (Wright WE et Shay JW, 2001).

Il existe un autre mode de sénescence nommé : « senescence-like » qui est dépendant d'un arrêt en G<sub>1</sub> et qui a lieu essentiellement en réponse aux radiations ionisantes (Suzuki M *et al*, 2006).

## **I.6- Les mécanismes de la cancérisation**

Lorsque la cellule lésée n'est pas parvenue à réparer son ADN ni à enclencher les processus de mort cellulaire, cette dernière devient cancéreuse.

### Nomenclature

Le cancer peut être défini par rapport à son tissu d'origine, ainsi quatre types principaux sont décrits dans le tableau 3.

Le cancer peut être aussi défini par sa localisation, par exemple : gliome (cellules gliales, cerveau), glioblastome (cellules astrocytaires, cerveau), mélanome (cellules pigmentaires ou mélanocytes, peau)...

Type de cancer	Adénome	Carcinome	Lymphome	Sarcome
Type tissulaire correspondant	glande	épithélium (peau, muqueuses...)	organe lymphatique (ex : ganglion)	tissu conjonctif (os, cartilage, muscle...)

**Tableau 3) Les quatre principaux types de cancers.**

### Quelques définitions

Une cellule cancéreuse est une cellule dont la croissance et la division ne sont plus soumises à *aucun contrôle*.

Une cellule devenue cancéreuse donne par une série de divisions anarchiques une tumeur (plus de 10<sup>6</sup> cellules). Lorsque la cellule ne parvient pas à entrer en apoptose (par exemple si p53 est mutée), elle peut devenir cancéreuse.

Le passage de cellule saine à cellule cancéreuse se fait en deux étapes : l'*immortalisation* (le nombre de divisions possibles pour la cellule devient illimité) et la *transformation* qui consiste pour la cellule à perdre deux de ses propriétés : *son inhibition de contact* (c'est-à-dire que les cellules voisines ne l'empêchent plus de se diviser) et *sa nécessité d'ancrage* (c'est-à-dire que la cellule n'a plus besoin de s'ancrer à son support pour pouvoir se diviser). La cellule se développe à tort et à travers sans aucun contrôle. La tumeur devient envahissante : elle se développe au détriment des tissus et organes normaux dans lesquels elle est apparue. Les cellules cancéreuses perdent leur spécialisation. Elles se *dédifférencient*. Le contenu en ADN d'une cellule cancéreuse est lui aussi modifié. En effet, alors qu'une cellule de saine va, en se divisant, conserver sa diploïdie, la cellule cancéreuse va, quant à elle, présenter des aberrations chromosomiques. Ainsi l'*aneuploïdie* se traduit, au niveau du caryotype d'une cellule (tumorale ou non), par l'absence de certains chromosomes (ou de morceaux de chromosomes) ou par le surnombre de certains chromosomes (ex : trisomie 21). La *polyploïdie* correspond aux cellules présentant une ou plusieurs copies surnuméraires de l'information génétique totale (ex : triploïdes, tétraploïdes) (voir figures 16 et 17).

Remarque : La cancérisation peut aussi être induite par des virus : les virus tumoraux à ADN (ex : le virus de singe SV40) et les virus tumoraux à ARN (rétrovirus) qui possèdent la même structure que le HIV. Tous ces virus ont la capacité de *transformer* (c'est-à-dire de rendre cancéreuses) les cellules qu'ils infectent parce qu'ils contiennent des gènes dont les produits interfèrent avec les activités cellulaires normales et la régulation de la croissance.

### L'angiogénèse et les métastases

Dans certains cas, la tumeur parvient à développer sa propre vascularisation à partir d'un réseau capillaire préexistant. C'est ceci qui est nommé angiogénèse. L'angiogénèse tumorale correspond à un processus de bourgeonnement de nouveaux vaisseaux à partir de microvaisseaux préexistants, au niveau de la périphérie tumorale. L'activation des cellules endothéliales des vaisseaux préexistants conduit à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. La migration orientée est suivie d'une phase proliférative. Les cellules se différencient ensuite en une structure de type capillaire pour former un réseau vasculaire nécessaire au développement des tissus. L'angiogénèse est une étape clé pour le développement tumoral. En effet, c'est l'acquisition d'une vascularisation qui permet à la tumeur de se disséminer plus facilement dans l'organisme, en empruntant le système vasculaire veineux ou lymphatique, formant ainsi des métastases, elles-mêmes formant ailleurs des tumeurs secondaires (Folkman J *et al*, 1971 ; Valentin U *et al*, 2006).

### Le pronostic d'une tumeur

Le pronostic d'une tumeur est évalué par deux paramètres : son *stade* (c'est-à-dire l'extension de la tumeur, la notion d'infiltration) et son *grade TNM* (c'est-à-dire son degré de différenciation et ses anomalies nucléaires et cytoplasmiques). T est relatif à la taille de la tumeur primitive, N correspond au nombre de ganglions envahis et M correspond à la présence de métastases détectables (Poupon MC pour le livre « cancérologie fondamentale », 2005, John Libbey Eurotexte, Paris). Le patient reçoit alors le traitement adéquat, correspondant à ce pronostic.

## **II.1- Synthèse bibliographique: les HSP, étude structurale**

### **II.1.1- Introduction sur les Heat Shock Proteins (HSP)**

En 1964, le biologiste F.M. Ritossa, au cours de ses recherches sur le développement de la drosophile, remarqua que lorsque la température s'élève, de nouveaux sites s'activent sur les chromosomes géants de larve de drosophile (Ritossa FM, 1964). Environ dix ans plus tard, plusieurs autres protéines apparaissant dans la larve après hyperthermie ont été découvertes. Il fut ensuite montré que ce phénomène ne s'appliquait pas qu'à la drosophile mais à tous les êtres vivants. Ces protéines furent nommées « Heat Shock Proteins » (pour protéines de choc thermique) parce qu'elles étaient systématiquement surexprimées après un choc thermique. Cependant, il fut très vite montré que leur rôle ne se limitait pas à une simple surexpression thermo induite. Ainsi, depuis, d'autres de leurs rôles sont connus. Ces protéines participent à la réponse à une large variété de stress comme l'exposition aux métaux lourds, aux rayonnements ionisants, aux drogues ou encore aux infections virales ou bactériennes. Elles sont aussi exprimées après plusieurs maladies dégénératives, comme la maladie d'Alzheimer par exemple. Ainsi, il apparaît que les HSP facilitent la survie dans des environnements non propices (Karp G, 2004).

Ces protéines, présentes en quantité et en grande variété, participent à de nombreux processus cellulaires destinés à faciliter la survie de la cellule et donc de l'organisme dans son intégralité. Certaines de ces protéines présentent la particularité d'être induites en présence de stress. Ces protéines de choc thermiques sont décrites dans ce chapitre II.1.

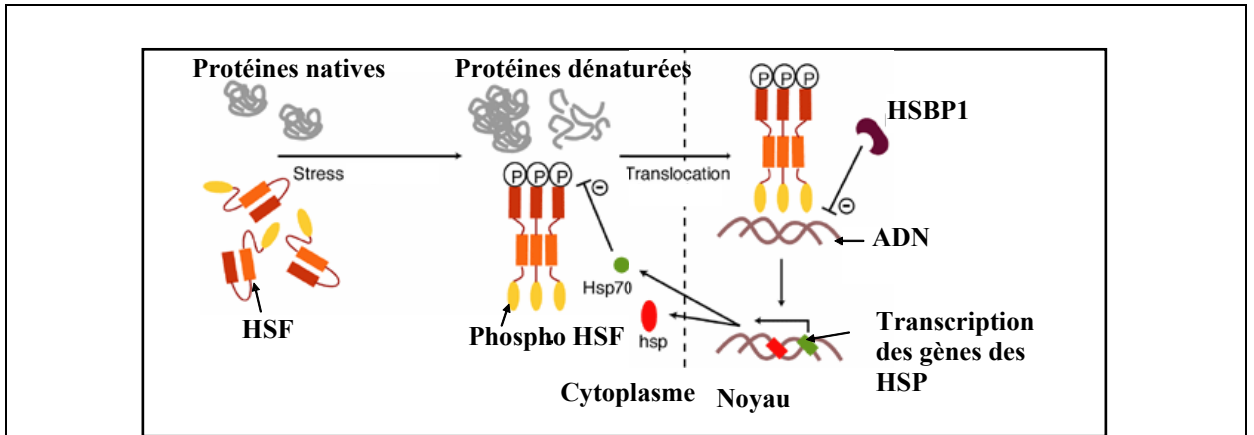
#### **II.1.1.1- Les différentes HSP : nomenclature**

Il existe deux types de protéines de choc thermique : celles qui sont constitutivement présentes dans les cellules en quantité constante et celles qui présentent une surexpression en cas de stress (figure 18). L'expression des HSP augmente avec plusieurs stress de différents types, notamment ceux indiqués dans le tableau 4.

<b>Environnement</b>	<b>Pathologie</b>	<b>Cellulaire</b>	<b>Physiologie</b>
hyperthermie, irradiation (X, UV), métaux lourds, hypoxie, pollution	infection, fièvre, ischémie, inflammation	cycle cellulaire, facteurs de croissance, différenciation	hormones, âge, développement

**Tableau 4) Surexpression des HSP.** Tableau (non exhaustif) représentant différents stimuli responsables de la surexpression des HSP (Jaattela M *et al*, 1999).

Au cours du développement et de la différenciation, des hormones (ex : les oestrogènes) parviennent à enclencher la transcription des HSP (Hickey E *et al*, 1986 ; Srinivasan AN et Bhat SP, 1994). La réponse cellulaire après choc thermique est contrôlée par les HSF (Heat Shock Factors) qui sont des facteurs de transcription spécifiques. Le stress génère la présence de protéines dénaturées. Les HSF (Heat Shock Factor) sont phosphorylés et s'organisent en trimère en présence de protéines dénaturées et en cas de stress (Santoro N *et al*, 1998).



**Figure 18) Le stress permet la transcription des Heat Shock Proteins**

Schéma représentant les différentes étapes de la transcription des gènes hsp en cas de stress (d'après Satyal SH *et al*, 1998) :

- Phosphorylation du HSF (heat shock factor) .
- Fixation du HSF au niveau des HSE (heat shock elements).
- Initialisation de la transcription des gènes des hsp



**Figure 19) Structure (résolue en 1997 par cristallographie par rayons X) de HSP90 associée à la geldanamycine (son inhibiteur)**

Protéine représentée en **bleu**. Inhibiteur (geldanamycine) représenté en **jaune** (Stebbins CE *et al*, 1997).

Les HSF entrent dans le noyau, reconnaissent certains éléments répétés au niveau des promoteurs des gènes codant pour les HSP (il s'agit des HSE (Heat Shock Elements)) et s'y fixent. La transcription des gènes des HSP est ainsi initialisée. L'activité du trimère HSF1 est régulée négativement par certaines HSP (comme HSP70 par exemple) et par la protéine nucléaire HSPB1 (Heat Shock binding protein) (Satyal SH *et al*, 1998).

Les HSP possèdent un très haut degré d'homologie entre elles. La forte conservation des gènes codant pour les protéines HSP au cours de l'évolution suggère une fonction essentielle de ces protéines pour la survie de l'organisme.

La famille de protéines HSP est très importante en nombre de protéines. Elles sont omniprésentes et abondantes dans tous les compartiments subcellulaires. Même en l'absence de stress, des variations des taux de HSP sont observées au cours de la différenciation cellulaire, du cycle cellulaire et au cours du développement embryonnaire (Feige U *et al*, 1996).

L'implication des HSP dans le phénomène nommé « thermotolérance » a été démontrée. Les cellules, qui ont été soumises à un pré-choc thermique avant d'être soumises à un autre stress, présentent une résistance accrue lors du deuxième stress. Ainsi, elles résistent bien mieux à ce deuxième stress que si elles avaient subi ce deuxième stress seul (Weber LA, 1992 ; Parsell DA *et al*, 1993).

Les HSP jouent un rôle majeur dans l'hypertension, la maladie des artères coronaires, l'athérosclérose des carotides, l'infarctus du myocarde et l'ischémie myocardique (Lakshmikuttyamma A *et al*, 2006).

Les HSP, et notamment HSP70, possèdent la capacité d'agir contre le stress oxydatif cytoplasmique (Papp E *et al*, 2003).

Le choc thermique, le stress oxydant modérés et l'accumulation de protéines mal pliées ont montré leur capacité à induire l'apoptose (Soldatenkov VA et Dritschilo A, 1997). Ceci sous-entend qu'il existe un rôle joué par les HSP dans l'apoptose. Les HSP présentent généralement une fonction anti-apoptotique (sauf mtHSP60 et mtHSP10 qui sont codées par la mitochondrie).

Cette famille de protéines a tout d'abord été étudiée en détail chez les bactéries avant d'être, comme c'est le cas actuellement, au centre de plusieurs recherches en santé humaine.

Les HSP ont été classées chez les mammifères en six familles principales en fonction de leur masse molaire : HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les petites HSP qui possèdent un poids moléculaire inférieur à 30kDa, aussi nommées sHSP (small HSP) : HSPB1 ou HSP27, MKBP (myotonic dystrophy protein kinase binding protein) ou HSPB2, HSPB3,  $\alpha$ -A cristalline ou HSPB4,  $\alpha$ -B cristalline ou HSPB5, HSP20 ou HSPB6, cvHSP (cardiovascular HSP) ou HSPB7, HSP22 ou HSPB8 et HSPB9 (Burel C *et al*, 1992 ; Benndorf R *et al*, 2001). Les HSP70, ainsi que les sHSP, font l'objet de chapitres particuliers. Les HSP ont certes des propriétés communes mais possèdent aussi des propriétés spécifiques à leur famille (mécanismes d'action, spécificité du substrat, dépendance ou non vis-à-vis de l'ATP, localisation intracellulaire et type de pathologies dans lequel elles peuvent être impliquées).

Les **HSP110** (105-110 kDa) ont d'abord été répertoriées comme étant une famille majeure parmi les HSP (Levinson W *et al*, 1980) mais sont finalement assez peu étudiées et relativement peu connues. Elles sont exprimées constitutivement dans le cytosol, et principalement dans le cerveau. Elles serviraient à protéger la synthèse et la production des ribosomes, étapes extrêmement sensibles à l'hyperthermie. Les HSP110 joueraient aussi un rôle important dans la thermotolérance et apparaissent assez proches, structurellement, des HSP70, avec deux domaines importants : le domaine de liaison pour les protéines et le domaine ATPasique (Oh HJ *et al*, 1997).



	<b>HSP22</b>	<b>HSP27</b>	<b>HSP40</b>	<b>HSP70-1</b>	<b>HSP90-<math>\alpha</math></b>
<b>Synonymes</b>	HSPB8	HSPB1	HSPF1	HSPA1A	HSPCA
<b>Séquence (en acides aminés)</b>	196	205	339	641	731
<b>Poids moléculaire (en kDa)</b>	22	27	40	70	90
<b>Localisation chromosomique</b>	12q24-qter	7q11.23	19p13.2	6p21.3	1q21.2-q22
<b>Homologues (Bactéries, Levures, Mammifères)</b>	N'existe avec certitude que chez les Mammifères	N'existe avec certitude que chez les Mammifères	DnaJ chez les Procaryotes, HSP40 ailleurs	DnaK chez les Procaryotes, HSP70 ailleurs	HtpG chez les Procaryotes et HSP90 ailleurs
<b>Fonctions</b>	Chaperonne moléculaire. Interagit avec HSP27.	Impliquée dans la résistance au stress et l'organisation de l'actine. Partenaire de HSP22. Rôle anti-apoptotique.	Chaperonne moléculaire, interagit avec HSP70 et peut stimuler son activité ATPasique.	Chaperonne moléculaire, activité ATPasique. Interagit avec HSP40.	Chaperonne moléculaire, activité ATPasique
<b>Mutations chez l'homme</b>	K141N R78M	Plusieurs mutations possibles dans la région 7q11-q21	Q488H	voir tableau 9, chapitre III.1	
<b>Présence de syndrome</b>	Neuropathie motrice distale héréditaire de type 1 ; Maladie de Charcot-Marie-Tooth	Maladie de Charcot-Marie-Tooth (Charcot-Marie-Tooth neuropathy, type 2F)			
<b>Phénotype des souris KO pour le gène</b>				Radiosensible et stress-sensible en général	
<b>Spécificité tissulaire (majoritaire)</b>	Cœur, muscles	Poumon, cerveau, colon, peau	Placenta, cerveau, poumon	Cerveau, muscles, pancréas, peau	Cœur, Placenta
<b>Localisation cellulaire (majoritaire)</b>	Cytoplasme	Cytoplasme, noyau après choc thermique	Cytoplasme, noyau (nucléole) après choc thermique	Cytoplasme, organelles, noyau après choc thermique, radeaux lipidiques	Cytoplasme, organelles, radeaux lipidiques

**Tableau 5) Différents aspects de quelques protéines HSP parmi les plus étudiées**

Les **HSP90** (90kDa) sont exprimées constitutivement à forte concentration (jusqu'à 2% des protéines cytoplasmiques), concentration qui augmente encore en cas de stress (ex : chaleur) (Buchner J, 1999). Cette famille est composée de deux protéines HSP90 $\alpha$  et HSP90 $\beta$  (aussi nommées HSP86 et HSP84 respectivement) qui présentent plus de 86% d'homologie entre elles (Hickey E *et al*, 1989). Elles sont localisées dans le cytosol et seulement une petite quantité parvient à se déplacer sous la forme d'hétéro-dimère (HSP90 $\alpha$  + HSP90 $\beta$ ) dans le noyau, en cas de stress (Pearl LH et Prodromou C, 2000). Elles possèdent la capacité à former des complexes stables avec certaines protéines, comme par exemple les protéines de transduction du signal, les protéines kinases, les oncogènes et les facteurs de transcription (Richter K et Buchner J, 2001). En particulier, elles stabiliseraient les récepteurs nucléaires des stéroïdes sous leur forme inactive (pour éviter leur activation non approprié en absence du substrat spécifique) (Pratt WB, 1992). HSP90 est capable de lier et d'hydrolyser l'ATP (Grenet JP *et al*, 1999). HSP90 peut s'associer à Apaf-1 (apoptosis protease activating factor). Apaf-1 est la protéine adaptatrice à laquelle se fixe le cytochrome c libéré par les mitochondries. Apaf-1 et le cytochrome c constituent l'*apoptosome*. La fixation de HSP90 sur Apaf-1 empêche ainsi la formation de l'apoptosome (Pandey P *et al*, 2000 B). HSP90 est une cible privilégiée pour le développement des traitements anticancéreux (Scheibel T et Buchner J, 1998). HSP90 se lie aux microtubules et aux centrosomes et participe par ce fait au maintien de l'intégrité du cytosquelette (Liang P et McRae TH, 1997). L'expression de HSP90 est inhibée par la geldanamycine (antibiotique d'origine fongique) et par l'herbimycine A (antibiotique d'origine fongique ; Whitesell L *et al*, 1994). La geldanamycine se fixe au niveau du site de fixation des substrats de HSP90 (Stebbins C *et al*, 1997). Lors de la fixation de son inhibiteur, HSP90 ne parvient plus à replier ses substrats qui sont alors dégradés. Il en résulte une fonction anti-proliférative et anti-tumorale pour la geldanamycine. La structure de HSP90 est résolue depuis 1997 (Stebbins C *et al*, 1997 ; figure 19, code PDB : 1YET).

Les **HSP60** (60kDa) sont des chaperonnes qui nécessitent la présence de leur co-chaperonne HSP10 et la présence d'ATP pour pouvoir être fonctionnelles (Flaherty KM *et al*, 1990). Les HSP60 sont les homologues mammifères de la protéine bactérienne GroEL (Growth E.coli large protein). GroEL est nécessaire à la croissance et à la morphogenèse des bactéries et des phages  $\lambda$  (Georgopoulos CP et Hohn B, 1978). Chez les plantes, une protéine homologue a été identifiée au niveau du chloroplaste : elle est requise pour l'assemblage des différentes unités de la Rubisco (ribulose biphosphate carboxylase monooxygénase, l'enzyme de la photosynthèse (Hemmingsen SM *et al*, 1988)). Les HSP60 sont exprimées de manière constitutive dans le cytosol puis s'accumulent dans la mitochondrie. Elles possèdent une activité ATPasique et agissent avec HSP10 (dont l'homologue bactérien est nommé GroES (Growth E.coli small protein)) et probablement avec l'isoforme mitochondriale de HSP70. Ces deux protéines sont nommées communément « chaperonines » (Ellis RJ *et al*, 1989). Les HSP60 pourraient être la cause de certaines maladies auto-immunes (Young DB, 1990) et pourraient notamment jouer un rôle pathogène dans les rhumatismes auto-immuns en activant les réactions inflammatoires (Yokota S *et al*, 2006). Les HSP60 sont connues pour fixer le LAP (Listeria Adesion Protein) sur certaines cellules et jouer ainsi un rôle de récepteur membranaire (Wampler JL *et al*, 2004). HSP60mt codée par la mitochondrie possède la particularité d'exercer une activité pro-apoptotique (Xanthoudakis S *et al*, 1999). Avec HSP10mt, elle se lie à la procaspase-3 pour former un complexe (Samali A *et al*, 1999). C'est la dissociation de ce complexe qui entraînerait l'apoptose. HSP60mt est aussi impliquée dans l'import des protéines dans la mitochondrie : elle facilite leur entrée puis leur repliement (Deocaris CC *et al*, 2006).

**HSP40** est la co-chaperonne de HSP70 (Flaherty KM *et al*, 1990). Le complexe HSP40(DnaJ)/HSP70(DnaK)/Bag1-GrpE est très performant et nécessite de l'énergie sous forme d'ATP (Tavaria M *et al*, 1996). Il se met en place sous l'influence d'un certain nombre de stress. HSP40 stimule l'hydrolyse d'ATP pour HSP70. Les cofacteurs Bag1 (combined Bcl-2 anathogene) et GrpE (glucose regulated protein) accélèrent l'échange des nucléotides ADP/ATP. GrpE paraît essentiel pour la viabilité cellulaire, de plus, chez les bactéries, il agirait comme un thermo senseur (Shomura Y *et al*, 2005). HSP40 stimule la fonction ATPasique de HSP70 via son domaine J et l'association de HSC70 avec HIP (HCS70 interacting protein) en présence d'ATP. En présence d'ADP (adénosine di-phosphate), cette association a lieu sans la régulation de HSP40 (Melville M *et al*, 1999). HSP40 est activée par hyperthermie et se déplace alors rapidement du cytoplasme au noyau (Hattori H *et al*, 1992).

### II.1.1.2- HSP70

La famille des protéines HSP70 a été minutieusement décrite par Tavaria M et collaborateurs en 1996 dans la revue *Cell Stress and Chaperones* puis par Wirth D et coauteurs en 2002. La sous-famille HSP70 (70 kDa) est composée de 11 membres. Les HSP70 sont les HSP les plus abondantes et les mieux conservées à travers l'évolution (Tavaria M *et al*, 1996). Ainsi une homologie très importante est observable parmi les différentes espèces. L'identité en acides aminés entre les séquences des homologues HSP70 des différentes espèces est toujours supérieure à 40%. 51,3% d'identité entre HSP70-1 humaine et son homologue d'*Escherichia coli* DnaK sont observés et plus de 70% d'identité sont comptabilisés avec l'homologue drosophilien (Hunt C et Morimoto RI, 1985). Chez la drosophile, lorsque HSP70 est mutée ou sous exprimée, plusieurs anomalies physiques sont observées, allant même jusqu'à la létalité de l'individu, en passant par la diminution de la « thermotolérance » et la neurodégénérescence (Gong W et Golic K, 2006). Le domaine le plus conservé est le domaine ATPasique (situé en N-terminal) et le domaine le moins bien conservé est le domaine C-terminal (domaine d'interaction avec les autres protéines) (Wang H *et al*, 1998). Tout comme HSP60, HSP70 a besoin de sa co-chaperonne (ici, il s'agit de HSP40) et d'ATP pour pouvoir fonctionner en tant que chaperon (repliement, adressage, anti-agrégation) (Flaherty KM *et al*, 1990). Après un stress, si les conditions physiologiques sont restaurées, les protéines mal pliées sont repliées grâce à la fonction ATP dépendante des HSP70 (Lee GJ *et al*, 1997). Les cofacteurs de HSP70, GrpE et Bag1, ont la capacité d'activer HSP70 (Winter J et Jakob U, 2004). HSP70 peut aussi fonctionner avec HSP90 : HSP70 a la possibilité d'effectuer un transfert de substrat au bénéfice de HSP90 (Wegele H *et al*, 2005).

Selon certaines sources plus anciennes, il semblerait que l'expression de **HSP70-1 (HSPA1A)** (annexe I-b) soit inductible par le stress, et notamment le stress thermique, et ce chez tous les mammifères (Gunter E et Walter L, 1994 ; Dressel R *et al*, 1998, Wirth D *et al*, 2002). Chez la souris, les 98% d'homologie entre les deux gènes HSP70-1 et HSP70-3, font que les produits des gènes HSP70 inductibles ne sont pas distinguables l'un de l'autre et donc, il n'y a qu'une seule HSP70 inductible ; cette protéine jouerait un rôle spécifique dans la phase S du cycle cellulaire et dans le maintien de la stabilité du génome en conditions de stress (Gunther E et Walter L, 1994 ; Hunt CR *et al*, 2004). Le gène codant pour HSP70-1 ou HSPA1A est porté par le chromosome 6p21 et ce gène est situé dans la même région que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et III. HSP70-1 est présente en faible quantité dans le cytosol en conditions normales et aide au repliement des protéines en cours de synthèse, comme les autres HSP70 (Feige U et Polla BS, 1994). Le niveau d'expression de HSP70-1 est hautement dépendant du type tissulaire et de l'âge du patient. Ainsi, il a été

montré, chez le petit rongeur (Blake MJ *et al*, 1990 ; Tanguay RM *et al*, 1993), que la peau, le tube digestif, les poumons et les reins (qui sont des organes plus facilement soumis au stress car ils sont en contact avec l'extérieur) expriment un taux basal de HSP70-1 plus élevé que le cœur, les muscles et le foie. Les taux de HSP70 décroissent nettement avec l'âge et les cellules âgées ne sont plus capables de réaliser la « thermotolérance » (Tandara A *et al*, 2005).

Il semblerait être admis maintenant que **HSP72 (HSPA2)** soit la principale HSP70 inductible par le stress (Faure O *et al*, 2004 ; Febbraio MA *et al*, 2004).

D'autres HSP70 auraient une expression constitutive, c'est à dire variant peu avec le stress.

Protéines	Homonymes	Poids moléculaire (kDa)	Taille (acides aminés)
<b>HSP70-1/2</b>	HSPA1A/B	70,052	641
<b>HSP72</b>	HSPA2	70,021	639
<b>HSP73</b>	HSPA8	70,898	646

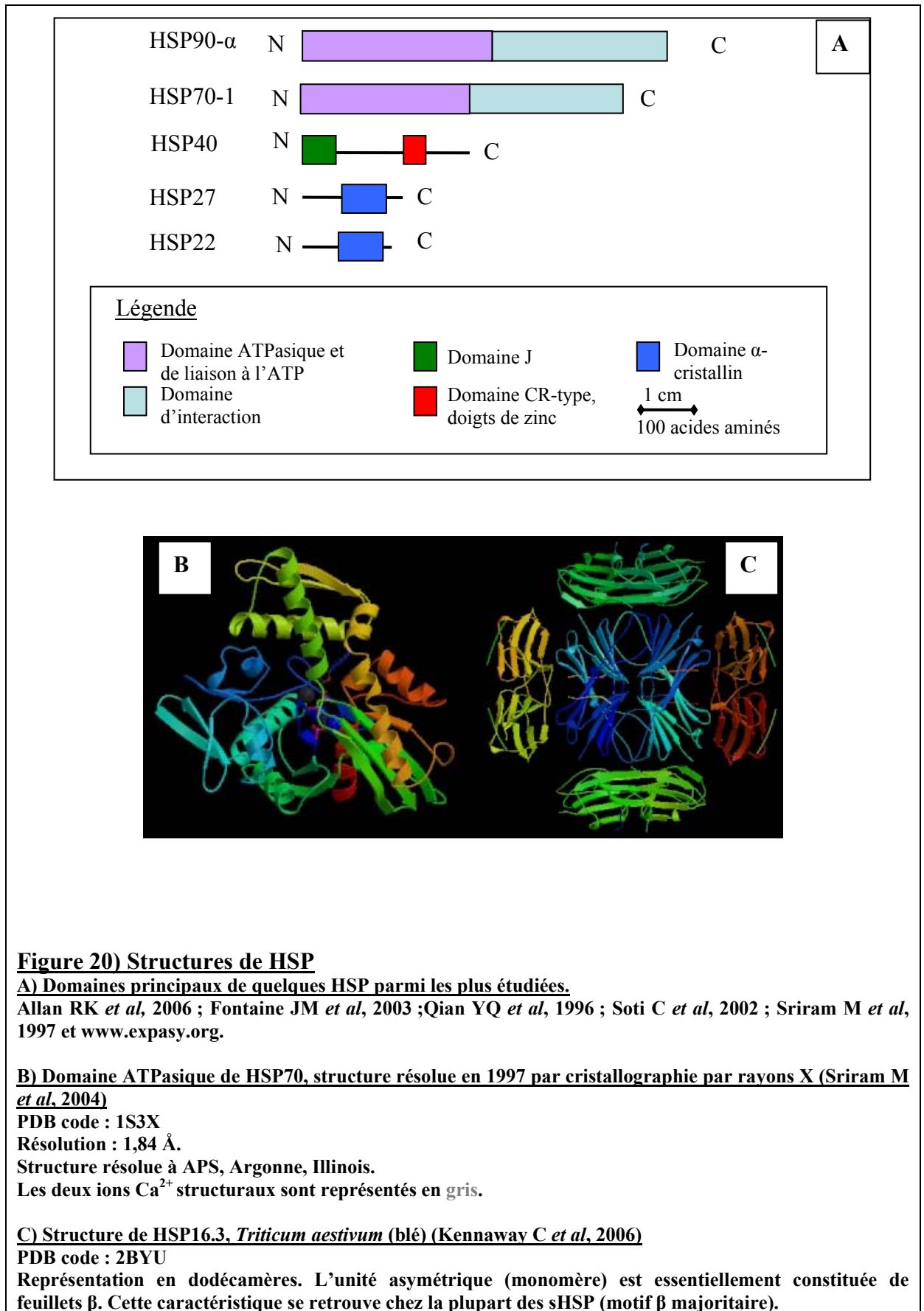
**Tableau 6) Récapitulatif des HSP70 étudiées au cours de cette thèse**

Ces éléments ont été obtenus d'après le serveur de bio-informatique [www.expasy.org](http://www.expasy.org).

Les rôles de HSP70 sont reliés à sa structure. Cette protéine possède un domaine ATPasique (qui a déjà été cristallisé (Sriram M *et al*, 1997 ; Osipiuk J *et al*, 1999)) et un autre domaine plus aspécifique qui sert à la liaison avec les autres protéines (figure 20 B). Il n'existe pas, à ce jour, de résolution de structure complète pour la protéine HSP70 (Homme), c'est pourquoi un des objectifs de cette thèse est de déterminer la structure entière de la protéine HSP70-1.

En ce qui concerne les autres polymorphismes de HSP70, **HSP70-2 (HSPA1B)**, tout comme HSP70-1, était supposée être l'une des protéines de la famille HSP70 exprimée majoritairement après hyperthermie (Dressel M *et al*, 1998). Il apparaît maintenant que ce soit HSP72 qui est majoritairement exprimée après stress (dont l'hyperthermie) (Faure O *et al*, 2004 ; Febbraio MA *et al*, 2004). Chez les rongeurs, il apparaîtrait que HSP70-2 soit non inductible par le stress mais synthétisée dans les spermatoocytes pendant la méiose. Ainsi, les souris mâles KO pour l'homologue murin de ce gène sont stériles et ne produisent pas de spermatoïdes (Eddy EM, 1998 ; Wirth D *et al*, 2002). Il en résulte que HSP70-2 reste une protéine essentielle pour la spermatogenèse, même chez l'Homme, et que, de plus, sa dépression à l'aide de petits ARN complémentaires (siRNA) provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub> (Daugaard M *et al*, 2005), suggérant une importance capitale pour la viabilité cellulaire. HSP70-2 est l'homologue de HSP70-1, elles présentent exactement la même séquence en acides aminés et seules leurs séquences d'ADN diffèrent (sources : [www.expasy.org](http://www.expasy.org) et Pubmed, Nucleotide <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>).

**HSC70** (pour « cognate HSP70 » ou HSP73) est l'homologue constitutif de HSP70-1. Elle est faiblement inductible par choc thermique et se localise dans le cytosol et le noyau (Feige U et Polla BS, 1994).



Elle a pour rôle l'adressage des protéines néosynthétisées (Wickener S *et al*, 1999) et possède la capacité de fixer la calmoduline (Stevenson MA et Calderwood SK, 1990), de s'associer aux tubulines et au facteur d'élongation des complexes multiprotéiques précurseurs de nouveaux centrioles (Marchesi VT et Ngo N, 1993). Elle serait aussi impliquée dans la dissociation des cages de clathrines entourant les vésicules d'endocytose et d'exocytose (Ungewickell E, 1985). Elle est définie comme étant exprimée constitutivement dans le cytosol (Moehler M *et al*, 2003 ; Auger I et Roudier J, 2005). HIP (HCS70 interacting protein) stabiliserait le substrat de HSC70 (Hohfeld J *et al*, 1995).

**HSP70-hom** est exprimée dans les cellules germinales, lors de la phase post méiotique de la spermatogenèse (Matsumoto M et Fujimoto H 1990).

**HSP70mt (73,68 kDa), aussi nommé GRP75 ou mortaline** est exprimée dans les mitochondries. Comme HSP60mt, elle est impliquée dans l'import mitochondrial et elle replie les protéines importées. Elle serait aussi impliquée dans le vieillissement et la prolifération cellulaire (Deocaris CC *et al*, 2006).

### II.1.1.3- Les sHSP

HSP22 (Heat Shock Protein, 22 kDa) appartient à la famille des sHSP (small heat shock proteins). Cette famille des sHSP est composée de 9 membres : HSPB1 ou HSP27, MKBP (myotonic dystrophy protein kinase binding protein) ou HSPB2, HSPB3,  $\alpha$ -A cristalline ou HSPB4,  $\alpha$ -B cristalline ou HSPB5, HSP20 ou HSPB6, cvHSP (cardiovascular HSP) ou HSPB7, HSP22 ou HSPB8 et HSPB9 (Benndorf R *et al*, 2001). Les sHSP s'assemblent en un large complexe isomérique constitué de sHSP de différentes masses molaires. Leur expression peut être augmentée par la chaleur, comme leur nom l'indique, mais pas seulement par ce stress-là. Tout comme les autres HSP, l'expression des sHSP est soumise à trois types de stimuli : d'origine environnementale, d'origine pathologique et d'origine cellulaire/physiologique. La protection cellulaire est proportionnelle aux taux cellulaires de sHSP : ainsi, plus les sHSP sont présentes en quantité dans la cellule et mieux cette dernière est protégée (Mehlen P *et al*, 1995). En effet, les sHSP fonctionnent comme répresseurs de la formation d'espèces activées de l'oxygène (ROS : « reactive oxygen species »). Les défauts des sHSP apparaissent souvent corrélés aux maladies neurodégénératives (Evgrafov OV *et al*, 2004 ; Dierick I *et al*, 2005). Les sHSP jouent un rôle au cours du développement et de la différenciation cellulaire. Les sHSP aident au maintien du cytosquelette cellulaire, notamment au maintien des filaments d'actine (Liang P et McRae TH, 1997). Les sHSP aident la cellule à survivre et leur effet protecteur dépend partiellement de l'augmentation du GSH (glutathion sous forme réduite) puisque certaines sHSP, et notamment l' $\alpha$ -B cristalline, ont la capacité d'augmenter sa synthèse (Ganea E et Harding JJ, 1996). Les souris KO pour le gène de l' $\alpha$ -cristalline présentent un phénotype particulier : elles développent une cataracte et ce très précocement. Ceci suggère que l' $\alpha$ -cristalline inhibe l'aggrégation des protéines dans le cristallin (Brady JP *et al*, 1997). Ces souris présentent aussi de l'arthrose dégénérative de façon précoce (Brady JP *et al*, 2001).

C'est dans cette sous-famille de HSP que le plus de disparités et le moins d'homologie entre les différentes protéines sHSP sont observables d'un organisme à l'autre. Malgré tout, ces protéines possèdent toutes un domaine  $\alpha$ -cristallin (correspondant à 80 acides aminés présents en C-terminal). Le domaine C-terminal est très bien conservé (par rapport au domaine N-terminal). Les sHSP ont la capacité de s'oligomériser en complexes

multimériques composés d'un nombre variable de protéines. Les complexes de sHSP peuvent rassembler jusqu'à 50 sous unités (Ehrnsperger M *et al*, 1997). A ce jour, très peu de structures ont été résolues pour les sHSP, par exemple : HSP16.5 chez *M. jannaschii* (un archeae hyper thermophile (Kim R *et al*, 1998, PDB code : 1SHS)), et HSP16.3 chez la bactérie *M. tuberculosis* (Kennaway CK *et al*, 2005, PDB code : 1BYU).

Néanmoins, des analyses spectroscopiques ont été réalisées pour le domaine  $\alpha$ B-cristallin et pour HSP27 (Surewicz WK et Olsen PR, 1995 ; Augusteyn RC, 2004), montrant une organisation en feuillets  $\beta$  pour le domaine cristallin (figure 20 C).

**HSP27** appartient à la famille des sHSP (small Heat Shock Proteins, de 15 à 30 kilos Dalton, le numéro correspond à cette masse molaire). HSP27 est plutôt cytoplasmique dans les cellules non musculaires mais elle est localisée dans l'espace périnucléaire des cellules HeLa. En cas de stress, HSP27 se déplace dans la cellule HeLa : par exemple, en cas de privation de sérum, HSP27 est relocalisée dans le cytoplasme et en cas de choc thermique, HSP27 devient nucléaire (Arrigo AP *et al*, 1988 ; Mehlen P et Arrigo AP, 1994). Ces phénomènes sont réversibles. HSP27 module le potentiel oxydo-réducteur de la cellule et possède des propriétés anti-oxydantes. Ainsi, HSP27 lutte contre le stress oxydant et notamment en augmentant la production de glutathion (Mehlen P *et al*, 1996 ; Arrigo AP *et al*, 2002, Arrigo AP *et al*, 2005). HSP27 est exprimée transitoirement dans les cellules souches embryonnaires et joue un rôle lors de la différenciation précoce (Mehlen P *et al*, 1997). L'expression de HSP27 est accrue dans de nombreux cancers, notamment dans le cancer du sein et le cancer du colon (Ciocca DR *et al*, 1983 ; Navarro D *et al*, 1989). Les tumeurs du cerveau expriment aussi souvent HSP27. L'expression de HSP27 influe sur la sensibilité des tumeurs à certaines drogues utilisées en chimiothérapie. Des taux de HSP27 élevés sont courants dans le cas de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Renkawek K *et al*, 1999). HSP27 est phosphorylée sur ses résidus Ser<sup>15</sup>, Ser<sup>78</sup> et Ser<sup>82</sup> par la protéine MAPKAP kinase-2, qui est une kinase active pendant l'inflammation (Kyriakis JM et Avruch J, 1996). Il semblerait que la phosphorylation influencerait sur l'état d'oligomérisation. Ainsi, phospho-HSP27 formerait de petits oligomères alors que la forme non phosphorylée de HSP27 formerait des oligomères de taille plus importante (Ito H *et al*, 2001 ; Koteiche HA et McHaourab HS, 2003). HSP27 participe à l'arrêt de la synthèse protéique en cas de situation de stress (Cuesta R *et al*, 2000) puis à la reprise de la synthèse lorsque le stress est évité (Carper SW *et al*, 1997). HSP27 participe au phénomène de « thermotolérance » (Berger EM et Woodward MP, 1983). HSP27 joue un rôle anti-apoptotique (notamment dans l'apoptose induite par le cis-platine et par le choc thermique modéré) (Garrido C *et al*, 1996 ; Samali A *et al*, 2001). HSP27 diminue et retarde le relarguage du cytochrome c et se lie à la caspase 3 (mais pas à l'AIF) (Bruey JM *et al*, 2000 ; Pandey P *et al*, 2000 A). HSP27 agit à différents niveaux de la cascade apoptotique. La forme phosphorylée de HSP27 aide à la stabilisation du cytosquelette :  $\gamma$ -HSP27 stabilise les microfilaments d'actine après un stress (par exemple après hyperthermie ou après un stress oxydant) (Lavoie JN *et al*, 1993 ; Huot J *et al*, 1997), alors que la forme non phosphorylée ralentit la polymérisation des filaments d'actine. Des mutations dans le gène codant pour la protéine HSP27 furent associées à une neuropathie motrice distale : la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Cette maladie se traduit, pour le patient atteint, par une atrophie des muscles du péroné et par une affection des nerfs périphériques (moteurs et sensitifs) (Evgrafov OV *et al*, 2004).

**HSP22** (annexe I-e) est un monomère qui interagit avec HSP27. HSP22 forme aussi des dimères stables liés par des ponts disulfures et des oligomères de plus haute masse et peu solubles (Benndorf R *et al*, 2001). La littérature montre en plus de l'auto-interaction de

HSP22, son interaction avec HSP27 et avec MKBP. HSP22 a deux domaines de liaison particuliers spécifiques pour les différents partenaires protéiques (Sun X *et al*, 2004). HSP22 interagirait aussi avec HSP20,  $\alpha$ -B cristalline et HSPB3 (Fontaine JM *et al*, 2005). Il serait donc possible de trouver, dans les cellules exprimant plusieurs types de sHSP, une grande variété d'oligomères qui seraient composés de différentes proportions de différents sHSP. Le fait que la protéine HSP22 posséderait ou non une activité kinase intrinsèque reste très controversé. HSP22 ne semble pas capable de phosphoryler la caséine ni l'histone III *in vitro* (Kim MV *et al*, 2004 A ; Kim MV *et al*, 2004 B). HSP22 est phosphorylée dans les myocytes par la protéine kinase C (PKC) sur Ser<sup>14</sup> et Thr<sup>63</sup> et par p44 mitogen activated protein kinase en Ser<sup>27</sup> et Thr<sup>87</sup> mais elle n'est pas phosphorylée par MAPKAP kinase-2, contrairement à HSP27 et à HSP20 (Landry J *et al*, 1992). HSP22 a montré une activité chaperonne *in vivo* dans des cellules en culture (Carra S *et al*, 2005). HSP22 augmenterait la résistance au stress oxydatif, chez la drosophile. HSP22 augmenterait, par ce biais, la durée de vie de la mouche (Morrow G *et al*, 2004). Chez la levure, HSP22 empêche l'aggrégation de la déshydrogénase, de même chez le Bovin, HSP22 empêche l'aggrégation due à la chaleur de la rhodanase (enzyme de détoxification : la rhodanase transfère une molécule de soufre sur un ion cyanide et le change ainsi en thiocyanate) (Kim MV *et al*, 2004 B). Chez l'homme, la mutation K141N, 12q24.3 est la cause d'une neuropathie motrice distale héréditaire de type II (Irobi J *et al*, 2004 A ; Irobi J *et al*, 2004 B). Cette maladie se transmet par mode autosomal récessif. HSP22 est surexprimée dans les neurones moteurs et sensoriels de la moëlle épinière. Lorsque HSP22 est mutée, elle permet la formation d'agrégats intracellulaires. Cette maladie se déclare chez le sujet âgé de 14 à 35 ans et se manifeste par une faiblesse dans l'extension des orteils et une faiblesse dans les muscles extenseurs des pieds. L'évolution à 5ans conduit à une paralysie complète de tous les muscles distaux des membres inférieurs et ensuite la paralysie gagne les membres supérieurs. Néanmoins, la conduction le long des nerfs continue de se faire à vitesse normale. Une autre mutation, R78M, serait la cause d'un autre type de dystrophie motrice héréditaire : la maladie de Charcot-Marie-Tooth. La structure de HSP22 reste inconnue à ce jour et un des objectifs de cette thèse est de réaliser l'étude structurale de cette protéine.

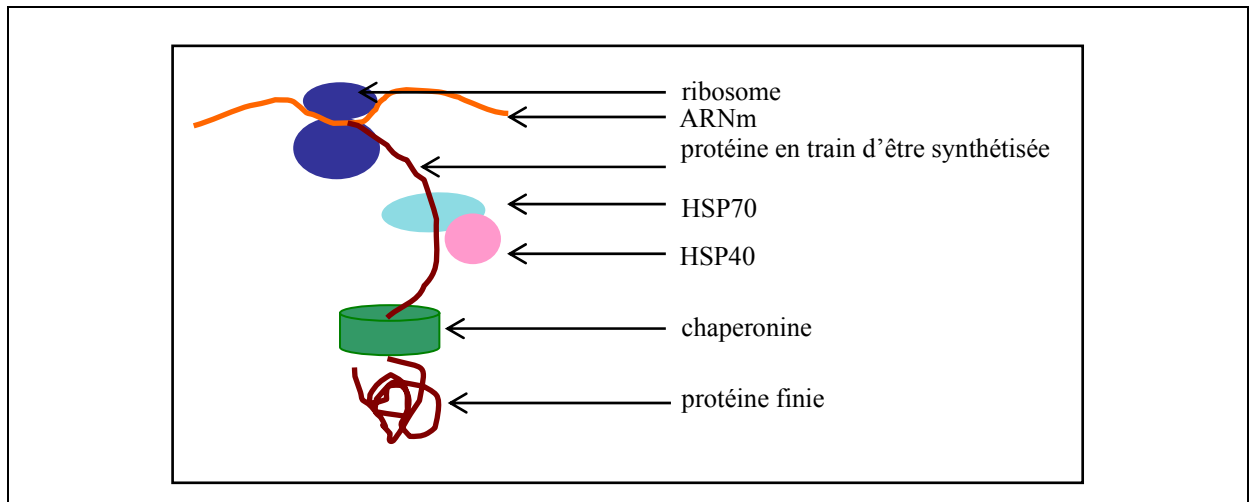
### **II.1.2- La fonction chaperonne des protéines HSP**

Les Heat Shock Proteins (HSP) appartiennent à la famille des chaperonnes et représentent la famille protéique principale (aussi bien en nombre qu'en variété) parmi les chaperonnes moléculaires. La fonction « chaperonne » se décrit, pour une protéine, comme *accompagnatrice*, c'est-à-dire que la *protéine chaperonne* va pouvoir aider et accompagner les autres protéines.

Le stress a souvent pour effet de dégrader les protéines. Les protéines dénaturées ont alors tendance à s'agréger. Les protéines chaperonnes interviennent à ce moment.

Les HSP ont toutes été reconnues comme étant des protéines chaperonnes, si bien que souvent dans la littérature la fonction est confondue avec la famille, et, que « HSP » est souvent remplacé par « protéine chaperonne ». Les protéines chaperonnes aident la cellule à vivre et à fonctionner. Par exemple, les chaperonnes «tamponnent» les mutations ayant un impact sur la structure (et par conséquent sur la fonction) en permettant aux peptides mutés de se plier en une structure fonctionnelle (Csermely P *et al*, 2003). Les protéines chaperonnes diminuent les effets létaux dus aux stress: elles aident au repliement des protéines (et de l'ARN) mal pliées ou dégradées ou néo synthétisées (figure 21), elles forment des complexes avec des protéines non natives, empêchant ainsi l'accumulation de protéines mal pliées (Csermely P *et al*, 2003).





**Figure 21) Fonction des Heat Shock Proteins dans la synthèse protéique**

Représentation schématique d'un ARN messager en train d'être traduit en protéine par le ribosome. Les chaperonnes HSP70 et HSP40 replient la chaîne d'acides aminés néosynthétisées, d'une façon ATP dépendante. La chaperonine (HSP60+HSP10) aide aussi à la conformation de la protéine néosynthétisée. La protéine native (c'est-à-dire pliée correctement) (en rouge) va pouvoir être exportée dans le compartiment cellulaire dans lequel elle va présenter sa fonction spécifique (d'après la revue du Pr Hartl FU, 1996).

Les protéines doivent être pliées dans leur conformation tridimensionnelle propre pour pouvoir fonctionner normalement. Les protéines chaperonnes aident les autres protéines à acquérir leur structure tridimensionnelle (Csermely P *et al*, 2003). Le repliement des protéines se fait en trois étapes principales *in vitro*. Il commence par la formation des hélices  $\alpha$  parce que la participation des acides aminés adjacents est requise. La formation des feuillettes  $\beta$  vient ensuite. Les feuillettes  $\beta$  permettent l'établissement des ponts hydrogènes entre les acides aminés qui sont loin les uns des autres sur la séquence primaire. La première étape est caractérisée par la formation d'un état intermédiaire : « molten globule » ou amas globulaire qui est constitué par un cœur hydrophobe entouré d'eau (pour une protéine de masse molaire supérieure à 30kDa, cet état peut être relativement stable). Les dernières étapes du repliement sont les moins rapides et aussi les plus limitantes. Le cœur hydrophobe est réorganisé et des liaisons à forte énergie sont formées (par exemple : les ponts disulfures ou les liaisons ioniques au encore les isomérisations cis/trans des prolines). L'énergie libre de ces produits permet la formation locale de structures protéiques de haute énergie qui sont thermodynamiquement instables mais qui sont stabilisées par le reste de la protéine. Ces segments de haute énergie peuvent se stabiliser à l'aide d'autres molécules. Le repliement des protéines n'est pas un processus direct : il peut, dans certains cas, être réversible, ou au contraire, s'arrêter définitivement. Les chaperonnes moléculaires se fixent sur les ribosomes et attendent la chaîne naissante des acides aminés. Lorsque la chaîne d'acides aminés est en cours de synthèse, les chaperonnes moléculaires s'y fixent pour empêcher des repliements prématurés avant que la chaîne polypeptidique ne soit entière.

L'agrégation de protéines et le mauvais repliement des protéines sont les causes primaires de nombreuses maladies humaines comme la maladie d'Alzheimer ou le diabète de type 2 par exemple. *In vitro*, la présence des chaperonnes ne semble pas nécessaire au repliement des protéines néosynthétisées ; mais *in vivo* le processus est plus complexe et nécessite alors la présence des chaperonnes moléculaires (Lee S *et al*, 2005). Lorsque le repliement des protéines dégradées est impossible, le rôle des protéines chaperonnes consiste à accompagner les protéines endommagées jusqu'au protéosome qui va pouvoir les détruire. Le repliement des protéines dégradées à cause d'un stress ne se fait qu'après la restauration des conditions physiologiques. Avant que les conditions physiologiques ne soient revenues à la normale, les protéines dégradées seront associées aux protéines chaperonnes, constituant des « réservoirs » de protéines mal conformées (dénaturées ou partiellement dénaturées) d'une façon ATP-indépendante. La re-conformation des protéines dégradées, après retour à la normale, se fera d'une façon ATP-dépendante (Lee GJ *et al*, 1997).

Remarque : Particularité des sHSP en tant que chaperonnes :

Les sHSP sont aussi des chaperonnes, même si elles fonctionnent sans co-chaperonne et sans ATP (Horwitz J, 1992 ; Jakob U *et al*, 1993). Leur rôle, en tant que chaperonnes, se limite à l'interaction avec les protéines dénaturées. Elles empêchent l'agrégation des protéines mal pliées mais ne parviennent en aucun cas à les replier.

Les protéines chaperonnes permettent aussi l'adressage des protéines dans le compartiment cellulaire adéquat.

Les chaperonnes moléculaires participent aussi à l'organisation de l'architecture du cytosquelette en se liant aux filaments d'actine et aux tubulines (Csermely P *et al*, 2003). Elles ont aussi la capacité de stabiliser les lipides membranaires.

Les chaperonnes sont des enzymes peu efficaces et leurs interactions se font avec une faible affinité. Le nombre de protéines considérées comme appartenant aux chaperonnes moléculaires augmente en même temps que les connaissances du protéome humain.

Les protéines chaperonnes possèdent une fonction bien reconnue dans la présentation de peptides du non soi au système immunitaire. Plusieurs médicaments d'usage courant et notamment l'aspirine ont la capacité d'induire le système de défense immunitaire auquel participent les chaperonnes.

Une certaine partie des chaperonnes totales d'un même organisme a tendance à s'oligomériser. Les chaperonnes forment généralement des dimères et tendent à s'associer en tétramères ou en hexamères ou en octamères et parfois même en oligomères encore plus importants.

La structure ou conformation tridimensionnelle de la protéine, tout comme l'enchaînement ordonné des acides aminés constituant la protéine, est inscrite dans le gène codant pour la protéine. Les protéines chaperonnes aident au repliement de la protéine dans sa conformation tridimensionnelle propre ou *native* (Wickner S *et al*, 1999).

### **II.1.3- Rappels portant sur la cristallographie des protéines**

#### **II.1.3.1- De la protéine au cristal**

Un des dogmes très usité en biologie énonce que « de la structure d'une protéine découle sa fonction ». C'est pourquoi, dans le but de mieux connaître ces protéines HSP70-1 et HSP22, une étude structurale a été initiée. La présence du synchrotron ESRF, grâce au flux surpuissant et intense de rayonnement X qu'il délivre, permet de réaliser l'étude structurale des protéines par une méthode particulière : la cristallographie par rayonnement X. Cette méthode consiste à obtenir des figures de diffraction à partir de cristaux protéiques. La transformée de Fourier permet ensuite de passer des figures de diffraction à la densité électronique de la protéine d'intérêt et ainsi de remonter jusqu'au modèle tridimensionnel.

Il existe plus de 31 700 structures (c'est-à-dire de formes en trois dimensions) de protéines déposées à la Protein Data Bank (banque de données regroupant toutes les structures de protéines connues: <http://www.rcsb.org/pdb>). La majorité de ces structures est d'origine bactérienne. Moins de 10% des structures connues sont d'origine humaine. La première structure protéique résolue par cristallographie (rayons X) date de 1958 (myoglobine ; Kendrew JC *et al*, 1958, PDB code : 1MBN) et la première résolue par RMN (c'est-à-dire la méthode de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire) date de 1984. De plus en plus de structures sont aujourd'hui résolues par cryomicroscopie électronique. Environ cent structures sont déposées chaque semaine. La structure est nécessaire pour une meilleure compréhension de la fonction de la protéine mais la structure n'est pas suffisante pour tout comprendre. Seule l'étude structurale réalisée par cristallographie par rayons X nécessite la réalisation de cristaux protéiques, les autres méthodes utilisent, quant à elles, une solution de protéine purifiée. Malgré cette difficulté technique supplémentaire, la technique de cristallographie par rayons X est souvent préférée. En effet, il n'y a pas de limitation de taille pour la protéine, contrairement à la RMN où la taille maximale est d'environ 30 kDa, ni de limitation pour les détails structuraux (à condition d'obtenir une résolution suffisante), contrairement à cryomicroscopie électronique qui permet de « visualiser » les feuillettes  $\beta$  et les hélices  $\alpha$ . La RMN est basée sur l'attribution des résonances des protons H, ce qui permet de déterminer leur position relative et ainsi d'obtenir une résolution identique à celle de la cristallographie par rayons X. Toute fois, lorsque la taille de la molécule augmente, des mesures avec des protéines deutériées ou marquées au  $^{13}\text{C}$  ou au  $^{15}\text{N}$  sont nécessaires pour l'attribution des résonances de tous les atomes.

Il existe plusieurs niveaux de structure.

**La structure primaire** correspond uniquement à l'enchaînement des acides aminés liés entre eux par liaisons peptidiques. Un autre niveau d'interaction est déjà observé à ce stade entre des acides aminés non liés par la liaison peptidique et éloignés (ex : les ponts disulfures, les liaisons faibles, les interactions électrostatiques...).

**La structure secondaire** comprend trois arrangements principaux: l'hélice  $\alpha$ , le feuillet  $\beta$  et la bobine (ou « coil » en Anglais). L'hélice  $\alpha$  est une structure rigide, stabilisée par les liaisons hydrogènes (3,6 acides aminés par tour). Les chaînes latérales des acides aminés sont dirigées vers l'extérieur. Le plan plissé  $\beta$  est constitué de brins anti-parallèles ou parallèles (cette deuxième conformation requiert plus d'énergie). Ce plan est stabilisé parce qu'il forme des *feuilletts*  $\beta$ . Le tout se présente sous forme de dents de scie avec des chaînes latérales des acides aminés situées de part et d'autre. Lorsque cette structure en dents de scie réalise un tour complet, la structure résultante est appelée *tonneau*  $\beta$  (figure 22).

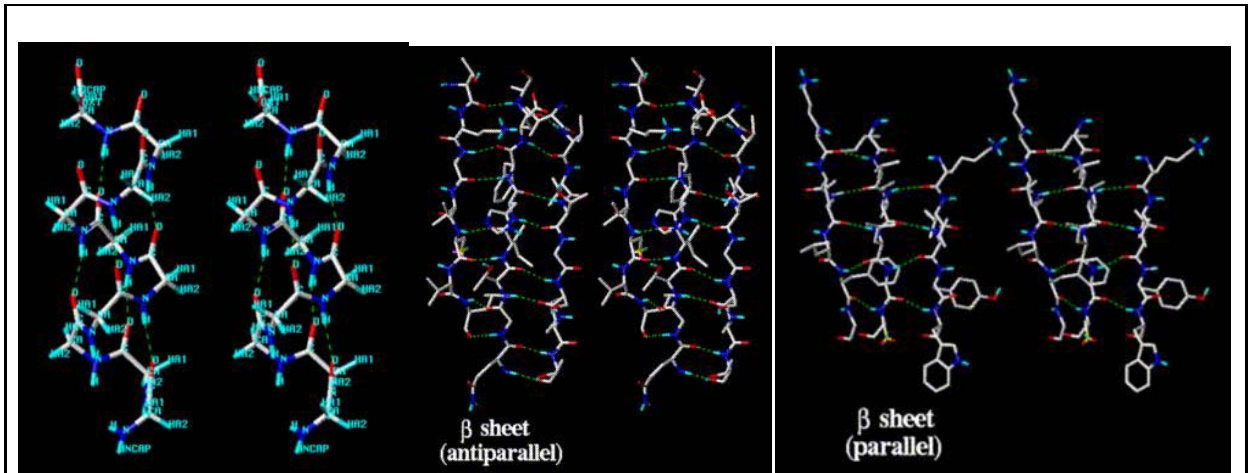
Il existe aussi des structures nommées **structures super secondaires**. Appartiennent à ce type de structure notamment les « EF-hands » des protéines fixant le calcium  $\text{Ca}^{2+}$ , les hélices-tour-hélices des protéines interagissant avec l'ADN, les « Rossmann folds » et les « Greek keys ».

**La structure tertiaire** est celle qui est donnée par l'étude par cristallographie par rayons X. Elle comprend notamment les conformations globulaires, fibreuses et membranaires. Ces structures-là sont retrouvées dans les banques de données. Plus de 85% des structures de protéines déposées à la PDB ont été résolues par cristallographie avec rayons X, le restant provient de la résonance magnétique nucléaire. La résolution des structures protéiques par (cryo)microscopie électronique est aussi possible aujourd'hui (limite de résolution pour la structure 3D : 4-5 Å, c'est-à-dire qu'il est possible de visualiser les feuilletts  $\beta$  et les hélices  $\alpha$ ).

Les différents repliements possibles font eux aussi l'objet d'une classification. Le motif  $\alpha/\beta$  est le motif le plus fréquemment répandu parmi les protéines (voir figure 23).

**La structure quaternaire** représente l'association des sous unités monomériques en oligomères de taille plus importante, nommée *oligomérisation*. La protéine est constituée d'un ensemble de domaines plus ou moins stables et dynamiques. Si ces domaines bougent de trop les uns par rapport aux autres, la cristallisation devient difficile. Le mouvement de parties de protéine les unes par rapport aux autres peut montrer une grande amplitude de durée : de  $10^{-15}$  (chaîne latérale) à  $10^3$  secondes (domaine plus vaste).

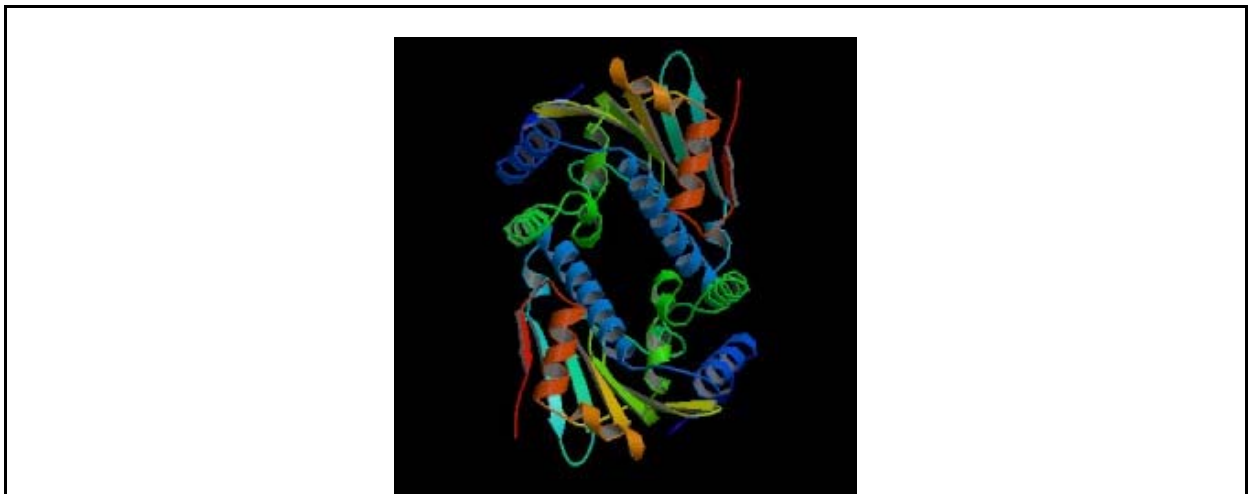
Lorsque la protéine est repliée dans sa conformation dite « native », elle peut encore subir des modifications nommées *modifications post-traductionnelles*\*. Ces modifications varient suivant l'acide aminé sur lequel elles se font. La modification la plus courante est certainement la phosphorylation, mais il en existe d'autres comme l'acétylation et la méthylation qui sont aussi des ajouts de groupes chimiques, ou encore la glycosylation ou l'ajout d'un lipide (voir tableau II, annexe II). L'ubiquitination est particulière puisque lorsqu'une protéine est *ubiquitinée*, cette dernière est dirigée vers le protéasome pour y être dégradée. Lorsque la protéine a subi ses modifications post-traductionnelles, elle est dite *mature*. D'autres types de modifications sont possibles comme les troncutures, par exemple. Ainsi, la pro-caspase3 est clivée en caspase 3 lors de sa maturation.



**Figure 22) Structures secondaires**

A gauche, l'hélice  $\alpha$ . Au centre, les feuillets  $\beta$  anti-parallèles ou à droite les feuillets  $\beta$  parallèles. Ces images proviennent du site web :

<http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/jouhou/image/protein/2ndst/2ndst.html>.



**Figure 23) Motif  $\alpha/\beta$ , structure de HSP90, *Homo sapiens sapiens*, (Stebbins CE *et al*, 1997)**

Observation de la même proportion de feuillets  $\beta$  (représentés conventionnellement par une flèche) que d'hélices  $\alpha$  (représentées conventionnellement par une hélice schématisée ou par un cylindre). C'est ce que l'on nomme le motif  $\alpha/\beta$ . Ici, il n'y a pas de structure quaternaire puisque la protéine ne s'oligomérisse pas mais reste sous forme monomérique. PDB code : 1YER.

Pour résumer en quelques points importants :

- La dynamique des protéines peut être déterminée par spectroscopie, diffusion de neutrons, RMN et dynamique moléculaire.
- Lors d'une détermination de structure, il est possible de découvrir des ions (rôle structural ou rôle fonctionnel).
- Grâce à l'homologie entre les protéines, un domaine donné peut être relié à la fonction qui lui correspond.

La cristallographie des protéines s'effectue en plusieurs étapes successives :

- 1- Production et purification de la protéine à cristalliser.
- 2- Cristallisation
- 3- Caractérisation de ces cristaux par diffraction aux rayons X (mesures des intensités de diffraction, détermination des phases)
- 4- Calcul et amélioration des cartes de densité électronique (les électrons sont visibles donc les atomes peuvent être positionnés) : construction du 1<sup>er</sup> modèle et affinement
- 5- Etude des relations entre structures et fonctions (hypothèses de mécanismes et validation de ces hypothèses par création de mutants et comparaison de leurs structures).

Le cristal est un empilement régulier de molécules *homogènes* dans les trois dimensions de l'espace (même type de molécule et même conformation). Pour que la cristallisation puisse se faire, il faut obligatoirement que la solution protéique soit très pure (plus de 90%) et monodisperse (une seule espèce protéique). Du fait de l'orientation identique de toutes les molécules du cristal, il existe un phénomène d'amplification énorme de la lumière reçue par un cristal, et ce dans certaines directions seulement.

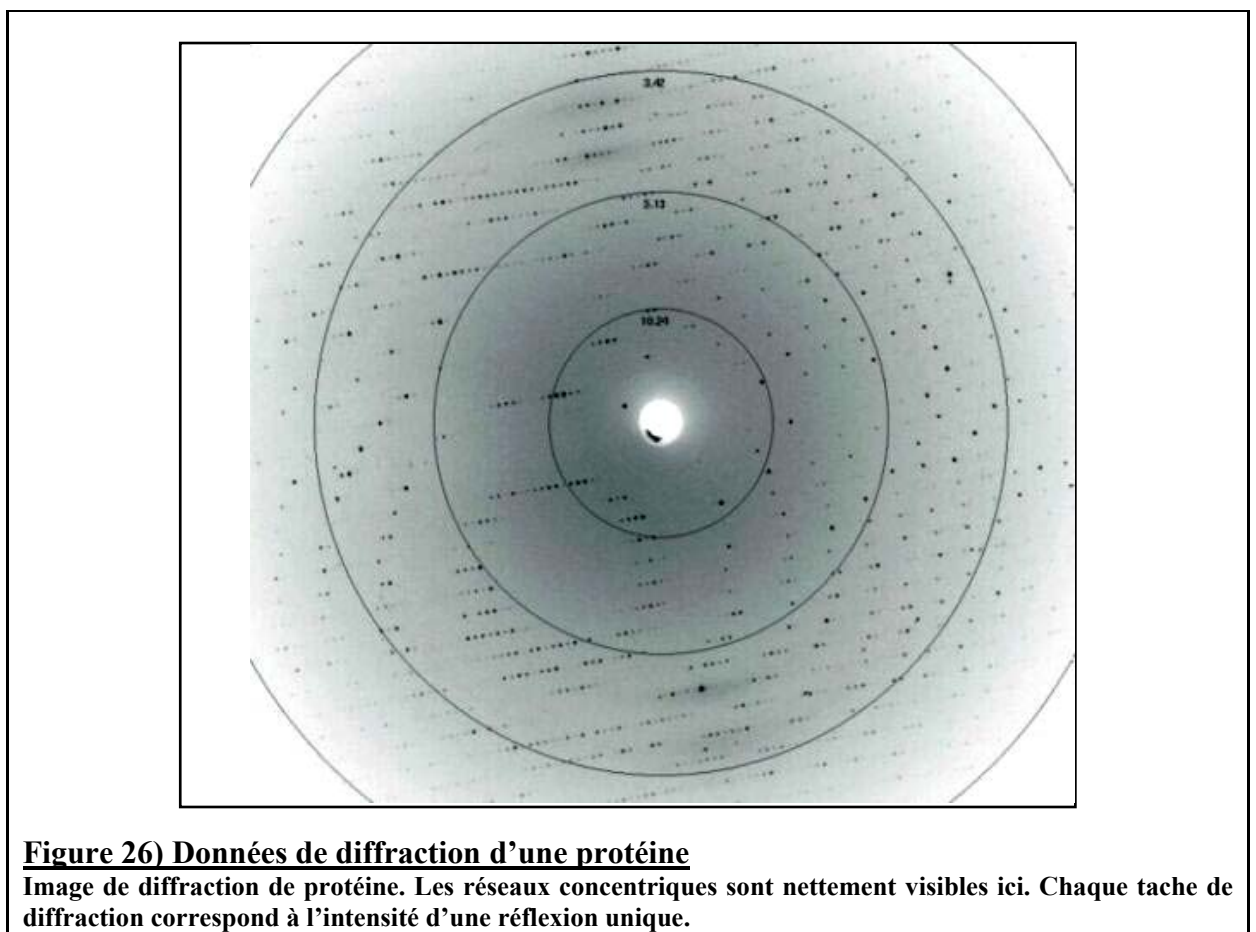
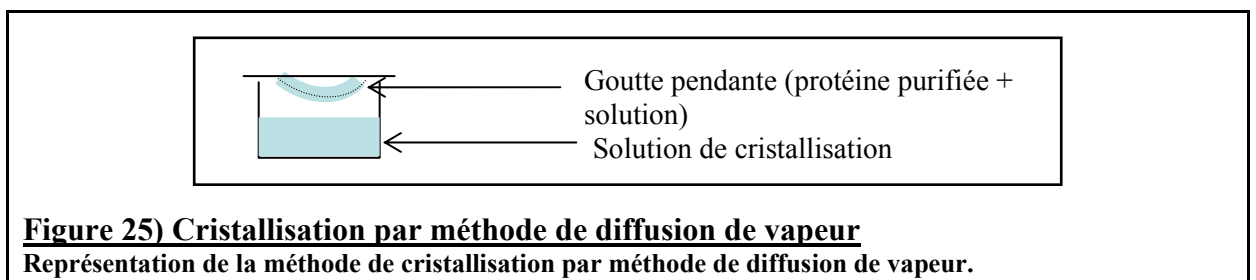
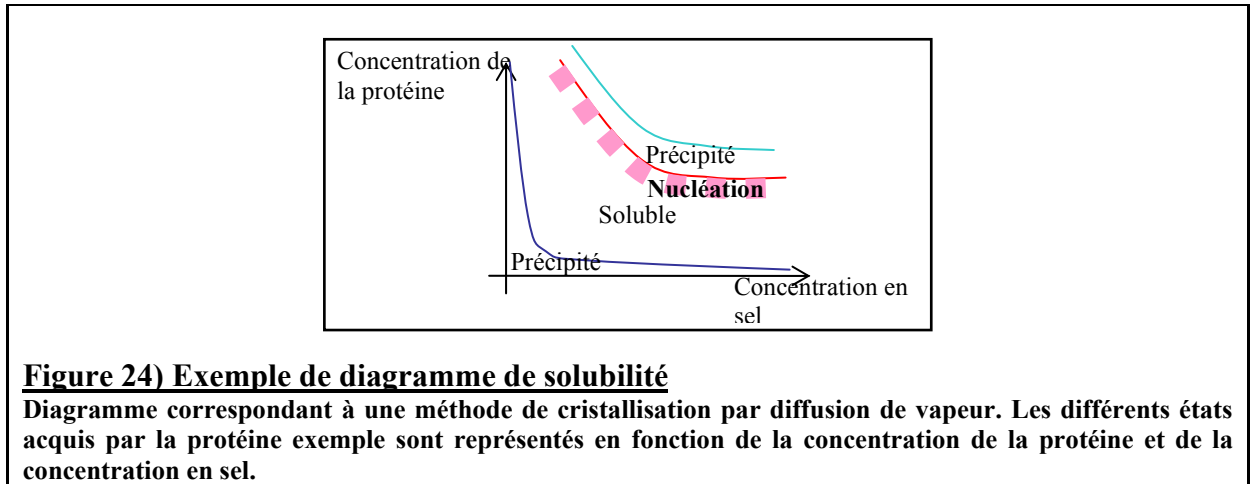
Max von Laue a eu le premier l'idée d'irradier les cristaux avec des rayons X et ce dès les années 1912-1920. Les longueurs d'onde des rayons X (comprises entre 0,01 et 10 nm) sont de l'ordre des réseaux atomiques des différents réseaux cristallins et peuvent être utilisées pour l'analyse de la composition atomique du cristal.

Un cristal est constitué en moyenne de 50% de solvant (lui-même composé essentiellement d'eau, soit de 30 à 70% du volume total) et de 50% des molécules dont la structure est à déterminer. La structure du cristal ressemble vraiment à la réalité même si une seule conformation moyennée est visible sur l'ensemble des conformations des protéines du cristal. Par exemple, il reste possible de faire diffuser un substrat dans un cristal protéique (dont les protéines constituantes sont spécifiques de ce substrat) et observer la réaction chimique qui s'effectue en conditions normales.

Dans la cristallisation, deux phases sont distinguées:

- 1- la nucléation (l'amorce de la cristallisation ; elle peut être facilitée par la présence d'un élément externe, comme une poussière par exemple, qui constitue le noyau de cristallisation)
- 2- la croissance cristalline (la formation du cristal proprement dit à partir de noyau de cristallisation)

Les deux phases ne nécessitent pas exactement les mêmes conditions. Le diagramme de solubilité (figure 24) est variable : il est différent pour chaque protéine et varie aussi avec la méthode de cristallisation utilisée.



Pour le décrire, une très grande quantité de protéine est nécessaire. Ce diagramme n'est donc généralement pas réalisé. Les procédures expérimentales sont définies de façon à avoir le plus de chances possibles pour que la protéine choisie cristallise. Il existe plusieurs types de précipitants et plusieurs méthodes pour procéder à la cristallisation :

- 1- « Salting out » (le plus utilisé) : consiste en l'utilisation d'une forte concentration de sel qui va pomper l'eau
- 2- « Salting in » : utilisation d'une faible concentration en sel (masquage des charges)
- 3- Effet entropique : utilisation du PEG (polyéthylène glycol) avec différentes longueurs de chaînes
- 4- Effet de solvant : MPD (méthylpentane diol). Cette méthode est basée sur l'utilisation de la force électrostatique (pour des protéines chargées).

Il existe encore bien d'autres solvants. Le pH et/ou la température peuvent être modifiés. Des ions peuvent être ajoutés à la solution protéique pour faciliter la cristallisation de la protéine (ex : thiocyanate, citrate, sulfate, phosphate...). Ils vont pouvoir interagir avec la protéine et masquer les charges. Des détergents peuvent aussi être ajoutés ; ils servent à masquer la partie hydrophobe de la protéine. L'ajout du ligand naturel ou du substrat de la protéine peut aussi parfois faciliter sa cristallisation.

### **II.1.3.2- Cristallographie à l'ESRF**

Pour pouvoir étudier la structure tridimensionnelle des protéines à l'aide du synchrotron, il est nécessaire de réaliser des cristaux protéiques. C'est pourquoi, l'équipe de cristallographie de l'ESRF suit un modèle optimal pour l'obtention de cristaux (par exemple : Leiros I *et al*, 2005). Après avoir choisi la protéine sur laquelle ils vont travailler, les chercheurs de l'équipe augmentent la quantité d'ADN codant pour la protéine *in vitro* par une méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction). Cette séquence d'ADN est ensuite insérée dans un vecteur pour le clonage. L'expression protéique est réalisée au laboratoire dans différentes souches de bactéries (*Escherichia coli*). Les conditions d'obtention optimales de la protéine soluble sont déterminées. La protéine choisie est purifiée sur colonnes de chromatographie (cette étape est souvent composée de plusieurs niveaux, variant au cas par cas suivant la protéine étudiée) puis les produits purifiés sont mis sur des plaques multi puits servant à la cristallisation.

Les protéines purifiées doivent être impérativement suffisamment *concentrées* (la concentration dépend de la protéine et de sa stabilité) et *suffisamment pures* : à plus de 90%. Les différents puits contiennent des solutions de composition et concentration variées pour faciliter la nucléation et la croissance des cristaux protéiques. Ces solutions aussi appelées « screens de cristallisation » peuvent être soit achetées (ex : Magic screen de chez Biogenova (Toronto, Canada)) ou réalisées directement au laboratoire à partir de différents composants. C'est la méthode de diffusion de vapeur par l'utilisation des gouttes pendantes qui est principalement utilisée dans le laboratoire (figure 25).

La solution de cristallisation s'évapore de la goutte, et donc, les concentrations de la protéine et du sel augmentent, ce qui facilite la cristallisation. Quand les cristaux sont prêts, ils sont alors placés dans le faisceau de rayons X sur la ligne de lumière et suivant la longueur d'onde à laquelle ils diffractent, la résolution obtenue sera haute ou non (plus les cristaux protéiques diffractent à une longueur d'onde proche de 1 Angström ( $10^{-10}$  mètres) et plus la résolution sera haute). Le cristal est cryoprotégé dans le but de limiter les dégâts générés par l'irradiation lors de la collecte de données. Les données de diffraction sont obtenues pendant l'irradiation du cristal protéique (un cristal à la fois est étudié).



Le traitement des données comprend trois étapes :

- 1- Détermination des paramètres du cristal : la maille primitive, le groupe d'espace, la mosaïcité et l'orientation.
- 2- Indexation des images de diffraction (en intégrant les intensités des rayons X diffractés, en tenant compte de l'orientation du cristal et des paramètres du détecteur)
- 3- Réduction des données en les plaçant toutes sur une même échelle et en fusionnant les multiples observations et en rejetant les données trop externes.

Il reste à déterminer les paramètres du cristal. La symétrie du cristal est déterminée au préalable et elle permet de ne pas mesurer les données en effectuant une rotation de 360° comme cela est le cas si le cristal ne présente aucune symétrie (symétrie de type P1, système triclinique). Il reste alors à multiplier les données obtenues en fonction de la symétrie du cristal pour retrouver la totalité des informations. Il existe plusieurs types de symétrie possible (c'est-à-dire 32 classes et 14 types de réseaux, déterminés en 1848 par le physicien français A. Bravais). Les axes les plus courants sont d'ordre 2 (systèmes monoclinique, orthorhombique). Une maille trigonale a un axe de symétrie d'ordre 3. Les mailles cubique, hexagonale et rhomboédrique ont un axe d'ordre 4. Les axes d'ordre 6 existent aussi (maille hexagonale). Souvent, les cristaux protéiques ont une symétrie notée  $P_{xyz}$  en fonction des différents axes  $xyz$  et l'indice noté représente l'opération de symétrie à effectuer pour retomber sur une maille identique. Le cristallographe Français R. Haüy a défini des indices ( $P, Q, R$ ) qui permettent de repérer dans l'espace les faces d'un cristal. Le cristallographe Anglais W.H. Miller a simplifié les indices de Haüy : les indices de Miller sont définis comme étant les inverses des indices de Haüy ( $1/P, 1/Q, 1/R$ ) et ils sont notés  $h, k, l$ .

En moyenne de 45 à 360 images de diffraction sont enregistrées par jeu de données. Ces images sont traitées et une intensité  $I(h,k,l)$  est obtenue pour toutes les positions. Chaque onde lumineuse possède plusieurs caractéristiques : sa longueur d'onde  $\lambda$ , son intensité. La somme des ondes lumineuses est caractérisée par son amplitude  $|F_{hkl}|$  et sa phase  $\phi$ . Les longueurs d'onde vont se combiner en un spot de diffraction. La phase résulte de la somme de ces ondes. La phase est déterminée par la distance d'un atome au plan de référence (c'est-à-dire la limite de la maille primitive) (Drenth J pour le livre « Principles of Protein X-ray Crystallography », éditions Springer-Verlag Inc, 1999).

Les ondes diffusées comportent une information sur la molécule qu'elles ont traversée. La diffusion fait intervenir la densité électronique  $\rho(x,y,z)$  où :

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} \cdot \exp[-2\pi i(hx+ky+lz)].$$

$V$  est le volume de l'unité asymétrique et le facteur de structure  $F_{hkl}$  est défini par la fonction suivante :

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \cdot \exp[2\pi i\phi_{hkl}]$$

Avec

$$F_{hkl} \propto \sqrt{I_{hkl}}$$

Plus il y a d'électrons et plus la diffusion va être forte. La diffraction se différencie de la diffusion par le fait que comme les molécules constituant le cristal sont toutes orientées selon

une même direction, le phénomène d'amplification de la lumière est effectif dans *certaines* directions seulement. L'amplitude de la somme des ondes diffractées peut être mesurée grâce à la présence de plusieurs molécules orientées toutes de la même façon (présence nécessaire du cristal). La détermination de la phase est le processus le plus compliqué. L'espace direct est défini par les molécules et les atomes. L'espace réciproque (h, k, l) est défini par les points qu'il contient. Il faut toutes les taches de diffraction pour remonter à l'espace direct par une transformée inverse de Fourier. L'image typique obtenue après optimisation de la collecte de données pour une protéine se présente sous forme d'un réseau (« lattice » en Anglais) plus ou moins concentrique (figure 26).

La qualité d'un cristal se détermine aussi par rapport à l'allure des taches de diffraction et à leur répartition par rapport au centre. Il faut également un espacement des taches régulier et des taches bien nettes, bien alignées sur toute l'image. La relation de distances entre l'espace réel (la taille de la maille cristalline) et l'espace réciproque (tâches de diffraction) est inverse. La dimension de la maille du cristal est inversement proportionnelle à l'espace de diffraction. L'intensité des taches est plus importante encore que leur position (puisque c'est l'intensité qui va donner une idée sur le contenu de la maille du cristal). Dans la maille élémentaire du cristal, il peut y avoir une ou plusieurs molécules et des symétries sont probables. Il est ainsi possible de déterminer l'unité asymétrique. Si l'unité asymétrique et l'opération de symétrie sont connues, alors, il devient possible de repasser à la maille élémentaire entière du cristal. Finalement, il n'y a qu'une partie de l'espace qui est utilisée et l'intensité peut être moyennée ensuite.

La notion de résolution est liée à la qualité du cristal (empilement plus ou moins régulier) et cela se traduit par de la diffraction trouvée plus ou moins loin. La limite de diffraction se traduit par une limite dans la résolution de la structure.

La loi de Bragg dit que :

$$2d\sin\theta = n\lambda$$

Où d est la distance entre les plans de diffraction et où l'angle  $\theta$  est l'angle que fait le rayon lumineux avec le plan F(h,k,l). Si  $\theta$  est grand, alors d est petit et des détails moléculaires plus fins sont visibles. La meilleure résolution qu'il soit possible d'obtenir se situe entre 0,5 et 1 Å (dans ce cas-là, ce sont des cristaux exceptionnels). Entre 1 à 2,5Å : la résolution est quasiment atomique. Entre 2,5 à 4 Å : la chaîne polypeptidique avec son repliement et sa structure secondaire est obtenue. Entre 4 à 15 Å : seule la forme globale de toute la molécule est obtenue.

La phase  $\phi$  apparue dans l'équation du facteur de structure  $F_{hkl}$  reste à être déterminée. Il existe plusieurs méthodes et plusieurs cas de figure. La première méthode et la plus fréquemment utilisée est le **remplacement moléculaire**. Il faut pour cela connaître la structure d'au moins un homologue (c'est-à-dire une protéine possédant *au minimum 50%* d'identité avec la protéine d'intérêt). A l'aide de logiciels spécialisés, les données obtenues expérimentalement avec les données structurales de la protéine homologue sont superposées (par translation et par rotation) (Rossmann MG et Blow DM, 1962). Ceci nécessite d'avoir à disposition des données de la meilleure résolution possible (proche de l'Angström).

Lorsqu'il n'a aucune structure homologue à disposition, il faut avoir recours à d'autres méthodes de phasage comme les méthodes de SIR, MIR, MAD ou SAD. Il est possible, par exemple, d'utiliser une méthode de **remplacement isomorphique** (SIR « Single Isomorphous Replacement » ou MIR pour « Multiple Isomorphous Replacement ») (Green DW *et al*, 1954 ; Harker D, 1956). Par cristallographie synchrotron, seuls les atomes autres

qu'hydrogène sont visibles (sauf cas de résolution exceptionnelle). Dans ce cas-ci, des atomes lourds sont utilisés pour pouvoir déterminer la phase. Les rayons X sont sensibles aux électrons, donc plus l'atome a un  $Z$  élevé, plus il possède d'électrons et plus il sera visible. C'est pourquoi les cristaux des protéines qui ne possèdent pas d'atomes lourds dans leur structure sont incubés dans des solutions contenant des atomes lourds. Les atomes lourds ajoutés ne doivent pas perturber l'organisation du cristal et ni modifier la maille élémentaire. Les phases sont ensuite obtenues en comparant les données obtenues pour la protéine native (sans aucun ajout) avec les données obtenues pour le cristal dérivé (contenant l'atome lourd).

Les deux types de cristaux (dérivés et natifs) doivent impérativement être *isomorphes*, c'est-à-dire qu'ils doivent être identiques hormis la présence de l'atome lourd. Les amplitudes du cristal dérivé (ph), du cristal natif (p) et de l'atome lourd (h) sont reliées par l'équation suivante:

$$F_p = F_{ph} - F_h$$

Les **méthodes MAD** (multiple wavelength anomalous dispersion) ou **SAD** (single wavelength anomalous diffraction) sont des méthodes de diffusion anormale. Elles sont basées sur la propriété qu'il existe une résonance électron-atome particulière pour une longueur d'onde donnée et un type d'atome donné. Ce sont les atomes les plus lourds qui ont ce type de résonance. Le sélénium est l'atome lourd le plus fréquemment utilisé parce que son pic de résonance se trouve vers l'Angström et qu'il est très voisin du soufre des méthionines, ce qui rend son incorporation plus facile dans les protéines. Cette méthode consiste à l'ajout de méthionines sélénées pendant la production des protéines. Ainsi, des bactéries particulières (souche spéciale d'E.coli qui ne peut pas synthétiser les méthionines : souche auxotrophe pour le méthionine) sont mises en culture dans un milieu spécial contenant des méthionines sélénées pour que les protéines les incorporent au cours de leur fabrication. Il reste à comparer les données de diffraction obtenues pour le cristal natif et pour le cristal sélénié. Cette méthode permet de positionner directement les méthionines (Karle J, 1980 ; Karle J, 1991, Hendrickson WA, 1985 ; Smith JK, 1997).

Pour positionner une molécule d'eau, c'est plus compliqué puisque seul l'oxygène est visible (et non les hydrogènes). Certaines molécules d'eau dites *molécules d'eau structurales* sont importantes pour la structure ou pour le site actif de la protéine. La détection des molécules d'eau dépend beaucoup de la résolution (il faut être en dessous de 2,0Å). Les molécules d'eau présentes dans la structure ajoutent de la dispersion à l'intensité  $I$  mesurée. Ceci se visualise au niveau du bruit de fond.

Grâce aux phases, la densité électronique de la protéine peut être obtenue. Le premier modèle peut alors être construit. Après viennent toute une série d'affinements qui aboutissent à la modélisation de la structure finale de la protéine. Lors des phases d'affinement, le but est de coller le mieux possible aux  $|F_{\text{observés}}|$  et que  $(x,y,z) TF \rightarrow |F_{\text{calculés}}|$  avec  $|F_{\text{calculés}}|$  le plus proche possible de  $|F_{\text{observés}}|$ . ( $TF$  : *Transformée de Fourier*). Il reste à minimiser pour avoir une différence minimale entre  $|F_{\text{calculés}}|$  et  $|F_{\text{observés}}|$ . Une autre information est apportée par la stéréochimie sur la longueur et l'angle des liaisons, et, comme les valeurs à l'équilibre sont connues, il suffit de s'en rapprocher.

Plus la résolution est haute et plus il est possible d'affiner. Lorsque tous ces affinements sont réalisés, la structure est publiable et prête à être déposée dans la Protein Data Bank (PDB).

## II.2- Matériels et méthodes: cristallographie des protéines

La préparation des protéines à la cristallographie comprend plusieurs étapes successives présentées ici dans l'ordre chronologique de leur réalisation.

### II.2.1- Clonage

La "polymerase chain reaction" (PCR) consiste en l'amplification spécifique, *in vitro*, d'un gène donné. Cette étape facilite et augmente les chances de réussite du clonage. Les deux amorces servant à l'amplification sont pourvues d'une séquence complémentaire du début et de la fin du gène à amplifier, ainsi que d'un site de restriction (un site de restriction différent pour chaque amorce) correspondant à l'une des deux enzymes qui sera utilisée lors du clonage. Le fait d'utiliser deux enzymes de restriction différentes permet d'éviter de positionner le gène d'intérêt dans le sens inverse au moment de la ligation avec le plasmide. De plus, l'amorce correspondant à la fin du gène d'intérêt contient un codon stop, ce qui permettra à la traduction de s'arrêter à ce niveau-là (voir annexe II-a). En utilisant l'enzyme polymérase pfx Platinum de chez Invitrogen (Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France) (pour un volume final de 50µl), le mélange de PCR\* est préparé. Un thermocycleur effectue le cycle de température suivant : le procédé est initialisé par une première dénaturation (2 minutes à 94°C) suivie par 30 cycles identiques composés des trois étapes suivantes :

**94°C, 15 secondes** : dénaturation de l'ADN. Lors de cette étape, l'ADN double brin est dénaturé. En effet, il a été montré qu'après une élévation de la température à 94°C, la moitié de la molécule d'ADN est sous la forme simple brin. Le temps est variable mais généralement inférieur à 30 secondes.

**54°C, 30 secondes** : hybridation des amorces sur l'ADN. Cette température, appelée  $T_M$  pour « melting temperature » est calculée à partir des amorces : le  $T_M$  est donné par l'équation suivante :

$$T_{emp} = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Où  $T_M = T_{emp} - 5^\circ\text{C}$  et A, T, C et G sont les nombres correspondants de chaque type de base de l'amorce pour laquelle le  $T_M$  est calculé.

Le  $T_M$  signifie qu'à cette température là, la moitié des amorces sont hybridées sur leur cible (ADN simple brin de séquence complémentaire). Le temps nécessaire à cette phase est de l'ordre de la minute ou moins.

**68°C, 1 minute par kilo base d'ADN à amplifier** : phase d'élongation des amorces par la polymérase. Le type d'enzyme polymérase choisie détermine la température de cette étape. Ici, la Pfx, dont la température optimale de fonctionnement est de 68°C, est utilisée. Le temps dépend de la quantité d'ADN à amplifier et donc de la taille du gène d'intérêt. Par exemple, pour amplifier le gène *hsp70-1* par PCR, ce temps est fixé à 2 minutes 10 secondes.

L'ADN est ainsi spécifiquement amplifié *in vitro*. Un gel d'agarose à 1% dans du SYBR safe stain DNA gel dans du TBE 0,5X de Molecular Probe (Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France) est ensuite réalisé pour l'analyse de la PCR. Les différents échantillons à analyser sont disposés dans les puits du gel avec du bleu de migration (contenant du glycérol,

ce qui permet d'alourdir l'échantillon et de faciliter sa visualisation lors de la migration, du bleu de bromophénol et un chélateur d'ion : l'EDTA), ainsi que les marqueurs de tailles. La lumière UV permet ensuite de visualiser les bandes correspondant à l'ADN.

Les produits PCR, dont la taille correspond à celle souhaitée, sont alors extraits du gel et purifiés (Gel extraction Kit, Qiagen Inc. Valencia, CA, USA). Ils sont ensuite digérés avec les enzymes de restriction choisies (ici BamH1 et EcoR1, New England Biolabs®, MA, USA). Après plusieurs tests, au vu des résultats, la *double digestion*\* a été préférée au lieu des deux digestions réalisées de façon séquentielle puis ensuite incubées à 37°C pendant 2 heures au moins. De même, pour le plasmide (pRSET A). Ces produits de digestions sont alors purifiés en utilisant le Qiagen PCR purification kit (Qiagen Inc. Valencia, CA, USA).

Durant l'étape de ligation, le gène d'intérêt, dûment amplifié par PCR, est fixé dans le vecteur d'expression par liaisons phosphodiester (qui sont des liaisons covalentes). Le plasmide est ainsi *ligué*. Le *mélange de ligation*\* est incubé pendant environ 1 heure à 37°C. La présence d'ATP est nécessaire au fonctionnement de la ligase. Sans ATP, cette enzyme ne peut pas fonctionner.

La transformation des bactéries avec le produit de ligation est réalisée sans purification préalable et en conditions stériles (bec bunsen). Cette étape consiste en la transformation des bactéries par le plasmide ligué (ou avec un plasmide prêt à l'emploi, comme le *pGex-2T HSP70-1*\* fourni par le Pr R. Morimoto (annexe II-b)). Les bactéries sont compétentes, c'est-à-dire que leur membrane est fragilisée grâce à l'utilisation d'ions calcium et ainsi l'ADN pourra s'y introduire plus facilement. Une fois introduit, cet ADN va s'exprimer, et le phénotype de la bactérie, qui a acquis le plasmide, sera modifié. De plus, le plasmide sera transmis à toutes les bactéries issues de la division de la bactérie qui l'a acquis. 10 µl de produit de ligation sont ajoutés sur 30 µl de bactéries rendues compétentes (*E.coli* Top10, Invitrogen). Ce mélange est ensuite incubé pendant 10 minutes dans la glace puis mis à 42°C pendant 42 secondes exactement (choc thermique : pénétration de l'ADN). Ensuite, 200 µl de milieu *LB*\* sans antibiotique sont ajoutés aux bactéries. Le tout est alors placé à 37°C pendant 42 minutes pour stopper le choc thermique et permettre aux bactéries de récupérer en l'absence d'agent de sélection. Après, les bactéries sont étalées sur une boîte de Pétri contenant du LB + agar + le gène de résistance à l'antibiotique apporté par le plasmide (ici, l'ampicilline est à une concentration finale de 150 µg/ml). Les bactéries sont incubées à 37°C pendant une nuit. Les bactéries ayant acquis le plasmide sont récupérées sur la boîte. Ainsi, seules les bactéries ayant acquis le plasmide auront, par la même occasion, acquis la résistance à l'antibiotique. Le gène de résistance à l'antibiotique porté par le plasmide est le *gène de sélection*. Ce gène est, dans le cas de la résistance à l'ampicilline, le gène *bla* codant pour l'enzyme β-lactamase.

Le kit « Plasmid Mini Prep Kit » (Qiagen) est utilisé sur les clones bactériens qui ont poussé dans le but de récupérer l'ADN plasmidique. Ensuite, cet ADN plasmidique est digéré par les enzymes de restriction ayant servi pour le clonage (incubation pendant 1 heure 30 minutes à 37°C) et le produit de digestion obtenu est mis sur un gel d'agarose avec du tampon de migration dans le but de vérifier la présence de l'insert.

### **II.2.2- Expression des protéines**

Le clone bactérien choisi est ensemencé dans du milieu LB supplémenté avec l'antibiotique de sélection, à 37°C avec une agitation de 200 tr/min, pendant une nuit (ici, l'ampicilline est à une concentration finale en solution de 150µg/ml), après avoir pré amplifié le clone en deux étapes (la première étape consiste à la pré-amplification du clone bactérien, gratté sur la boîte de Pétri, pendant quelques heures à 37°C, 200 tr/min dans 1ml de LB + antibiotique, puis la deuxième étape consiste en l'ajout à la préculture de 9ml de LB + antibiotique). Les 10ml de préculture sont ensuite placés dans 1 litre de LB + antibiotique (inoculation au 1/100<sup>ème</sup>) et lorsque la densité optique DO600 atteint 0,6, l'IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) est ajouté. L'IPTG est un inducteur de la transcription du gène codant pour la β-galactosidase (concentration finale en solution pour l'IPTG : 1mM). La culture est ensuite incubée pendant 2-3 heures à 37°C, 200 tr/min. Durant cette étape, la protéine d'intérêt va être surexprimée par la bactérie sous forme de fusion avec le tag GST (glutathion S transférase).

Les protéines sont alors extraites. Tout d'abord, les bactéries sont centrifugées à 5000 tr/min pendant 25 min. Le surnageant est ensuite vidé. Puis, le *tampon de lyse pour les bactéries\** est ajouté directement sur les bactéries et le mélange est homogénéisé. Les bactéries sont alors congelées à -80°C au moins 2-3 heures, ensuite, mises à décongeler dans un récipient rempli avec de l'eau chaude. 200µl de DNase (20mg/ml) et 200µl de lysozyme (20mg/ml) sont ensuite ajoutés par litre de culture. Quand l'échantillon est décongelé, une tablette d'anti-protéases est ajoutée. Les bactéries sont alors incubées 20min à 37°C, 200 tr/min. Pour casser mécaniquement les membranes bactériennes, plusieurs cycles successifs de congélation/décongélation sont effectués (à l'aide de l'azote liquide et du bain marie à 37°C) ou l'échantillon bactérien peut aussi être passé à la « french press » ou au sonicateur à 3 reprises. Pour se débarrasser des débris membranaires, il reste à centrifuger l'échantillon à 15 000 tours/min pendant 20 minutes. Le surnageant contient, par conséquent, la protéine d'intérêt.

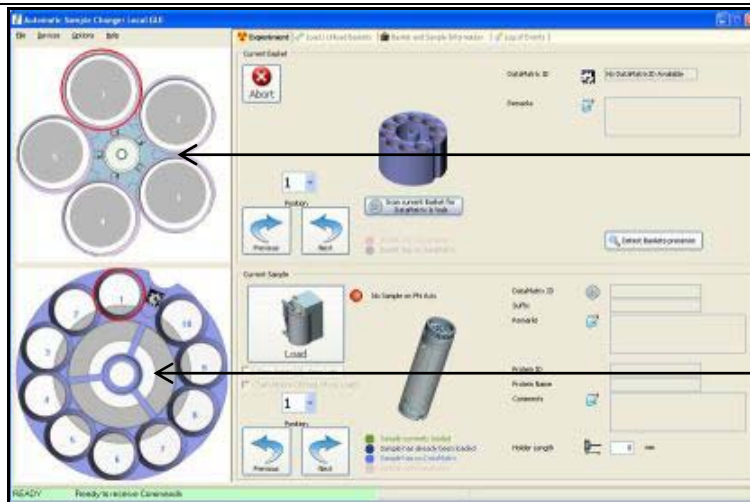
Un gel SDS est réalisé pour observer les résultats. Le procédé est le même que pour la biologie moléculaire (voir partie III.2.8) sauf pour la révélation puisque le gel est incubé pendant 20 minutes dans une solution de bleu de Commassie 0,1% (p/v) à température ambiante. La solution de bleu de Commassie est ensuite remplacée par une solution de décoloration 10% (v/v) d'acide acétique jusqu'à ce que des bandes bleues correspondant aux protéines apparaissent sur le gel.

### **II.2.3- Purification des protéines**

La purification sur colonne de chromatographie se réalise avec un appareil particulier l'AKTA Prime (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England) qui permet de séparer les différentes fractions récoltées après passage sur la colonne, tout en mesurant l'absorbance. Généralement, pour la première étape de purification, une colonne d'affinité adaptée à l'étiquette fusionnée à la protéine est utilisée (les étiquettes sont ici la GST (glutathion S transférase) ou l'étiquette poly His (plusieurs histidines)). Après avoir équilibré la colonne avec le *tampon A\**, la solution protéique est injectée dans la machine (après avoir placé la colonne d'affinité correspondante).



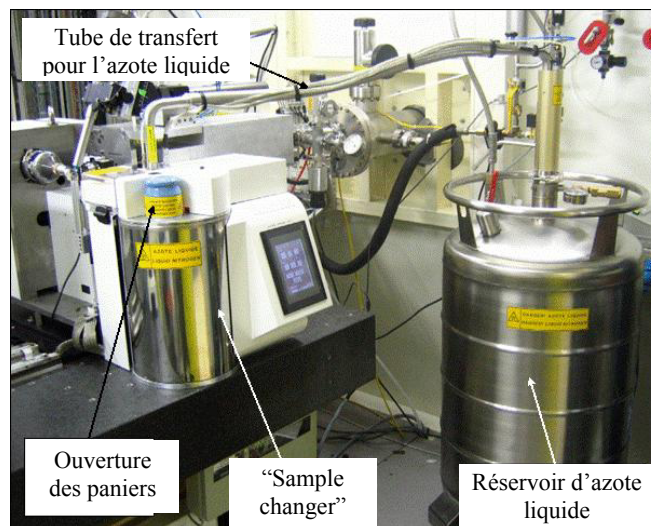
**Figure 27) Exemple d'une ligne de lumière du Mocromolecular Crystallography Group : ID29 (dirigée par Dr Leonard G.)**  
 La ligne ID29 est dédiée à l'utilisation de la méthode MAD (« Multiple wavelength Anomalous Diffraction ») pour le phasage.



**A**

Cinq paniers

Chaque panier contient dix cristaux



**B**

**Figure 28) Le "sample changer"**

**A) Schéma.** Les cinq paniers sont placés en même temps dans le « sample changer ». Chaque panier contient dix cristaux protéiques déjà montés sur les boucles de nylon.

**B) Photographie (ID14-1).**

L'échantillon protéique passe alors sur la colonne où il sera élué par compétition. La protéine d'intérêt va rester accrochée sur la colonne grâce à l'affinité de la protéine de fusion (GST : glutathion S transférase) pour le glutathion sépharose (glutathione sepharose 4 fast flow) lui-même fixé sur la colonne GSTrap FF (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England). La protéine est ensuite éluée avec le *tampon B\** qui contient du GSH (glutathion réduit, ce composé a encore plus d'affinité pour le glutathion sépharose fixé sur la colonne que la protéine de fusion GST et la remplace donc sur la colonne), ce qui permet la récupération de la protéine d'intérêt (toujours en fusion avec la GST) en fractions d'éluion. La mesure de l'absorbance à 280nm (zone d'absorption des protéines) est réalisée dans le même temps (ce qui permet de visualiser directement dans quelles fractions se trouve la protéine fusionnée au GST).

Après cette première étape, le plus souvent, un autre type de colonne est utilisé, comme par exemple une colonne échangeuse d'ions (cations ou anions) qui permet de purifier la protéine d'intérêt en fonction de son point isoélectrique (sa charge).

Le clivage de la protéine fusion (ici : la GST) permet de récupérer la protéine d'intérêt seule ainsi que la protéine fusion seule (GST) et la protéine-GST non clivée. Cette étape se réalise sous dialyse (tout ce qui a une masse moléculaire inférieure à 10kDa est enlevé), à 22-25°C pendant 16 heures avec Triton X100 (0,1%) glycérol (5%) et la protéase : la thrombine (400 unités pour une colonne de 5ml).

La filtration sur gel permet la séparation des différentes espèces présentes en solution en fonction de leur taille. L'absorbance et la taille des protéines présentes en solution sont mesurées directement par l'appareil (Biorad, Hercules, CA, USA) et donc la fraction d'éluion dans laquelle se trouve protéine d'intérêt est connue. Le but de cette étape est d'obtenir une solution mono disperse (une seule espèce protéique).

Il reste alors à concentrer la protéine. En effet, pour la réalisation de cristaux protéiques, une concentration suffisante de protéine est requise. En pratique, une concentration aux alentours de 10µg/µl est fréquemment utilisée. Pour se faire, la méthode la plus couramment employée est la centrifugation des protéines avec un tube Falcon particulier qui contient un filtre qui va retenir la protéine et ainsi permettre sa concentration.

Les étapes de passage sur la colonne GSTrap FF, clivage, filtration sur gel et concentration peuvent être répétées plusieurs fois, le but étant l'obtention de la solution protéique la plus **pure possible (≥90%)** et **suffisamment concentrée**. De plus, la solution protéique obtenue est testée à chaque étape à l'aide d'un gel d'acrylamide pour l'observation des protéines et sa concentration est mesurée par la méthode de Bradford (voir annexe I).

Lorsque la protéine est suffisamment pure et concentrée, des cristaux sont alors réalisés. Il existe plusieurs méthodes différentes. La plus couramment utilisée au laboratoire est l'utilisation de screens de cristallographie avec la méthode de la goutte pendante (voir chapitre II.1.3). Un screen qui contient le plus de types de tampons de cristallisation ayant fait leur preuve comme le Magic Screen de Biogenova (Toronto, Canada) est un bon screen pour commencer les essais de cristallisation.



## **II.2.5- Cristallographie des protéines (lignes de lumière MX)**

### **II.2.5.1- Collecte des données avec le synchrotron**

Les chercheurs du « Macromolecular Crystallography Group » (MX Group) disposent pour l'étude des structures tridimensionnelles des protéines d'une des sources de rayonnement X parmi les plus puissantes au monde. La puissance, le débit du flux de photons X et la focalisation du faisceau de photons X font du synchrotron un outil de choix pour la résolution de la structure des protéines (Beauchamp JC et Isaacs NW, 1999 ; Minor W *et al*, 2000). Chaque ligne de lumière de cette équipe (il y en a 7 au total) possède sa spécialité mais toutes sont dédiées à la résolution des structures tridimensionnelles des protéines par diffraction de rayons X : ID14-1, ID14-2, ID14-3, ID14-4, ID23-1, ID23-2 et ID29 (figure 27). Voici comment se passe la collecte d'un jeu de données sur une des lignes de lumière du Macromolecular Crystallography Group :

- le cristal est tout d'abord « pêché » avec une boucle de nylon directement dans la goutte sous microscope et il est cryoprotégé
- il est placé dans une petite boîte prévue à cet effet, elle-même placée dans un panier du cylindre métallique refroidi par azote liquide et servant au transport des cristaux (« dewar »)
- les paniers du « dewar » sont sortis et placés dans le « sample changer » (échangeur d'échantillons) qui permet d'une façon automatique de décider quel cristal de quel panier va être analysé. Cinq paniers sont placés en même temps dans le « sample changer » et chaque panier contient dix cristaux protéiques eux-mêmes montés sur des boucles en nylon (figure 28)
- le « sample changer » attrape alors la boucle contenant le cristal choisi pour l'analyse et place alors le cristal sur le minidiffractomètre
- le cristal est centré correctement dans le faisceau en 3 clicks.

Le temps d'exposition aux rayons X est limité puisque la puissance du faisceau dégrade la protéine très rapidement et lui fait subir des dommages irréversibles. Un flux cryogénique d'azote vapeur constant dirigé directement sur le cristal diminue, en partie, ces dégradations pendant la collecte de données à l'aide des rayons X (Garman E et Nave C, 2002 ; Garman E et Owen RL, 2006 ; Leiros HK *et al*, 2006). Les mesures réalisées permettent, en général, la collecte d'un jeu de données (au minimum) par cristal. Un détecteur CCD placé derrière le cristal recueille l'image des rayons X qui auront diffracté dans le cristal

Le cristal est irradié en le faisant tourner par petites oscillations suivant un certain angle. Cet angle dépend de la symétrie du cristal. Le détecteur enregistre une image pour chaque oscillation, image nommée *cliché de diffraction*. La somme de tous les clichés de diffraction constitue le *jeu de données*.

Pour analyser un nouveau cristal protéique, il est nécessaire de recommencer toutes ces étapes. Dans le but de diminuer les manipulations que l'expérimentateur peut avoir à réaliser dans la « hutch » (annexe III-b), ces étapes sont en cours d'automatisation, avec notamment la mise en place du système « sample-changer/minidiffractomètre » qui permet le remplacement de l'échantillon à analyser (Artz S *et al*, 2005).

Remarque : suivant la méthode souhaitée pour la résolution de la phase, le choix de la ligne de lumière peut diverger. Ainsi, les lignes de lumière évoluent vers une plus grande spécialisation (figure 28).

## **II.3- Résultats : HSP, étude structurale**

### **II.3.1- Préparation à la cristallographie des protéines**

#### **II.3.1.1- Plasmide pGex-HSP70-1**

Le plasmide pGex-HSP70-1 (annexe II-b) fut tout d'abord utilisé pour l'étude structurale de HSP70-1 (protéine entière).

Ce plasmide contenant l'insert HSP70-1 a été transformé dans trois souches bactériennes (BL21 AI, BL21 PLYS et Top10 Star) et l'expression de la protéine d'intérêt a été induite à l'aide de l'ajout d'IPTG (100mM de concentration finale). Les meilleures conditions pour l'expression protéique (c'est-à-dire pour lesquels le maximum de protéine d'intérêt a été produit) ont été obtenues pour une induction avec 1mM d'IPTG en concentration finale (ajouté au moment où la densité optique est comprise entre 0,4 et 0,6), pendant une nuit entière (soit environ 16 heures) à 20°C, sous agitation de 200 tours par minute (figure 29). D'autres conditions d'induction ont été testées (4°C, 20°C ou 37°C pendant 3, 6 ou 12 heures ou toute la nuit) mais n'ont pas donné des quantités de protéine d'intérêt aussi importantes.

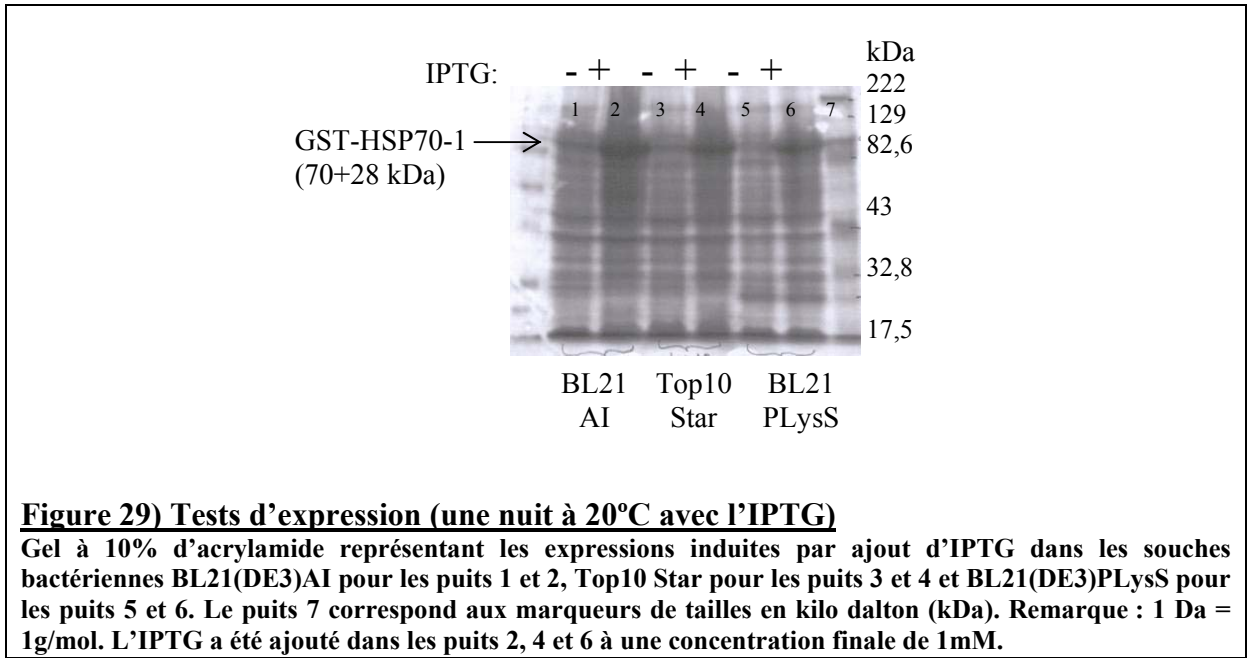
Au vu des résultats, il a été décidé que les expressions se feraient pour la suite dans les bactéries compétentes BL21 DE3 (Novagen). Ces bactéries, employées pour la traduction de plasmides, contiennent une polymérase très active (le plus souvent l'ARN polymérase dérivée du phage T7) sous contrôle d'un promoteur fort : l'opéron lactose *lacUV5*. Ces bactéries sont ici utilisées pour la traduction de protéines apportées à l'aide d'un plasmide contenant le T7 lysozyme. Le lysozyme du phage T7 est l'inhibiteur naturel de la T7 ARN polymérase. L'ajout de l'analogue non métabolisable du substrat (c'est-à-dire le lactose) : l'IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) permet la traduction massive en protéine du gène d'intérêt sous contrôle de l'opéron lactose.

Les souches bactériennes BL21(DE3)PLYsS permettent la traduction des protéines toxiques tout en augmentant leur stabilité (par un mécanisme de suppression de l'induction basale de l'ARN polymérase) et la lignée BL21(DE3)AI permet l'expression des protéines à codons rares. L'utilisation de ces deux souches est fréquente pour l'expression des protéines de Mammifères, comme c'est le cas ici. Toutes les souches BL21 sont déficientes dans les protéases OmpT et Lon, ce qui facilite encore l'expression des protéines recombinantes.

Les tests de solubilité ont été faits avec deux concentrations finales de NaCl (200 et 500 mM). Ces concentrations sont essayées en routine. Sur la figure 30, les lettres I et S représentent, respectivement, la fraction insoluble et la fraction soluble.

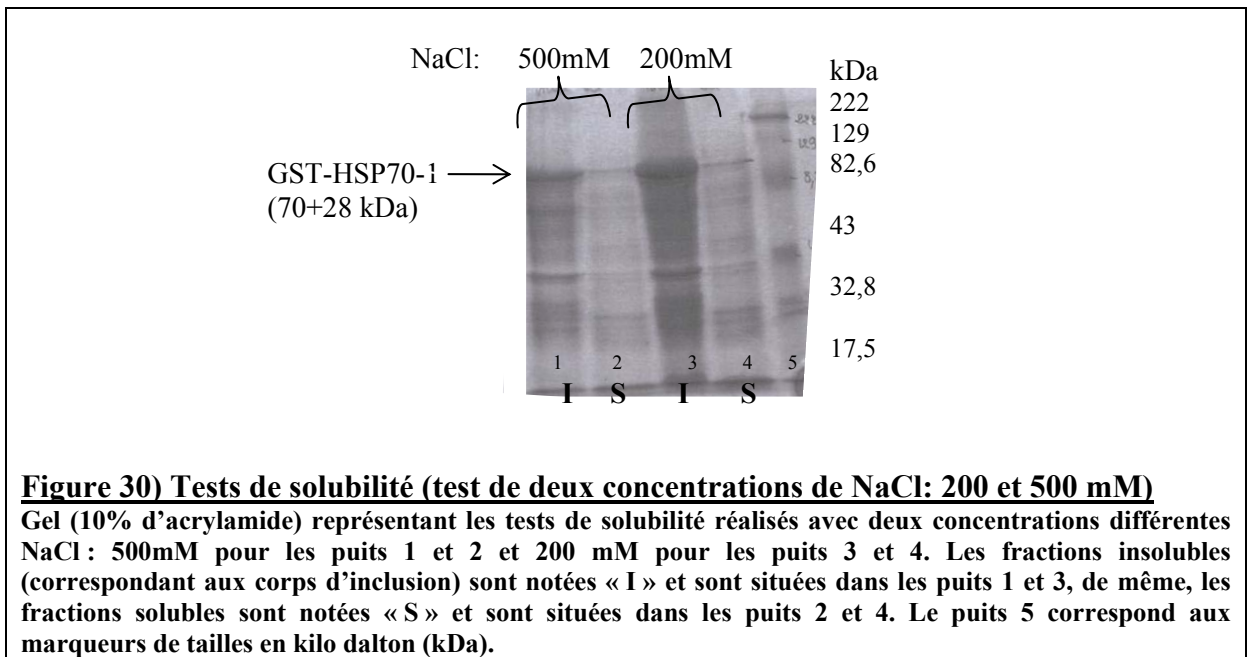
La concentration de 200 mM de NaCl a été choisie parce qu'elle donnait la plus grande proportion de protéine d'intérêt dans la partie soluble (figure 30).

La purification proprement dite a été réalisée sur une colonne d'affinité GSTrap FF de chez Amersham Pharmacia. Les protéines en fusion avec la GST (glutathion S transférase ; origine : *Schistosoma japonicum*, 28 kDa) sont retenues sur la colonne et ensuite éluées avec un tampon contenant du glutathion réduit (GSH).



**Figure 29) Tests d'expression (une nuit à 20°C avec l'IPTG)**

Gel à 10% d'acrylamide représentant les expressions induites par ajout d'IPTG dans les souches bactériennes BL21(DE3)AI pour les puits 1 et 2, Top10 Star pour les puits 3 et 4 et BL21(DE3)PLysS pour les puits 5 et 6. Le puits 7 correspond aux marqueurs de tailles en kilo dalton (kDa). Remarque : 1 Da = 1g/mol. L'IPTG a été ajouté dans les puits 2, 4 et 6 à une concentration finale de 1mM.



**Figure 30) Tests de solubilité (test de deux concentrations de NaCl: 200 et 500 mM)**

Gel (10% d'acrylamide) représentant les tests de solubilité réalisés avec deux concentrations différentes NaCl: 500mM pour les puits 1 et 2 et 200 mM pour les puits 3 et 4. Les fractions insolubles (correspondant aux corps d'inclusion) sont notées « I » et sont situées dans les puits 1 et 3, de même, les fractions solubles sont notées « S » et sont situées dans les puits 2 et 4. Le puits 5 correspond aux marqueurs de tailles en kilo dalton (kDa).

Les différentes fractions d'éluion de la colonne sont montrées dans la figure 31. Ces fractions correspondent à celles du profil d'éluion montré à la figure 32. Le maximum de protéine est obtenu pour la fraction 5.

Le point isoélectrique théorique (pI) de la protéine HSP70-1 est équivalent à 5,48 d'après le logiciel ProtParam d'Expasy (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>). L'utilisation des colonnes échangeuses d'ions (cations et anions) n'a pas augmenté significativement le rendement de la purification. En effet, plusieurs passages successifs au travers de la colonne d'affinité GSTrap FF donnent la meilleure purification obtenue avec cette construction plasmidique. Ainsi, la protéine d'intérêt ne s'est pas accrochée sur les colonnes échangeuses d'ions. Ceci est très probablement dû au pH du tampon dans lequel se trouve la protéine après passage sur la colonne GSTrap FF (qui est équivalent à 7,5). Cette charge neutre du tampon d'éluion a pu faire en sorte que la protéine ne s'accroche sur aucune des colonnes échangeuses d'ions testées. Le pI théorique du GST est équivalent à 6,73.

Les fractions les plus concentrées ont été regroupées en vue du clivage du tag GST. C'est à partir de ce moment-là que les problèmes ont débuté avec cette construction GST-HSP70-1.

Pour procéder au clivage du tag GST, les différentes conditions préconisées par les notices de la protéase (la thrombine) et de la colonne GSTrap ont tout d'abord été essayées, c'est-à-dire le clivage sur colonne ou non, pendant différents temps (1heure, 4heures, 6heures, pendant la nuit) et à différentes températures (4°C, 20°C ou 37°C) (voir figure 33 : ctr : contrôle non clivé, clivage à 37°C pendant une heure et à 4°C pendant la nuit (O/N : over night)) et ce pour différentes concentrations de protéase, avec ou sans dialyse. Ces résultats sont présentés dans la figure 33.

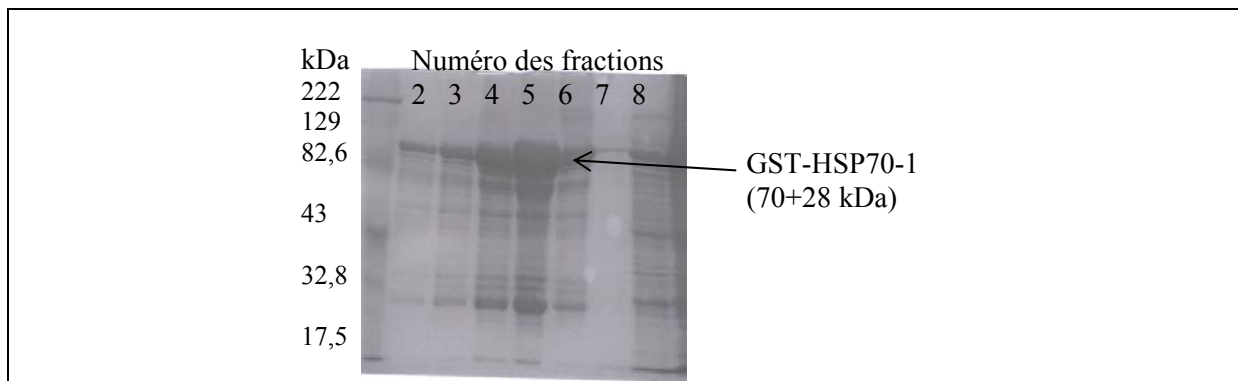
A ce stade de l'expérience, les protéines purifiées ont été vérifiées à l'aide de Western Blots. Le premier a été réalisé avec l'anti-HSP70 polyclonal de chez Upstate (figure 34) et le second à l'aide de l'anti-GST de chez Amersham Pharmacia (figure 35). La figure 34 montre la production de la protéine HSP70-1 humaine puisque cette dernière est reconnue spécifiquement par l'anticorps dirigé contre HSP70 humaine. De plus, le clivage par la thrombine n'affecte pas la reconnaissance de cette protéine par son anticorps spécifique. Il faut aussi souligner que la protéine se trouve exactement à la taille attendue.

Le deuxième Western Blot permet de montrer que la protéine HSP70-1 exprimée est bien celle qui a été apportée par le plasmide puisqu'elle semble être, effectivement, fusionnée au tag GST (voir figure 35). La concentration des protéines est ensuite mesurée selon la *méthode du dosage de Bradford\** (voir annexe I) : une courbe de référence a été réalisée à l'aide de la BSA (bovine sérum albumine) et a donné la concentration en protéine :

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{595} \times \text{pente de la courbe soit } 18,895) / 4$$

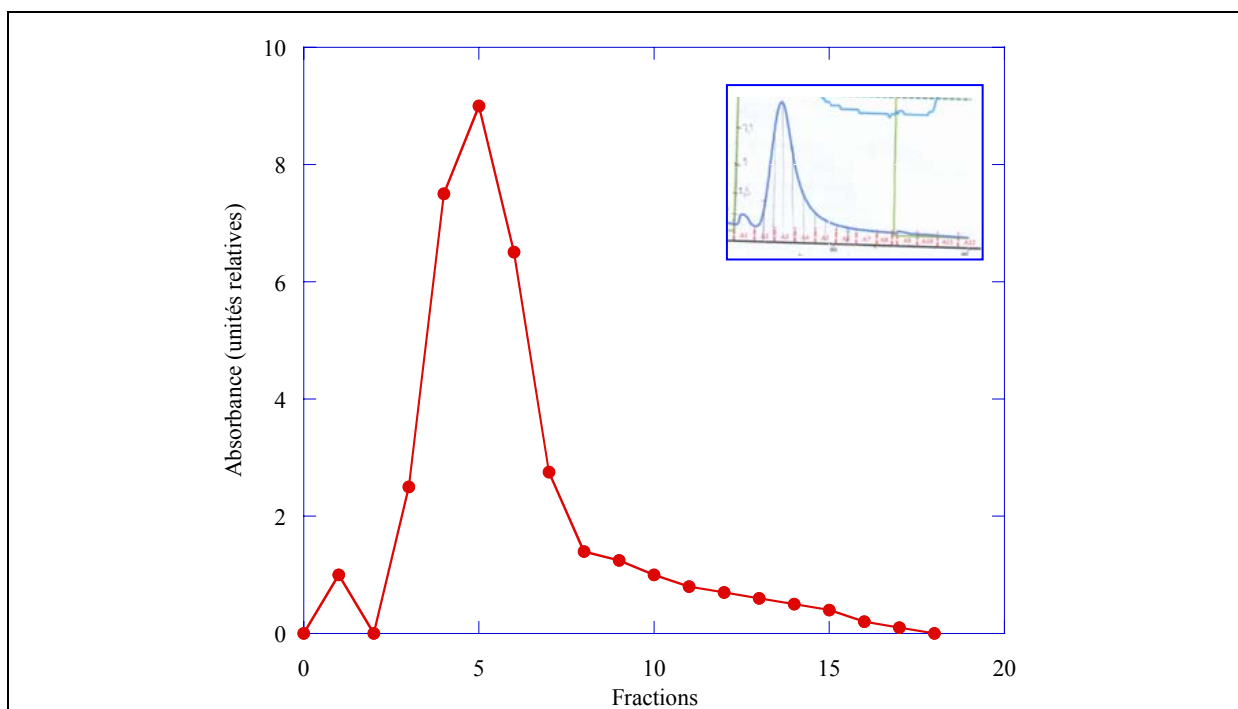
Où 4 est le nombre de  $\mu\text{l}$  de solution protéique ajoutés aux 200 $\mu\text{l}$  de réactif de Bradford et 796 $\mu\text{l}$  d'eau distillée.

Les concentrations protéiques obtenues, après purification sur colonne GSTrap FF (Amersham Pharmacia), sont indiquées dans le tableau 7.



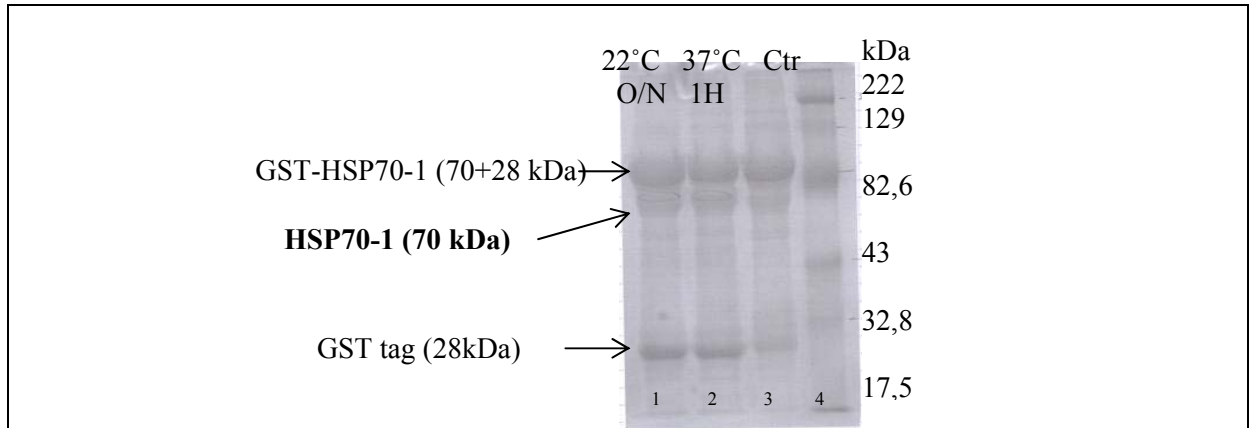
**Figure 31) Tests de purification (sur colonne GSTrap FF (Amersham Pharmacia))**

Gel à 10% d'acrylamide représentant les tests de purification réalisés avec l'AKTA prime explorer et la colonne GSTrap FF : les puits 2 à 8 correspondent aux fractions 2 à 8 de la figure 140. Le premier puits correspond aux marqueurs de tailles en kilo dalton (kDa).



**Figure 32) Profil d'élution correspondant**

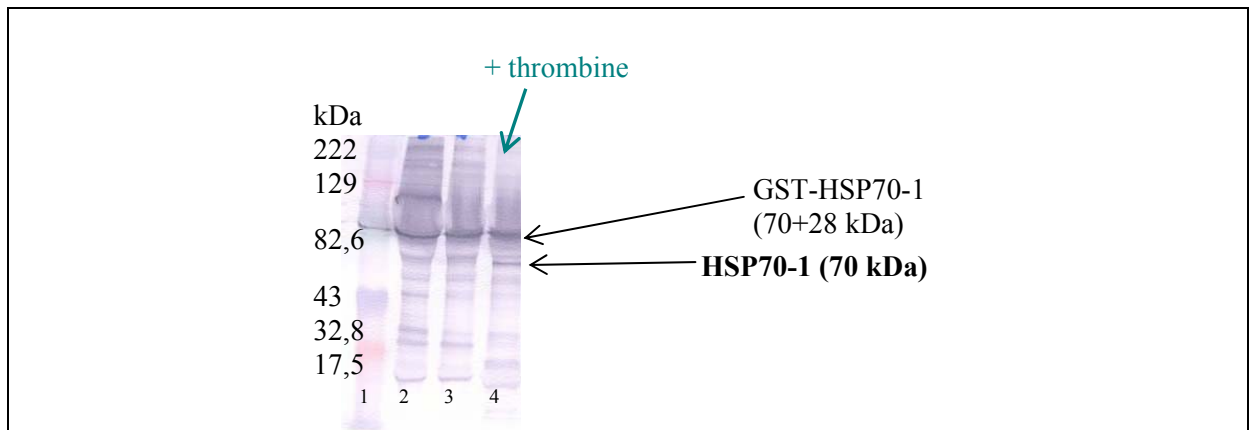
Représentation graphique du profil d'élution correspondant à la purification réalisée avec l'AKTA prime explorer (le profil obtenu avec l'appareil a été scanné, reproduit et agrandi pour plus de clarté) et la colonne GSTrap FF : les fractions 2 à 8 correspondent aux puits 2 à 8 de la figure 139.



**Figure 33) Tests de clivage du tag GST à l'aide de la protéase thrombine (gel de protéine classique)**

Gel (10% d'acrylamide) représentant les tests de clivage du tag GST réalisés avec la thrombine : le puits 3 correspond au contrôle non clivé, le puits 2 correspond au clivage obtenu après 1heure à 37°C et le puits 1 correspond au clivage obtenu après une nuit à 22°C.

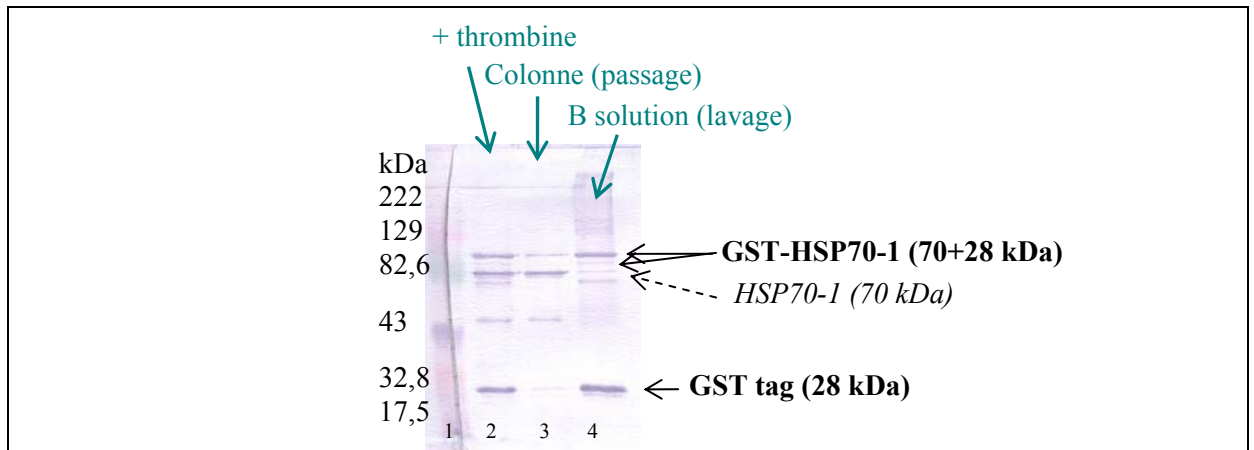
**Remarque :** ces deux clivages-ci ont été réalisés avec la même concentration finale de thrombine. La thrombine a été ajoutée dans les proportions indiquées, soit 10 U pour environ 10 mg de protéine en fusion avec la GST à cliver. Le puits 4 correspond aux marqueurs de tailles en kilo dalton (kDa).



**Figure 34) Tests de clivage du tag GST à l'aide de la protéase thrombine (Western Blot avec anticorps anti-HSP70-1)**

Western Blot représentant un test de clivage du tag GST réalisé avec la thrombine : le puits 2 correspond au contrôle non clivé (fraction 4), le puits 3 correspond au contrôle non clivé (fraction 5) et le puits 4 correspond au clivage obtenu après une nuit à 22°C.

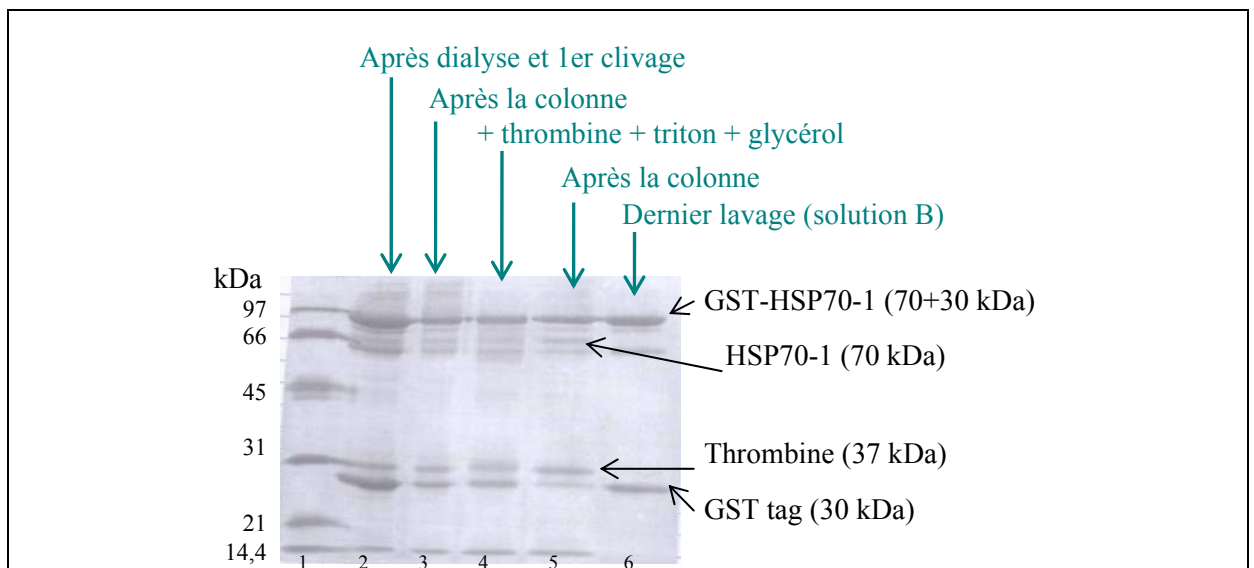
**Remarque :** ce clivage-ci a été réalisé avec une concentration de thrombine de 10 unités pour environ 10 mg de protéine en fusion avec la GST à cliver. Le puits 1 correspond aux marqueurs de tailles en kilo dalton (kDa).



**Figure 35) Tests de clivage du tag GST à l'aide de la protéase thrombine (anti-GST)**

Western Blot montrant un essai de clivage de l'étiquette de fusion GST réalisé avec la thrombine (clivage obtenu après une nuit à 22°C). La présence de la protéine GST est détectée (utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la GST). Le puits 2 correspond à la solution protéique digérée par le thrombine, le puits 3 correspond au résultat obtenu après le passage dans la colonne GSTrap FF de la solution protéique digérée par le thrombine (maximum de HSP70-1 ici) et le puits 4 correspond au dernier lavage de la colonne GSTrap FF (présence du non clivé + du tag GST).

**Remarque :** clivage réalisé avec une concentration de thrombine de 10 unités pour environ 10 mg de protéine en fusion avec la GST à cliver. Le puits 1 correspond aux marqueurs de tailles en kilo dalton (kDa).



**Figure 36) Tests de clivage du tag GST à l'aide de la protéase thrombine**

Gel de protéines (10% d'acrylamide) : représentation de l'un des tests de clivage du tag GST réalisés avec la thrombine. Optimisation maximale à l'aide d'un détergent le Triton X100 (0,1%) et du glycérol (5%), dialysé pendant une nuit à 22°C, clivé deux fois. Puits 2 : solution protéique digérée par le thrombine après dialyse ; puits 3 : solution après le passage dans la colonne GSTrap de la solution protéique digérée (maximum de HSP70-1) ; puits 4 : nouveau clivage de la même solution protéique avec ajout de TritonX100 (0,1%) et de glycérol (5%) (toujours sous dialyse) ; puits 5 : solution protéique après un nouveau passage sur la colonne GSTrap ; puits 6 : dernier lavage de la colonne GSTrap (non clivé + le tag GST mais plus de HSP70-1).

**Remarque :** clivage réalisé avec une concentration de thrombine de 10 unités pour environ 10 mg de protéine en fusion avec la GST à cliver. Le puits 1 correspond aux marqueurs de tailles en kilo dalton (kDa).

	A <sub>595</sub>	Concentration (µg/µl)	Quantité totale (mg de protéine)
<b>HSP70-1 + thrombine</b>	0,130	0,614	12,9 (soit 21ml)
<b>GST + GST-HSP70-1</b>	0,283	1,339	29,4 (soit 22 ml)

**Tableau 7) Exemple d'un essai de purification de la protéine HSP70-1**

Le clivage du tag n'étant toujours pas parfait, les optimisations de clivage ont repris, mais cette fois-ci en ajoutant du glycérol et/ou des détergents (pour augmenter l'accessibilité à la thrombine) et/ou du DTT (réducteur de pont disulfure). La figure 36 représente l'un des essais destiné à augmenter la quantité de HSP70-1 clivée. Malheureusement, tous ces essais se sont révélés être inutiles puisqu'ils ne produisaient pas assez de protéine HSP70-1 clivée. La séparation des différentes espèces en solution s'est révélée impossible à cause des poids moléculaires trop proches (70kDa pour HSP70-1, 56kDa pour les dimères de GST et 100kDa pour le fusion GST-HSP70-1 (70+monomère de GST 28 kDa). De plus, la protéine HSP70-1 avait tendance à s'agréger, ce qui réduisait considérablement la possibilité de la concentrer (tableau 8).

	Absorbance à 595 nm: A <sub>595</sub>	Concentration de la solution protéique (µg/µl)
<b>Avant concentration</b>	0,283	1,334
<b>Après concentration</b>	0,134	0,633

**Tableau 8) Exemple d'un essai de concentration de la protéine HSP70-1. La concentration indiquée dans ce tableau reflète une concentration de la solution protéique correspondant à un mélange, c'est-à-dire la protéine d'intérêt clivée, la GST résiduelle et la protéine d'intérêt non clivée.**

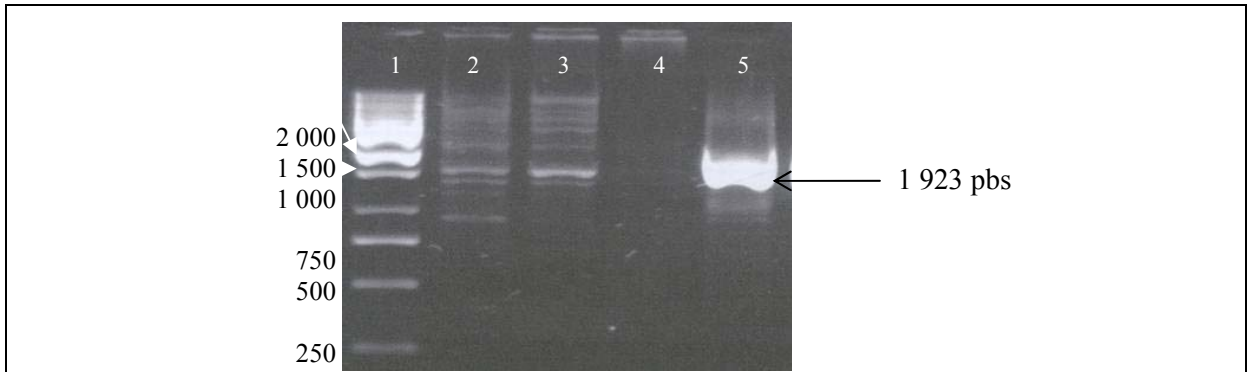
Le Triton X100 n'a pas pu beaucoup améliorer le rendement du clivage. Les clivages suivis de purifications séquentielles sur colonne GSTrap FF n'ont pas donné de bien meilleurs résultats. La dialyse ne débarrasse pas du GST (seulement de ce qui est inférieur à 10 kDa, donc du GSH qui fait environ 8 kDa), d'autant plus que le GST est connu pour former des dimères. Des étapes de purification ont donc été rajoutées et notamment l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anions et d'une colonne échangeuse de cations. Cependant, le pH neutre de la solution protéique (7,5) n'a pas permis une meilleure séparation des espèces non plus et ces étapes n'ont fait qu'augmenter la dilution de la protéine d'intérêt. Ni le DTT, ni le β-mercapto-éthanol, qui servent à réduire les ponts disulfures, n'ont eu d'effet positif sur l'optimisation du clivage.

La seule solution s'est avérée être la reprise des expériences au niveau du clonage, en utilisant cette fois-ci un nouveau vecteur. Le plasmide pRSET-A a donc été choisi.

### **II.3.1.2- Plasmide pRSET-A**

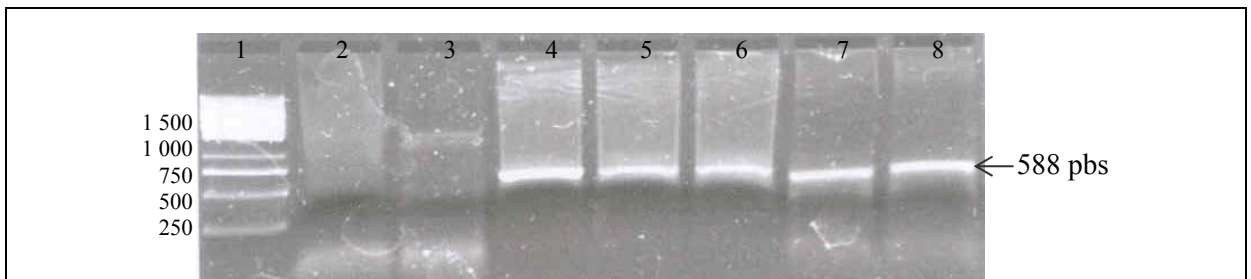
Le plasmide **pRSET-A** (Invitrogen) a été choisi par rapport à son étiquette de 6 histidines, sa résistance à l'ampicilline et sa taille est de **2 900 paires de bases** (pbs). L'étiquette de 6His est connue pour faciliter la purification des protéines et pour ne pas gêner outre mesure le repliement de la protéine d'intérêt. Cette étiquette pose, en pratique, beaucoup moins de problème que l'étiquette GST. De plus, l'expression du gène d'intérêt est sous contrôle d'un promoteur fort, le T7 provenant du phage T7, qui conduit l'expression du gène.





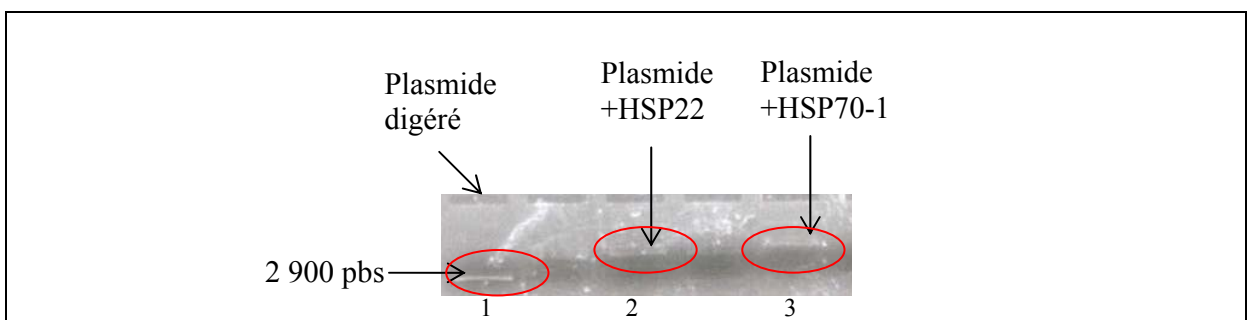
**Figure 37) Tests de PCR avec le plasmide pGex contenant l'insert HSP70-1**

Gel d'agarose (1%) représentant un des tests de PCR réalisé avec le plasmide pGex-HSP70-1 en vue de l'obtention de l'insert HSP70-1. Les puits 2 à 5 correspondent à différentes conditions de PCR avec le même plasmide. Le puits 1 correspond aux marqueurs de tailles (en nombre de paires de bases).



**Figure 38) Tests de PCR avec l'ADN génomique en vue d'obtenir l'insert HSP22 (test de différentes conditions et de différentes enzymes)**

Gel d'agarose (1,2%) montrant un des tests de PCR avec l'ADN génomique en vue de l'obtention de l'insert HSP22. Les puits 2 à 8 correspondent à différentes conditions de PCR (différentes polymérases et différentes concentrations pour les réactifs). Le puits 1 correspond aux marqueurs de tailles (en nombre de paires de bases).



**Figure 39) Ligation des deux inserts (HSP70-1 et HSP22) ainsi obtenus dans le plasmide pRSET-A**

Gel d'agarose (0,9%) représentant les ligations des inserts obtenus par PCR avec le plasmide pRSET-A. Le puits 1 correspond au plasmide digéré par les deux enzymes de restriction qui ont servi au clonage : BamH1 et EcoR1. Le puits 2 correspond au plasmide+HSP22 linéarisé (digéré par BamH1). Le puits 3 correspond au plasmide+HSP70-1 linéarisé (digéré par BamH1).

La T7 ARN polymérase reconnaît spécifiquement ce promoteur. Il est nécessaire d'apporter la T7 ARN polymérase aux bactéries soit en induisant l'expression de la polymérase par l'inducteur gratuit IPTG (concentration finale : 1 mM) ou soit en infectant les bactéries avec un phage exprimant la polymérase. Quand suffisamment de T7 ARN polymérase est produite, elle se fixe sur le promoteur T7 et transcrit le gène d'intérêt.

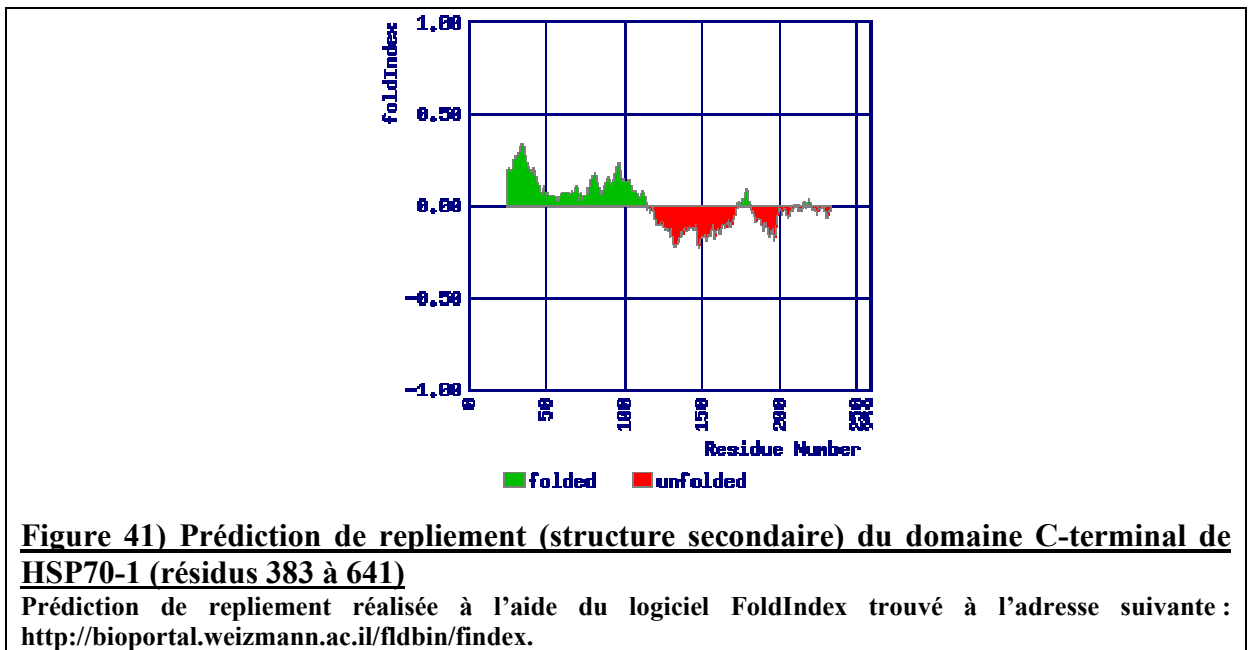
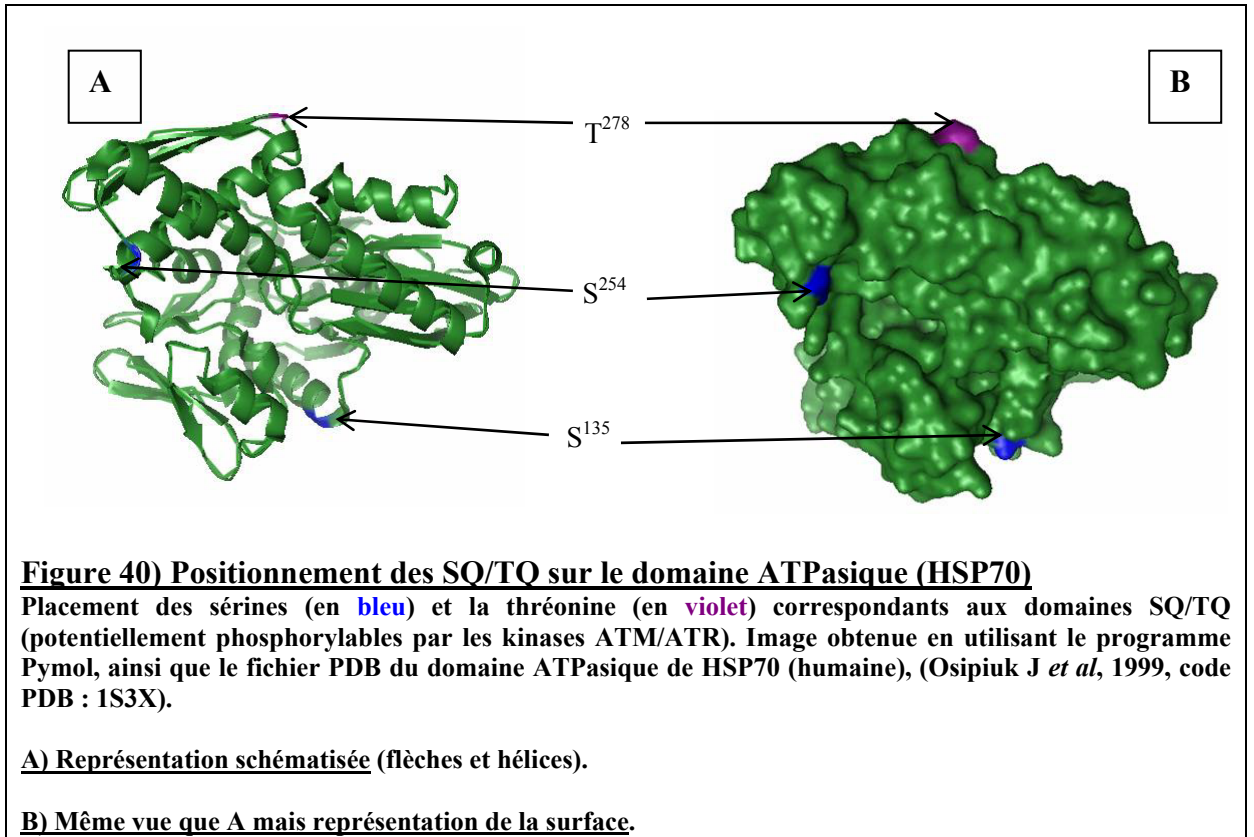
Les souches bactériennes Top10 et BL21 (DE3) PLysS sont utilisées respectivement pour le clonage et l'analyse plasmidique, et, pour l'expression protéique.

L'expression de la T7 ARN polymérase est entièrement régulée. La souche bactérienne BL21 (DE3) PLysS porte le lysogène DE3 du bactériophage  $\lambda$ . Le lysogène contient le gène du *lacI*, le gène codant pour la T7 ARN polymérase (sous contrôle du promoteur *lacUV5*) et une petite partie du gène *lacZ* codant pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase qui est une enzyme utilisée pour la structure chez *E. coli*. Cette construction de *lac* est insérée dans le gène *int*, ce qui inactive ce gène *int*. La rupture du gène *int* empêche l'excision du phage (i.e. la lyse) en absence de phage helper. Le *lac* répresseur (qui contrôle la transcription et l'expression des gènes structuraux) réprime ici l'expression de la T7 ARN polymérase. En effet, les gènes *lac* sont contrôlés par une régulation négative, c'est-à-dire qu'ils sont transcrits jusqu'à ce qu'ils soient inactivés par une protéine régulatrice. Etant donné que la fonction du gène régulateur est d'empêcher l'expression des gènes structuraux, il est appelé *gène répresseur*. L'addition d'IPTG (isopropylthiogalactoside, qui est un *inducteur gratuit* du système c'est-à-dire qu'il induit la synthèse enzymatique mais n'est pas métabolisé) permet l'expression de la T7 ARN polymérase. La cible de l'IPTG est le gène répresseur.

Concernant la régulation de la T7 ARN polymérase par le lysozyme du T7 : le but recherché est de diminuer l'expression basale de la T7 ARN polymérase. Si un gène toxique est cloné en aval du promoteur T7, l'expression basale de ce gène peut conduire à la diminution de la croissance bactérienne, à la mort cellulaire ou à l'invisibilité du plasmide. Le T7 lysozyme (produit par le PLysS) se lie à la T7 ARN polymérase et inhibe ainsi son action de transcription. Cette propriété est exploitée dans le but de réduire le niveau basal d'expression de la T7 ARN polymérase. Le lysozyme est une enzyme bi-fonctionnelle : en addition à son activité de ligand de la T7 ARN polymérase, il clive aussi une liaison spécifique de la couche du peptidoglycane de la paroi de *E. coli*. Cette activité va faciliter la lyse bactérienne lors des cycles successifs chaud/froid lors des premières étapes de la purification.

Les inserts proviennent pour HSP70-1 du plasmide pGex Hsp70-1 et pour HSP22 de l'ADN génomique humain. Concernant l'**insert HSP70-1 (1 923 pbs)**, plusieurs PCR ont été réalisées pour optimiser les conditions. La bande correspondant à l'insert (puits 5 de la figure 37 ; ce sont les seules conditions qui ont donné un résultat satisfaisant sur ce gel) à été directement découpée puis extraite du gel d'agarose en vue d'être purifiée et ensuite liguée avec le plasmide pRSET-A. L'ADN génomique humain a été utilisé pour obtenir l'insert HSP22. En effet, d'après le serveur web de bioinformatique Softberry Biotools (<http://www.softberry.com/berry.phtml>), le gène HSP22 ne comporte pas d'*intron* (partie d'ADN non codante) mais est constitué d'un seul *exon* (partie d'ADN codante), ce qui permet de réaliser une étape de PCR directe (c'est-à-dire sans passer par l'ADNc ou ADN complémentaire) pour obtenir l'insert. Ce procédé direct est rarement possible pour les gènes humains puisqu'ils possèdent généralement plusieurs introns. Ainsi pour le gène HSP70-1, ce n'est pas possible de procéder de la même manière (présence de 4 introns).

Le gel d'agarose de la figure 38 montre la dernière PCR optimisée pour l'**insert HSP22 (588 pbs)**. Seules les conditions des puits 4, 7 et 8 ont donné un résultat satisfaisant. La bande du puits numéro 4 a été coupée, purifiée et liguée dans le plasmide pRSET-A.



La figure 39 montre que les ligations concernant le plasmide pRSET-A et les deux gènes HSP22 et HSP70-1 semblent avoir fonctionné puisque les tailles obtenues sont supérieures à la taille du plasmide seul et correspondent pour le plasmide + HSP22 à 3,7 kpbs et pour le plasmide + HSP70-1 à 5,8 kpbs. Les clones plasmidiques ont ainsi été obtenus pour les deux gènes d'intérêt. A partir de cette étape, les expériences de cristallisation se sont arrêtées là, au profit des expériences de biologie moléculaire et cellulaire, et ce à cause du temps imparti pour terminer la thèse et jugé insuffisant pour mener à bien une étude cristallographique complète.

Cependant, des prédictions de structures (secondaires et tertiaires) ont été réalisées pour les deux protéines d'intérêt HSP22 et HSP70-1 (domaine C-terminal).

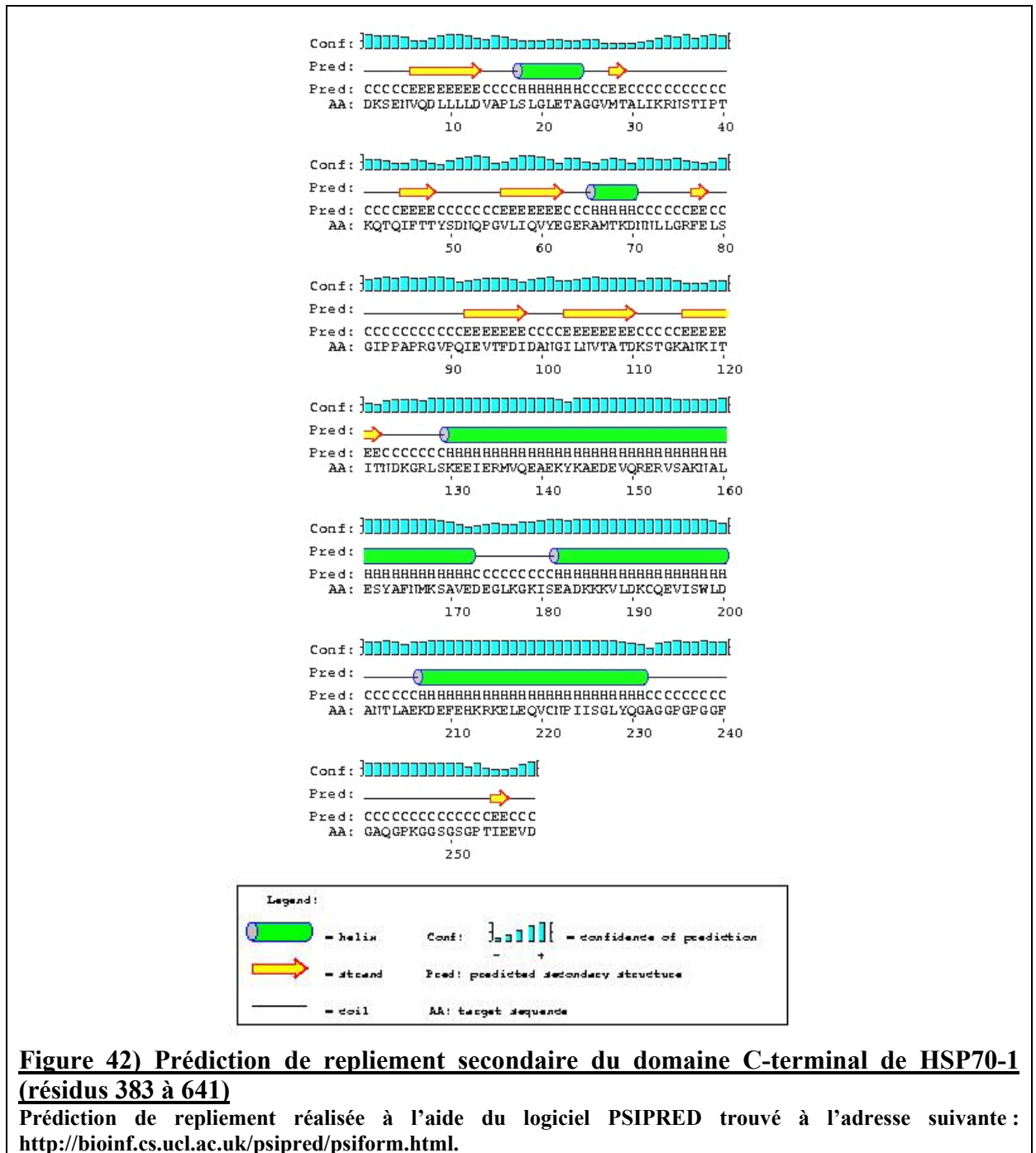
### **II.3.2- Prédiction de structures pour HSP70-1 et HSP22**

#### **II.3.2.1- Prédictions de structures pour le domaine C-terminal de la protéine humaine HSP70-1**

La structure du domaine N-terminal correspondant à la partie ATPase de la protéine HSP70 a été résolue en 1999 par Osipuk J et collaborateurs (figure 40). Les sites potentiellement phosphorylables par ATM et ATR représentés sur la figure 40 sont situés à l'extérieur de la protéine HSP70 lorsque celle-ci est pliée dans sa conformation tridimensionnelle propre ; de plus, ces sites ne sont pas proches. Ils apparaissent donc facilement accessibles pour des protéines kinases.

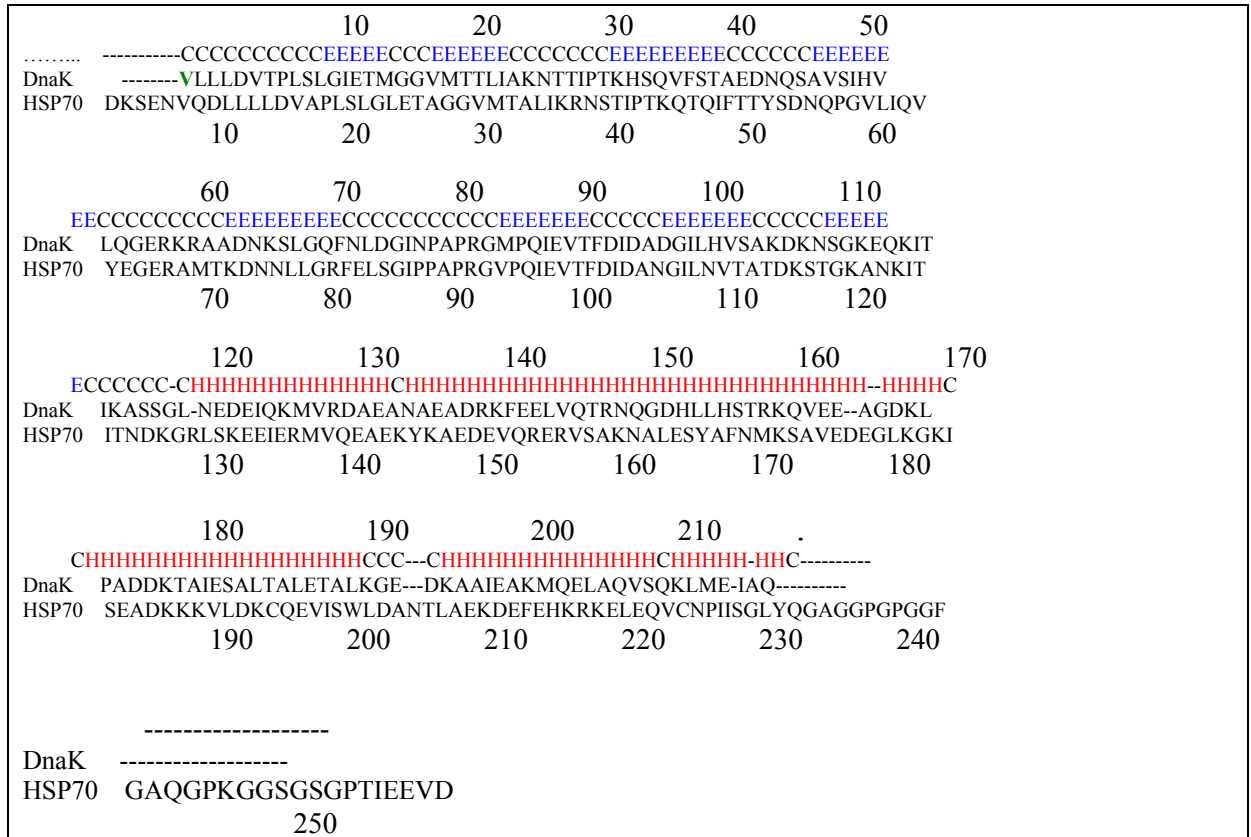
Le domaine C-terminal de la protéine HSP70 correspond au domaine d'interactions avec les protéines. La structure de ce domaine n'est toujours pas résolue à ce jour. Un outil de bioinformatique nommé « FoldIndex » permet de donner une meilleure idée concernant le repliement probable de ce domaine. La figure 41 présente les résultats obtenus pour le domaine d'interaction de la protéine HSP70-1 (prédiction pour la structure secondaire obtenue d'après la séquence en acides aminés de la protéine). D'après ces résultats, toute la partie C-terminale de la protéine apparaît comme étant dépliée. Ces résultats ont été comparés avec des résultats de prédictions de structure secondaire, eux aussi obtenus à partir de la séquence en acides aminés de la protéine d'intérêt. Les meilleurs obtenus (à l'aide du programme de bioinformatique en ligne PSIPRED ; McGuffin JL *et al*, 2000) sont exposés dans la figure 42. Les résultats obtenus avec ce modèle présentent une augmentation de la quantité de structures secondaires. Une prévalence des hélices  $\alpha$  est notable dans la partie C-terminale de ce domaine d'interaction. Les feuillets  $\beta$  apparaissent majoritaires dans le domaine N-terminal de ce domaine. Il faut souligner le fait que les feuillets  $\beta$  sont difficiles à analyser en faisant une prédiction de structure car ils sont souvent vus comme étant débobinés (« coil »).

De même, pour la structure tridimensionnelle, avec le même modèle bioinformatique, PSIPRED (GenThreader) (obtenu en ligne sur <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>), la structure 3D la plus proche est obtenue avec un score de 0,852/1. Cette structure est trouvée en comparant la structure secondaire prédite pour le domaine C-terminal de HSP70-1 avec les structures connues déposées dans la Protein Data Bank (PDB). Il s'agit du domaine d'interaction avec les substrats peptidiques de l'homologue bactérien de HSP70 : la protéine DnaK (provenance : *Escherichia coli* ; Zhu X *et al*, 1996). Le logiciel PSIPRED (GenThreader) permet de reconnaître les différents repliements protéiques (ou « folds »).



**Figure 42) Prédiction de repliement secondaire du domaine C-terminal de HSP70-1 (résidus 383 à 641)**

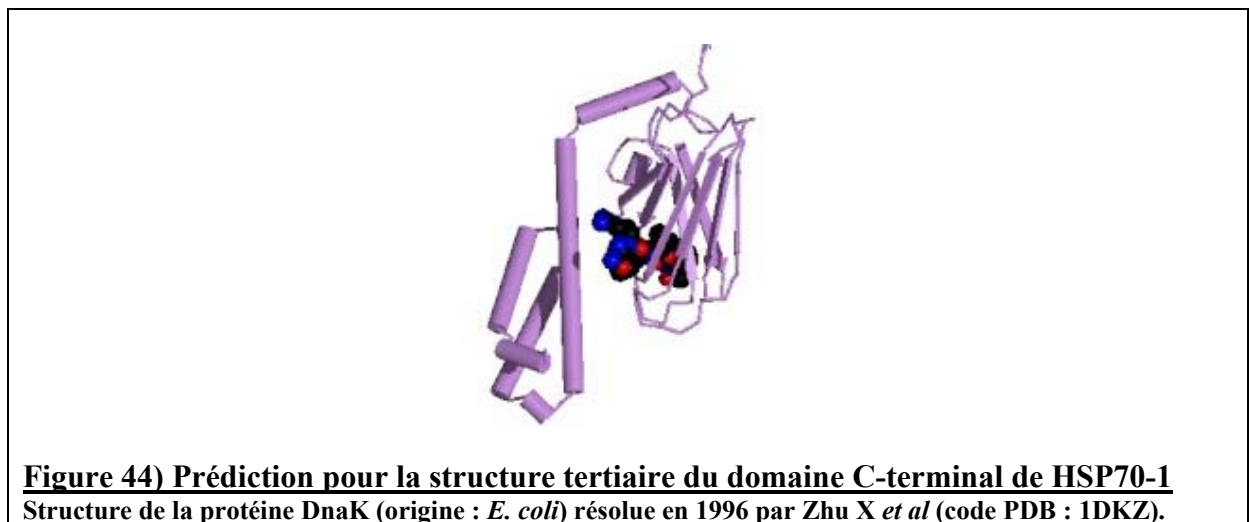
Prédiction de repliement réalisée à l'aide du logiciel PSIPRED trouvé à l'adresse suivante : <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>.



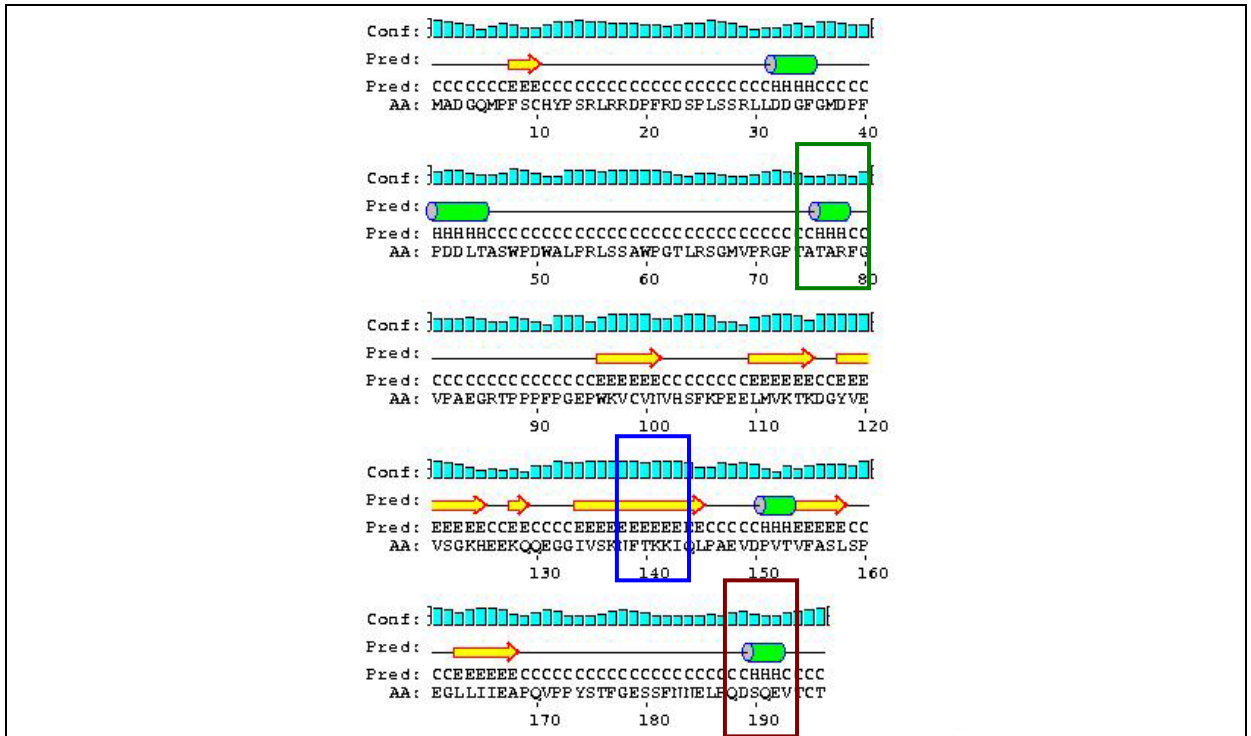
**Figure 43) Prédiction de structure tertiaire du domaine C-terminal de HSP70-1 (résidus 383 à 641) : alignement DnaK, *E.coli* et C-terminal HSP70-1**

Cet alignement représente la prédiction secondaire en vue de la prédiction tertiaire de HSP70-1 (humaine).

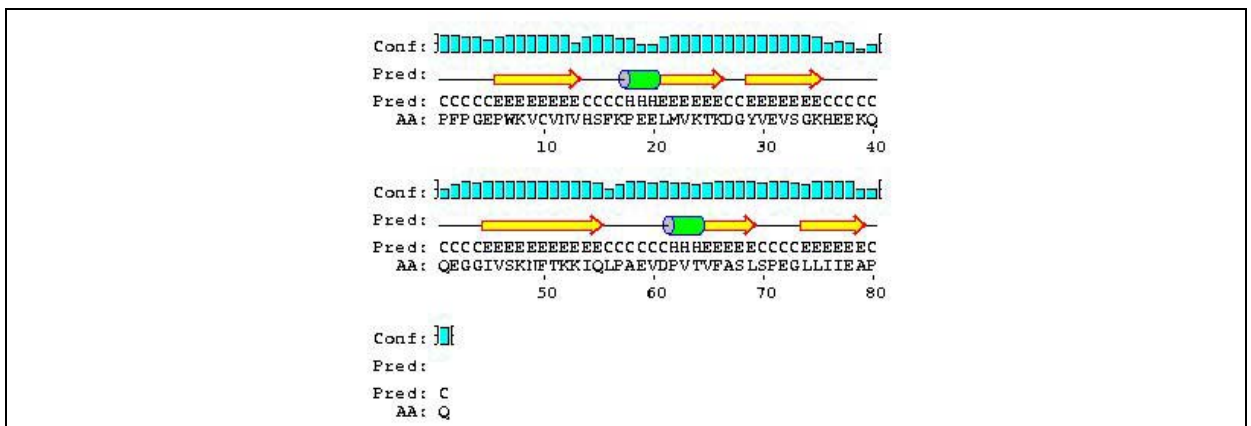
Feuillets β: notés E; hélices α: notés H; éléments sans structure secondaire: notés C (« coil »). Les éléments C peuvent correspondre à des boucles ou à des défauts de prédiction. La valine V correspond au résidu 388 (sur 637) de DnaK (*E. coli*).



**Figure 44) Prédiction pour la structure tertiaire du domaine C-terminal de HSP70-1**  
Structure de la protéine DnaK (origine : *E. coli*) résolue en 1996 par Zhu X *et al* (code PDB : 1DKZ).



**Figure 45) Prédiction de structure secondaire pour HSP22 (séquence entière ; sauvage)**  
 Prédiction de repliement secondaire obtenue à l'aide du logiciel PSIPRED trouvé à l'adresse suivante : <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>.  
 Le site SQ est indiqué sur la séquence par un rectangle rouge.  
 Les sites de mutations sont indiqués sur les séquences correspondantes par un rectangle bleu pour K141N/E et par un rectangle vert pour R78M.



**Figure 46) Prédiction de structure secondaire pour le domaine  $\alpha$ -cristallin (protéine HSP22, résidus 90 à 170)**  
 Prédiction de repliement réalisées à l'aide du logiciel PSIPRED.

L'alignement entre les deux homologues est présenté dans la figure 43 et la figure 44 présente la structure correspondante. Cette représentation de la structure de DnaK de *E.coli* (du résidu 388 au résidu 637) correspond donc au domaine C-terminal de HSP70-1 d'origine humaine.

L'identité obtenue est de 53% sur 562 résidus se recouvrant en alignant la totalité des séquences de HSP70-1 (d'origine humaine) et de DnaK (*E. coli*) (méthode utilisée : Sim, sur [www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Ces deux protéines homologues sont relativement proches. Ce résultat est, en somme, assez attendu puisque les protéines HSP70 sont connues pour être bien conservées à travers l'évolution.

D'après ces prédictions de structures, le domaine de fixation du substrat de HSP70-1 semble être constitué de feuillets  $\beta$  en grande majorité qui présentent une organisation particulière appelée communément *tonneau  $\beta$*  ou «  $\beta$  barrel ». De plus, ces feuillets  $\beta$  sont positionnés tels qu'ils forment une sorte de poche dans laquelle le substrat peut venir se fixer. Ce type de site de fixation pour le substrat se rencontre assez fréquemment parmi les protéines.

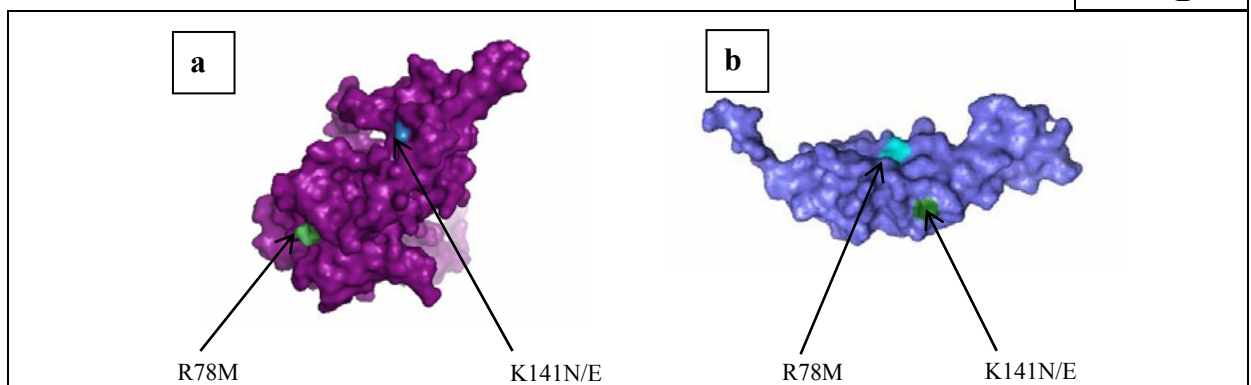
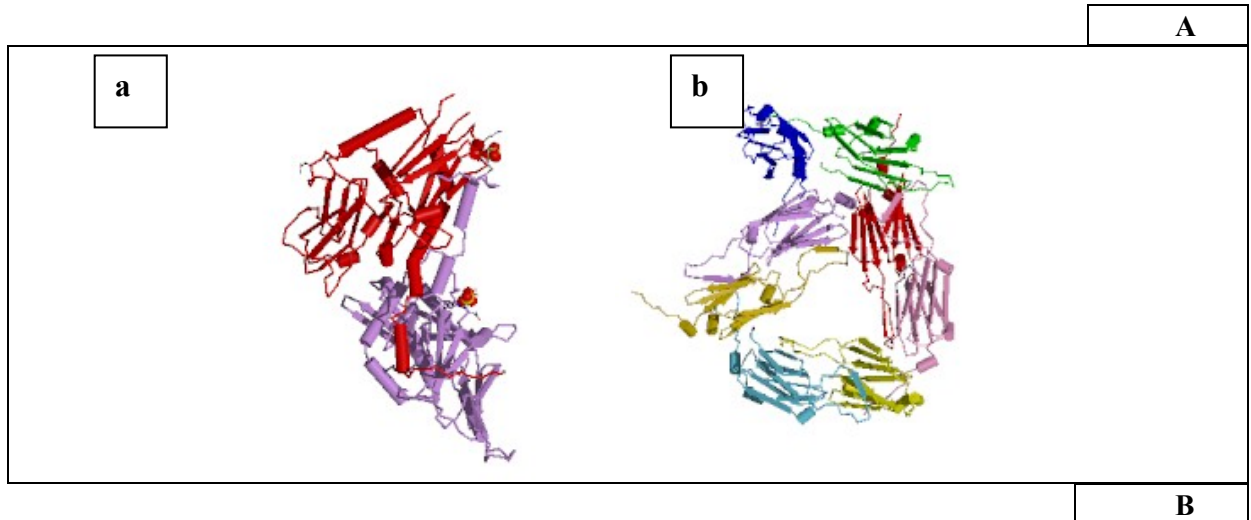
### **II.3.2.2- Prédictions de structures pour la protéine humaine HSP22**

La structure de la protéine humaine HSP22 n'est pas connue et assez peu de ses homologues ont été étudiés structurellement. Il faut néanmoins souligner une particularité rencontrée chez tous les membres de la famille des sHSP étudiés structurellement qui est une large prédominance des feuillets  $\beta$ , surtout concernant le domaine  $\alpha$ -cristallin (Surewicz WK et Olsen PR, 1995), et ce quelque soit l'organisme dont provient la protéine

La figure 45 représente les prédictions de structures secondaires obtenues en utilisant le logiciel PSIPRED sur la séquence entière de HSP22 (soit sur 196 acides aminés). Sur ces données, le site de phosphorylation supposé SQ (Ser<sup>190</sup>) correspond à une hélice  $\alpha$ . La prédominance des feuillets  $\beta$  en quantité est notable, par rapport aux hélices  $\alpha$ , et ce, surtout pour le domaine C-terminal. Cela paraît assez logique si l'on compare avec les protéines sHSP de structures connues qui possèdent aussi une large majorité de feuillets  $\beta$ . Le domaine  $\alpha$ -cristallin pris séparément a, lui aussi, fait l'objet d'une prédiction de structure secondaire (figure 46). Ce domaine est le mieux conservé dans la famille des sHSP. Il est situé en C-terminal (Ehrnsperger M *et al*, 1997) soit des résidus 90 à 170 (d'après le serveur Expasy). Les feuillets  $\beta$  demeurent inchangés et cela laisse supposer le fait qu'ils sont effectivement bien présents. Des prédictions de structures secondaires (figure 45 et annexe II-c) ont été réalisées pour les différentes mutations ponctuelles, par substitution d'un acide aminé par un autre créant ainsi un *faux sens*. Les mutations observées pour la protéine humaine HSP22 sont celles provoquant la neuropathie motrice distale héréditaire de type II (Irobi J *et al*, 2004) : K141N/E ou celle causant probablement la maladie de Charcot-Marie-Tooth : R78M (communication confidentielle du Pr V. Timmerman). Toutes ces prédictions s'avèrent être proches. Concernant les mutations faux sens, elles ne semblent pas affecter ni modifier la structure secondaire, prédite avec l'outil bioinformatique PSIPRED, de la protéine HSP22. Néanmoins, il faut tout de même ajouter que ces prédictions ne sont pas toujours obtenues avec le meilleur intervalle de confiance (indiqué en bleu au dessus des séquences sur les figures).

La protéine HSP22, constituée de 196 résidus, n'obtient pas de très bons scores avec la méthode de prédiction de structure tertiaire PSIPRED (GenThreader). Néanmoins, les protéines trouvées pour l'homologie de structure tertiaire appartiennent à la famille des sHSP. En effet, deux sHSP (figure 47 A) correspondent aux meilleurs scores obtenus.





**Figure 47) Prédiction de structure tertiaire pour HSP22 et positionnements probables des mutations provoquant des dystrophies motrices**

**A) Prédiction de structure tertiaire pour HSP22**

a) Meilleur score (considéré comme moyen) : 0,584/1, alignement de 172 acides aminés ; sHSP, origine : petit métazoaire : *Taenia saginata* (Stamler RJ *et al*, 2005). Protéines organisées en dimère.

b) Score moyen : 0,574/1 ; alignement de 103 résidus ; Small heat shock de *Methanococcus jannaschii* (un hyperthermophile) (Kim R *et al*, 1998). Protéines organisées en octamères.

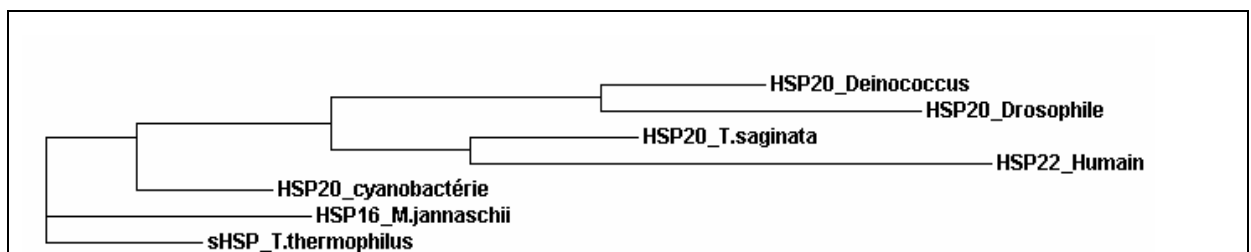
**B) Repositionnement des sites des mutations K141N/E et R78M dans les monomères de ces mêmes protéines**

a) sHSP, *T. siginata* : 25% d'identité avec HSP22

b) sHSP, *M. jannaschii* : 19% d'identité avec HSP22

Figures réalisées à l'aide du logiciel HHPRED à l'adresse suivante :

<http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit/index.php?view=hhpred> et du logiciel Pymol et des fichiers de la PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>).



**Figure 48) Arbre phylogénétique, méthode PHILIP, basé sur sHSP**

Arbre réalisé avec la méthode PHILIP sur le site web <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. Il est basé sur l'homologie des séquences des sHSP de différents organismes. Les séquences des protéines proviennent du site [www.expasy.org](http://www.expasy.org).

Les sHSP s'organisent bien en oligomères (Ehrnsperger M *et al*, 1997) et présentent bien une majorité de feuilletts  $\beta$ .

La prédiction de la structure tertiaire du domaine  $\alpha$ -cristallin seul donne, avec le meilleur score, qui reste néanmoins un score faible (0,477/1), la sHSP de l'hyperthermophile *M. jannaschii*.

Les sites des mutations K141N/E et R87M (provoquant des neuropathies motrices) sont positionnés sur les structures tridimensionnelles des homologues de HSP22 à l'aide du logiciel HHpred (Söding J *et al*, 2005 ; résultat présenté sur le monomère : figure 47 B). Ce logiciel permet d'aligner deux à deux les séquences en acides aminés des protéines (ex : HSP22 humaine et sHSP de *T.saginata*) et d'attribuer des scores à la similarité de leurs structures secondaires (respectivement, prédite et connue). D'après ces prédictions, quel que soit l'homologue considéré, les sites des mutations apparaissent sur l'extérieur de la molécule. La localisation externe prédite pour les sites de mutations sous-entend que la molécule ne sera pas forcément désorganisée, même si la mutation d'une lysine K en acide glutamique E s'accompagne d'une perte de charge et donc de la rupture très probable d'un pont salin. Donc, d'après ces prédictions, les neuropathies induites par ces mutations ne seraient donc pas forcément imputables au dépliement de la protéine HSP22, dépliement pouvant occasionner le plus souvent une perte de fonctionnalité pour la protéine ou un défaut dans une interaction.

Les feuilletts  $\beta$  caractéristiques du domaine  $\alpha$ -cristallin (correspondant aux 80 résidus en C-terminal – figure 46) (Ehrnsperger M *et al*, 1997) se retrouvent bien, avec un intervalle de confiance relativement élevé. L'arbre phylogénétique représenté dans la figure 48 est basé sur l'homologie de différentes séquences en acides aminés de protéines de la famille des sHSP : la HSP22 humaine, la HSP22 drosophilienne, la HSP20 de *Taenia saginata*, la sHSP de *Methanococcus jannaschii*, la HSP22 de la cyanobactérie, la HSP20 de *Thermus thermophilus* et la HSP20 de *Deinococcus radiodurans*. Cet arbre phylogénétique est tracé en respectant la distance entre les différents embranchements. Les résultats obtenus sur cet arbre sont similaires à ceux obtenus en cas de prédictions de structures secondaires pour ces mêmes protéines mais ils ne reflètent pas exactement l'évolution des espèces les résultats telle qu'elle fut décrite par Carl Von Linné en 1758. L'homologie obtenue lors de l'alignement des séquences prises deux à deux reste comprise entre 2 et 51% (51% entre *T.aquaticus* et *D.radiodurans* (annexe II-d)).

La prédiction des structures tertiaires de ces mêmes protéines semble être en accord avec la proximité trouvée entre les différentes séquences des protéines par cette même méthode empruntée à la génétique des populations.

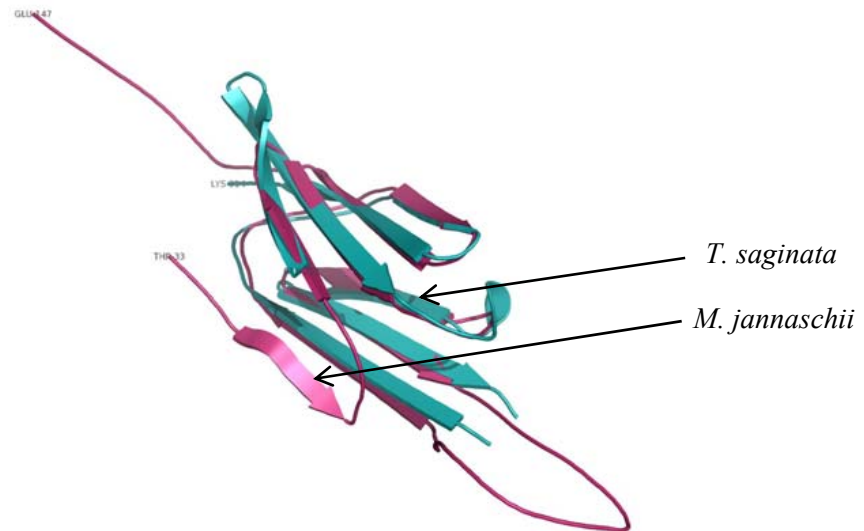
La figure 49 montre une superposition, réalisée par le logiciel Pymol des structures connues des domaines  $\alpha$ -cristallin de sHSP de *T. saginata* et *M. jannaschii*. Une forte similarité entre ces deux structures au niveau du domaine  $\alpha$ -cristallin est observée. En effet, les deux domaines  $\alpha$ -cristallins se superposent de façon quasi parfaite. Cette haute similitude est, par contre, moins marquée sur les alignements de séquences. La haute conservation de la structure du domaine  $\alpha$ -cristallin (plus que sa séquence) tend à sous-entendre l'importance fonctionnelle de ce domaine  $\alpha$ -cristallin. Pour le cas du domaine  $\alpha$ -cristallin des sHSP, il s'agit d'une conservation d'une structure et non d'une séquence.

Séquence 1: *T. saginata* (92 résidus)

Séquence 2: *M. jannaschii* (147 résidus)

26,5% d'identité dans 34 résidus se recouvrant

<i>M. jannaschii</i>	101	EEEEIYRTIKLPATVKEENASAKFENGVLVILP
<i>T. saginata</i>	222	EHREFYKAFVTPEVVDASKTQAEIVDGLMVVEAP
		* * * * * * * * * *



**Figure 49) Superposition des structures des sHSP provenant de *T. saginata* et *M. jannaschii***

Recherche de similarité (alignement de séquences) obtenue par la méthode Sim. Superposition obtenue avec le logiciel Pymol. Les séquences proviennent du serveur [www.expasy.org](http://www.expasy.org) et les fichiers pdb proviennent de la Protein Data Bank. La sHSP de *T. saginata* (résidus 222 à 314) est représentée en **bleu** et la sHSP de *M. jannaschii* (résidus 101 à 135) est représentée en **rouge**.

## **II.4- Discussion et conclusion : les HSP, étude structurale**

### **II.4.1- Préparation à la cristallisation**

La construction pGex2T-HSP70-1 a été tout d'abord utilisée. Après optimisation de l'expression et obtention des taux de protéines suffisants dans la fraction soluble (même si la grande majorité de la protéine produite se trouvait dans la fraction insoluble), plusieurs essais de purification sur colonne d'affinité ont pu être réalisés. Les produits obtenus furent testés par Western Blot avec deux anticorps spécifiques : un dirigé contre la protéine d'intérêt et la deuxième dirigé contre la protéine de fusion (la glutathion S transférase). Les résultats obtenus étant bien en accord avec ce qui était attendu, c'est-à-dire que c'est bien la protéine apportée par la construction plasmidique qui était produite ; les essais ont pu être poursuivis. Les problèmes de clivage de la GST n'ayant été résolus malgré tous les tests effectués, il a été décidé de changer la construction et de reprendre les expériences au niveau du clonage. Ainsi, il est apparu, notamment, que les GST s'organisaient en dimères après clivage, que le maximum obtenu pour le clivage restait insuffisant et que les concentrations successives ne parvenaient qu'à diluer la solution de protéine d'intérêt. Les essais réalisés avec la construction pGex-HSP70-1 n'ont pas abouti, et ce sans doute à cause de la difficulté liée à l'utilisation même de la protéine de fusion GST (glutathion S transférase). Ce type de construction pose, de plus, le problème d'obtention de la protéine d'intérêt dans la fraction insoluble (corps d'inclusion) si le clivage de la protéine de fusion est bien effectif (Schrodel A et de Marco A, 2005). Ce type de construction peut aussi engendrer des problèmes de clivage de la protéine de fusion (Feng XJ *et al*, 2005).

Le clonage a alors été effectué dans un nouveau vecteur, le pRSET d'Invitrogen, ayant cette fois-ci, une protéine étiquette beaucoup plus petite (6 histidines) ; ce type de construction ayant déjà fait ses preuves auparavant (Shen GJ *et al*, 1999 ; Ma X *et al*, 2006). Le gène de HSP22 a été obtenu par PCR à partir d'ADN génomique humain et celui de HSP70-1 par PCR à partir du plasmide pGex-HSP70-1. Ces deux gènes ont pu être introduits dans le plasmide pRSET.

Les structures de HSP22 et de HSP70-1 ont été ensuite prédites à l'aide de la bioinformatique.

### **II.4.2- Prédiction de structures pour les protéines HSP70 et HSP22**

Les prédictions de structure secondaire concernent le domaine C-terminal de la protéine HSP70 humaine, la structure de domaine N-terminal étant déjà connue. Ces prédictions montrent une organisation majoritairement en feuillets  $\beta$  pour le site de liaison au substrat. Les prédictions concernant la structure tertiaire du domaine C-terminal de HSP70-1 humaine donnent, avec un très bon score, le domaine C-terminal d'un homologue de HSP70, DnaK provenant de la bactérie *Escherichia coli* (Zhu X *et al*, 1996).

D'après ces résultats, la structure, tout comme la séquence de la protéine HSP70 se conserve assez bien à travers l'évolution. Cela suggère que les rôles joués par cette protéine sont clés pour l'organisme et pour sa survie. Le fait qu'il existe chez l'homme au minimum onze HSP70 différentes, provenant de loci d'ADN différents (Tavaria M *et al*, 1996), ce qui sous-entend une évolution convergente (c'est-à-dire allant dans une même direction), souligne encore la valeur de cette protéine pour l'organisme.

Les prédictions de structures secondaires données pour HSP22 (humaine) présentent toutes une majorité de feuillets  $\beta$  pour le domaine  $\alpha$ -cristallin. Les structures

tridimensionnelles existantes des protéines de la famille des sHSP à laquelle appartiennent ces deux protéines montrent, effectivement, une organisation en feuillets  $\beta$  pour le domaine  $\alpha$ -cristallin. Les prédictions de structures tertiaires réalisées à partir des séquences en acides aminés donnent les structures en trois dimensions des protéines homologues (Kim R *et al*, 1998 ; Stamler RJ *et al*, 2005). Les scores accordés à chaque structure sont en corrélation avec l'arbre phylogénétique obtenu par la comparaison des séquences en acides aminés de quelques sHSP. Il faut noter que, malgré la forte conservation de ces protéines à travers l'évolution, l'arbre phylogénétique obtenu pour les protéines ne suit pas l'évolution de l'arbre réalisé à l'aide des ARN ribosomiques et donnant une classification pour les individus entiers (annexe II-e ; Woese CR et Fox GE, 1977). Cette classification basée sur les ARNr semble néanmoins plus proche de celle basée sur l'étude des critères morphologiques, telle qu'elle fut décrite par Carl von Linné en 1758. La structure en feuillets  $\beta$  du domaine  $\alpha$ -cristallin des sHSP possède, en outre, la particularité d'être mieux conservée que les séquences en acides aminés des protéines de cette famille.

Les prédictions de structures secondaires réalisées sur les mutants K141N/E et R78M ne présentent pas de grandes différences avec celles réalisées pour la protéine sauvage. Il ne semble pas que, dans ce cas précis, le problème posé par ces mutations faux sens se répercute directement sur la structure de la protéine HSP22, étant donné que ces mutations sont très probablement situées sur la bordure externe de la protéine.

### **III.1- Synthèse bibliographique : les HSP, implication dans les voies de réparation de l'ADN**

#### **III.1.1- Implication des HSP dans les voies cellulaires**

Les HSP, en tant que protéines chaperonnes, jouent un rôle clé pour la cellule.

Il reste à savoir si les protéines HSP et plus particulièrement HSP70 et HSP22 sont impliquées dans les mécanismes de la réparation de l'ADN. HSP70 et HSP22 furent choisies pour cette étude par rapport à leur séquence en acides aminés (annexes I-b et I-e). Ce chapitre III décrit l'étude visant à démontrer l'implication de HSP70 et HSP22 dans les mécanismes de réparation de l'ADN, ainsi que l'étude de HSP70 appliquée à un nouveau moyen d'analyse médicale expérimenté au synchrotron ESRF, nommé Diffraction Enhanced Imaging (DEI), et, à une nouvelle thérapie mise au point au même endroit pour le traitement des cancers et plus particulièrement des glioblastomes.

##### **III.1.1.1- Les HSP dans les processus tumoraux**

Les HSP sont surexprimées dans de nombreuses tumeurs et sont aussi impliquées dans la prolifération, la différenciation, l'invasion, les métastases, la mort cellulaire et la reconnaissance par le système immunitaire. En effet, plusieurs récepteurs cellulaires HSP ont été caractérisés sur différents types de cellules pour leur capacité immuno-régulatrice : par exemple les CD40 des lymphocytes B, les récepteurs « tool-like » des cellules présentatrices d'antigènes (comme les monocytes ou les cellules dendritiques) et les CD94 des cellules « natural killers » (Granja C *et al*, 2004 ; Lehner T *et al*, 2004). Les HSP70 ont la particularité de se situer sur la membrane de certaines lignées de cellules cancéreuses alors qu'elles ne se trouvent pas sur les cellules saines correspondant à ces mêmes lignées cancéreuses. Certaines HSP membranaires (comme HSP60 et HSP70) ont été récemment désignées comme étant des marqueurs précoces de la tumorigénicité (Zhang H *et al*, 2005). Les HSP70 membranaires seraient une cible potentielle pour l'attaque cytotolytique médiée par les cellules immunitaires « natural killers » (Gehrmann M *et al*, 2005). De nombreuses études sont en cours pour tenter d'exploiter ce phénomène à des fins thérapeutiques.

La fonction anti-apoptotique des HSP en fait des outils privilégiés pour la recherche contre le cancer puisque les cellules tumorales résistent à la mort cellulaire (Creagh E *et al*, 2000). Il a été démontré (Jolly C et Morimoto RI, 2000) que lorsque la protéine p53 de contrôle du cycle cellulaire, est mutante et oncogène, elle se lie préférentiellement à HSP70, ce qui pourrait expliquer l'échappement de la cellule cancéreuse à l'apoptose. HSP90 interagit avec la protéine Src et il est suggéré que c'est avec l'aide des HSP que se réalise la translocation de Src dans le noyau, ce qui a une conséquence transformante pour la cellule (Jolly C et Morimoto R, 2000). Malgré tout, il a été montré que, dans certains cas (ex : cancer de la prostate), l'augmentation des taux cellulaires de HSP70 était directement liée à l'apoptose et qu'elle la favorisait (Wirth D *et al*, 2002).

Les HSP jouent également un rôle dans la régulation des récepteurs stéroïdiens, des caspases, des protéines kinases et des protéines contrôlant le cycle cellulaire. De même, la transcription des gènes codant pour les HSP est régulée par le cycle de division, la différenciation et la prolifération cellulaire, ce qui suggère un rôle central pour les HSP dans le développement des tumeurs (Feige U *et al*, 1996 ; Jolly C et Morimoto R, 2000).

Les taux d'expression de certaines des HSP peuvent aussi être associés à des informations concernant le pronostic de certains cancers. Ainsi, les taux élevés de HSP27 sont corrélés à un mauvais pronostic pour les carcinomes du foie, de l'estomac et de la prostate

mais aussi pour les ostéosarcomes. De même, l'élévation des taux de HSP70 correspond à un mauvais pronostic pour les carcinomes du sein, de l'endomètre, de l'utérus et de la vessie et un risque métastatique accru (Ciocca DR *et al*, 2005). En plus d'un éventuel pronostic, les taux de HSP présents indiquent dans quelle mesure le patient sera susceptible de répondre à un type de traitement donné, pour un type de cancer donné. Par exemple, les taux élevés de HSP27 apportent une résistance à la chimiothérapie en cas de cancer du sein ou de leucémies. De même, les taux importants de HSP70 génèrent une résistance à la chimiothérapie en cas de cancer du sein et de l'estomac, mais par contre, ils sont indicateurs d'une réponse positive à la chimiothérapie en cas d'ostéosarcome (Ciocca DR *et al*, 1993 ; Vargas-Roig LM *et al*, 1998; Ciocca DR *et al*, 2005).

### **III.1.1.2- Les HSP en tant qu' « outils » médicaux et thérapeutiques**

Pour toutes ces raisons et de par leur nature, les HSP sont très étudiées en recherche médicale aujourd'hui. Deux stratégies majeures sont explorées. La première stratégie consiste à modifier pharmacologiquement l'expression des HSP ou leur fonction de chaperonnes moléculaires. La deuxième stratégie vise à l'utilisation des HSP comme vaccins anticancéreux par l'exploitation de leur capacité à agir en tant qu'adjuvants pour le système immunitaire (Ciocca DR *et al*, 2005) (*adjuvant* : toute une substance capable d'augmenter les réactions immunitaires de l'organisme envers un antigène). Par exemple, les inhibiteurs de HSP90 (ex : geldanamycine) sont actuellement en cours d'essai clinique de phase 3 (Chiosis G *et al*, 2006). Il a aussi été montré que des peptides antigéniques complexés avec HSP70 avaient la capacité de générer des réponses T-cytolytiques efficaces (Javid B *et al*, 2004) et de déclencher une réponse immunitaire (Delneste Y, 2004). Des HSP70 sécrétées ont été testées comme molécules ayant pour but de cibler les cellules dendritiques. Cet essai a révélé que les HSP70 en solution pouvaient effectivement cibler les cellules dendritiques et constituaient là un vaccin d'ADN relativement efficace (Hauser H *et al*, 2004). Toutes ces propriétés démontrent l'intérêt de HSP70 en tant qu'outil pour les recherches médicales en immunologie.

### **III.1.1.3- Les HSP et les irradiations**

Certaines HSP (comme HSP60, HSP70 et HSP90 par exemple) ont été étudiées après certains types d'irradiation (ex : UV) et elles ont toutes présenté un accroissement de leur concentration intracellulaire directement après irradiation. Leur action après irradiation est néanmoins encore assez mal connue (Jaattela M, 1999 ; Kassem HS *et al*, 2002). Il fut montré récemment que HSP27 semblait jouer un rôle de protecteur cellulaire après irradiation par rayonnement ultra violet, probablement via la voie de réparation NER (Wano C *et al*, 2004).

### **III.1.1.4- Les HSP et la réparation de l'ADN**

Les HSP sont, encore aujourd'hui, relativement peu étudiées dans le cadre de la réparation de l'ADN. Adriana Brondani da Rocha et ses collaborateurs ont montré en 2004 que la radiorésistance de certaines lignées cellulaires glioblastomales est associée à l'augmentation des taux intracellulaires de HSP70 (HSP72) (Brondani da Rocha A *et al*, 2004). De même, HSP27 jouerait un rôle clé dans la radiorésistance des cellules provenant d'un cancer de la vessie (Kassem HS *et al*, 2002) et serait sans doute impliquée dans le

mécanisme NER (Wano C *et al*, 2004). HSP90 est connue pour être phosphorylée par la kinase DNA-PK impliquée dans la voie de réparation de l'ADN par suture (Lees-Miller SP et Anderson CW, 1989).

Néanmoins, le rôle des HSP dans les voies de la réparation de l'ADN n'a pas été clairement montré ni défini.

### **III.1.1.5- Cas particulier de HSP70**

Deux protéines de la famille HSP70 ont été étudiées : HSP70-1 qui est potentiellement inductible par le stress (Gunther E et Walter L, 1994) et HSP72 (aussi nommée HSP70 inductible) qui est connue pour être surexprimée par le stress (Faure O *et al*, 2004 ; Febbraio MA *et al*, 2004 ; voir annexe I pour les séquences). Ainsi, la séquence en acides aminés de la protéine HSP70-1 suggère que cette protéine possède de fortes chances d'être impliquée dans la réparation de l'ADN. En effet, certaines kinases fortement impliquées dans la réparation de l'ADN, ATM, ATR et DNA-PK (voir chapitre I ; Sarkaria JN *et al*, 1998 ; Abraham RT, 2004), présentent la particularité de phosphoryler leurs substrats sur les sites sérine-glutamine (SQ) ou sur les sites thréonine-glutamine (TQ) (Gatei M *et al*, 2000 ; Gatei M *et al*, 2001 ; Foray N *et al*, 2003). Or, HSP70-1 possède quatre sites potentiellement substrats de phosphorylation (deux SQ et deux TQ). De même, la séquence en acides aminés de la protéine HSP72 contient trois de ces sites SQ/TQ. Ces protéines chaperonnes sont connues pour être surexprimées après plusieurs stress (voir chapitre II.1) et pour être impliquées dans plusieurs voies de signalisation cellulaire mais leur implication dans la réparation de l'ADN restait non étudiée jusqu'à présent.

#### **III.1.1.5.1- Localisation cellulaire de HSP70**

Chez les mammifères et chez les insectes, HSP70 est localisée généralement dans le cytoplasme. Plusieurs types de stress provoquent une relocalisation des protéines HSP70 du cytoplasme au noyau où elles aident à la maintenance de l'assemblage et à la translocation des ribosomes puis ensuite elles sont surexprimées dans le cytoplasme (Velazquez J et Lindquist S, 1984 ; Welch W et Suhan J, 1986). HSP70 joue un rôle structural pour la cellule en participant au maintien du cytosquelette. Il a été montré que tout comme HSP90, HSP70 se lie aux microtubules et aux centrosomes (Liang P et McRae TH, 1997). HSP70 pourrait aussi être présente avec HSP90 dans les radeaux lipidiques après infection bactérienne (Triantafilou M *et al*, 2002).

#### **III.1.1.5.2- HSP70 en tant que senseur du stress et protéine de stress**

Plusieurs types de stress ont montré leur capacité à induire une réponse HSP70, (en plus de l'hyperthermie) : l'ischémie-reperfusion, l'hypoxie, les métaux lourds, les infections virales, les radiations ionisantes, le stress oxydatif (ex : peroxyde d'hydrogène; Tandara AA *et al*, 2005), les toxines, l'éthanol, les antibiotiques, les phénomènes inflammatoires, l'exercice physique, le cancer... (Feige U *et al*, 1996). C'est pourquoi HSP70 est considérée comme un senseur de stress efficace et a été décrite comme étant le senseur de stress cellulaire par excellence (Delmas F *et al*, 1996 ; Ryan JA et Heightower LE, 1996 ; Radjev S et Sharp FR, 2000 ; Han SG *et al*, 2005). HSP70 posséderait, en outre, la capacité de stabiliser la membrane lysosomale, c'est par ce moyen qu'elle augmenterait la survie cellulaire (Gyrd-Hansen M *et al*, 2004).



### **III.1.1.5.3-Implication de HSP70 dans les voies de transduction du signal**

HSP70 est connue pour son implication dans de nombreuses voies de transduction du signal, notamment dans celle des MAP Kinases (Maroni P *et al*, 2003 ; Ueda K *et al*, 2004).

### **III.1.1.5.4- HSP70 et l'apoptose**

HSP70 s'est révélée être un important facteur anti-apoptotique : elle inhibe les voies en amont et en aval de la caspase-3 (Jaattela M *et al*, 1998). Grâce à son interaction avec Apaf-1, HSP70 empêche aussi le relarguage du cytochrome c (voir chapitre I) dans le cytoplasme (Klein SD et Brune B, 2002) en inhibant la formation de l'apoptosome activé (Beere HM *et al*, 2000 ; Saleh A *et al*, 2000). HSP70 peut aussi se fixer sur l'AIF (apoptosis inducing factor) (Ruchalski K *et al*, 2006). HSP70 favorise l'apoptose médiée par TNF $\alpha$  (Ran R *et al*, 2004). Il a été montré qu'un des cofacteurs de HSP70, Bag1, pouvait avoir un effet anti-apoptotique en combinaison avec les effets de HSP70 et Bcl-2 (Nakagami H *et al*, 2004).

### **III.1.1.5.5- Rôles de HSP70 dans le cycle cellulaire**

HSP70 jouerait un rôle dans le cycle cellulaire puisqu'elle interagirait avec la protéine p53 (Cui CW *et al*, 2003). Le Heat Shock Factor (HSF-1) stimule la transcription et l'élongation (Corey LL *et al*, 2003).

### **III.1.1.5.6- Rôles de HSP70 dans les mécanismes d'inflammation**

HSP70 agit comme protéine anti-inflammatoire (Lee JH *et al*, 2004) et pourrait, avec HSP27, jouer un rôle protectif dans l'inflammation du cardiaque induite par l'angiotensine II (Chen Y *et al*, 2004). Les HSP70 solubles ont la capacité de stimuler la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Radons J et Multhoff G, 2005). HSP70 serait également un protecteur cellulaire et un neuroprotecteur (Radjev S et Sharp FR, 2000). Les HSP70 retrouvées dans le sérum sont relarguées par des voies non classiques et probablement en faisant intervenir les radeaux lipidiques du lysosome (Hunter-Lavin C *et al*, 2004).

### **III.1.1.5.7-Rôles de HSP70 dans les mécanismes d'immunité**

HSP70 joue un rôle majeur dans la réponse immunitaire, elle agit comme immunomodulateur (Granja C *et al*, 2004). HSP70 parvient à stimuler la sécrétion de cytokines et de chémokines, et à stimuler la maturation et le pouvoir adjuvant des cellules dendritiques (Lehner T *et al*, 2004) puisque HSP70 se fixe sur le CD40 (qui est le récepteur de co-stimulation des cellules dendritiques). HSP70 et d'autres récepteurs comme Lox-1 médient la *cross présentation* (c'est lorsque le non soi est présenté par des cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T pour les activer) des antigènes par les cellules dendritiques (Delneste Y, 2004). Les HSP70 solubles ont la capacité de se fixer sur les toll-like récepteurs des cellules présentatrices d'antigènes et ainsi stimuler l'immunité innée, comme par exemple par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Les HSP70 complexées avec des antigènes du non soi déclenchent une réponse T cytolytique. Les HSP70 (solubles et membranaires) peuvent activer directement les activités cytolytique et migratoire des cellules Natural Killers. En résumé, en fonction de leur localisation intra/extra cellulaire, et du statut du peptide fixé, les HSP70 activent la réponse immunitaire ou protègent les cellules de dégâts létaux induits par des stimuli de stress exogènes (Radons J et Multhoff G, 2005).

### III.1.1.5.8- Inhibition de HSP70

L'expression de HSP70 peut être inhibée par l'utilisation de certaines drogues. Ainsi, HSP70 est inhibée directement par le calcium ionophore A23187 (qui est un transporteur d'ions mobiles et qui forme des complexes stables avec des cations divalents) provenant de la levure *Streptomyces chartreusensis* (Elia G *et al*, 1996), la quercétine (bioflavonoïde végétal ; anti-oxydant) (Debes A *et al*, 2003) et indirectement par la wortmannine (toxique d'origine fongique) (Tomita M *et al*, 2000 ; Rénier W *et al*, soumis en 2006-A). Dernièrement, il a été montré que le triptolide (un diterpène tri-époxyde de la plante *Tripterygium wilfordii*) avait la capacité d'inhiber la réponse Heat Shock à travers l'inhibition du pouvoir transactivateur du Heat Shock factor HSF-1 (Westerheide S *et al*, 2006). HSP70 est activée par un inhibiteur de HSP90 : le 17-allylamino-diméthoxy geldanamycine (antibiotique ; origine : levure) (Guo F *et al*, 2005).

### III.1.1.5.9- Les mutations de HSP70 et les maladies

Certaines mutations de HSP70 ont été observées chez l'Homme et certaines sont reliées à de diverses maladies comme par exemple le diabète de type 2 ou la maladie d'Alzheimer (Zouari Bouassida K. *et al*, 2004 ; Petrucelli L *et al*, 2004). Dans la maladie de Parkinson (Cantuti-Castelvetri I *et al*, 2005), les HSP70 protègent les neurones contre l'effet toxique de l' $\alpha$ -synucléine (voir tableau 9).

<b>Hsp70-1</b>	-110CC et +190CC	Maladie de Parkinson, démence vasculaire, maladie d'Alzheimer
<b>Hsp70-2</b>	A2 P2/P2 AA G1538A	Maladie d'Alzheimer Obésité Infection sévère Hautes concentrations plasmatiques de TNF $\alpha$ et d'IL6
<b>Hsp70-hom</b>	AG2763 2437CT	Arthrite Hautes concentrations plasmatiques de TNF $\alpha$ et d'IL6, risque de défaillance hépatique

**Tableau 9) Les mutations de HSP70 et les maladies**

Références : Altomare K *et al*, 2003; Balog A *et al*, 2004; Balog A *et al*, 2005; Chouchane L *et al*, 2001; Clarimon J *et al*, 2003; Fung H *et al*, 2005; Jalbout M *et al*, 2003 ; Jenkins SC *et al*, 2000 ; Porto I *et al*, 2005 ; Schroder O *et al*, 2003; Schroeder S *et al*, 1999; Temple SE *et al*, 2004; Vargas-Alarcon G *et al*, 2002; Wu YR *et al*, 2004; Zouari Bouassida K *et al*, 2004

### III.1.1.6- Cas particulier de HSP22

De même, HSP22 a été étudiée dans le cadre de la réparation de l'ADN puisque sa séquence en acides aminés comprend un site SQ situé dans la partie C-terminale, ce qui fait de HSP22 un substrat potentiel de DNA-PK, d'ATM et d'ATR (voir annexe I-e). HSP22 est très peu connue mais certaines de ses mutations induisent des dystrophies motrices. En effet, la protéine HSP22 a la particularité d'être, lorsqu'elle mutée en lysine 141 (K141N/E), associée à la neuropathie motrice héréditaire de type II (Irobi J *et al*, 2004) et à la maladie de Charcot-

Marie-Tooth (neuropathie héréditaire) lorsqu'elle est mutée sur l'asparagine 78 (R78M)<sup>1</sup>. Des cellules lymphocytaires de patients portant ces mutations ont, elles aussi, été analysées.

#### **III.1.1.6.1- Localisation des sHSP**

Beaucoup de sHSP sont surexprimées dans les cellules du système nerveux et leur rôle est connecté à la protection des nerfs et des cellules gliales. Les sHSP sont aussi souvent surexprimées dans les cellules musculaires (muscles squelettiques et muscle cardiaque) (Plumier JC *et al*, 1997).

#### **III.1.1.6.2- Les sHSP et l'apoptose**

Les sHSP agiraient comme inhibiteurs de l'apoptose. Ainsi, la plupart des sHSP possède une fonction anti-apoptotique, et pas seulement HSP27 (Arrigo AP *et al*, 2002). L' $\alpha$ -B cristalline, par exemple, empêche le clivage activateur de la procaspase-3 (Kamradt MC *et al*, 2002).

C'est donc à cause de leurs séquences en acides aminés, mais aussi à cause de leurs fonctions et implications nombreuses dans les voies de signalisation cellulaires, que HSP70 et HSP22 furent étudiées dans le cadre de la réparation de l'ADN après stress. L'étude menée sur HSP70 fut ensuite appliquée à deux méthodes élaborées sur la ligne biomédicale du synchrotron (imagerie et thérapie).

Les méthodes utilisées sont reprises dans le chapitre III.2 et les résultats obtenus sont décrits dans le chapitre III.3.

### **III.1.2- Etude appliquée: le synchrotron de Grenoble (E.S.R.F.)**

#### **III.1.2.1- Le synchrotron de Grenoble (E.S.R.F.) et son fonctionnement**

Les rayons X, découverts par le physicien allemand Willem Conrad Röntgen en 1895, sont, aujourd'hui, largement utilisés dans de nombreux domaines de recherche et en médecine conventionnelle. Le rayonnement X est une onde électromagnétique (lumière), c'est-à-dire qu'il est constitué de particules élémentaires : les photons, d'énergie égale à  $h\nu$  (c'est-à-dire à la constante de Planck multipliée par la fréquence de l'onde) et non chargés. Les rayons X ont une longueur d'onde proche de l'Angström (soit  $10^{-10}$  m), ce qui est la distance inter atomique moyenne. C'est pourquoi l'utilisation des rayons X se révèle un outil de choix pour l'étude au niveau de l'atome. Dernièrement, la recherche a nécessité le développement de nouvelles sources génératrices de rayonnement X de plus en plus puissantes. Et dès 1930, les physiciens ont inventé le concept des accélérateurs de particules avec les premiers cyclotrons (collisionneurs de particules) et les premiers synchrotrons dès 1947. Le synchrotron ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) a été construit à Grenoble à partir de 1988 et il est opérationnel depuis 1994. Il produit des rayons X avec un large spectre de longueurs d'onde et une énergie critique très élevée. Il est financé et partagé par 18 pays européens. Il emploie plus de 600 personnes. De nombreux types d'expériences sont réalisés dans ce centre de recherche de pointe. Les rayons X sont produits en courbant la trajectoire d'électrons à une

---

<sup>1</sup> Communication privée du Pr Vincent Timmerman, Université d'Anvers, Belgique.

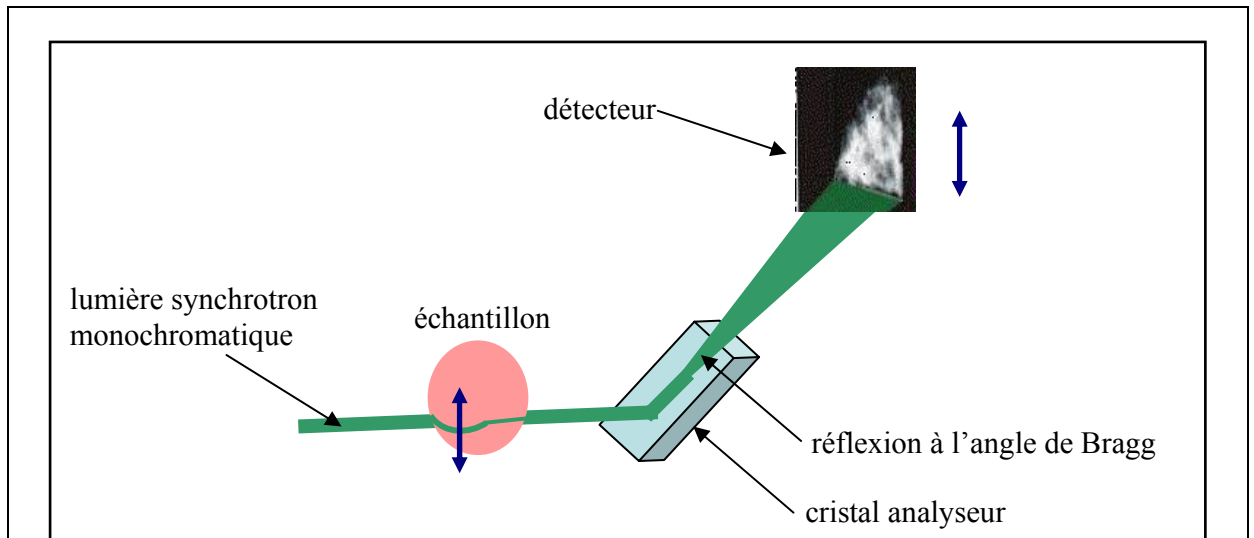
énergie de 6 GeV et une intensité maximale de 200 mA. La machine fonctionne de la façon suivante: des électrons sont émis par une cathode chaude et ensuite accélérés à une forte énergie (200 MeV) par un pré injecteur ou accélérateur linéaire (nommé *linac*). Puis ils sont à nouveau accélérés dans le booster (accélérateur circulaire de 300 mètres de circonférence) grâce à des champs électriques radiofréquences (leur énergie est encore augmentée de cette manière jusqu'à atteindre 6 GeV) puis ils sont transférés dans l'anneau de stockage (circonférence: 844m) où ils pourront être déviés pour suivre une trajectoire circulaire grâce à des aimants de courbure (ou « bending magnets » BM) (voir le *plan de la machine\**, annexe III-a). Entre les aimants de courbure, des sections droites permettent, en plus de la focalisation, l'insertion d'assemblages magnétiques appelés *éléments d'insertion* (ou « Insertion devices » ID). Ces éléments permettent de faire osciller les électrons autour de leur trajectoire grâce au champ magnétique généré par ces aimants. C'est ceci qui caractérise les synchrotrons de la troisième génération. La déviation des électrons produit ainsi un rayonnement de photons sur mesure.

Il existe deux types d'éléments permettant de modifier le faisceau d'électrons:

Les *wigglers* : le spectre lumineux produit est continu, son intensité et son énergie critique sont réglables.

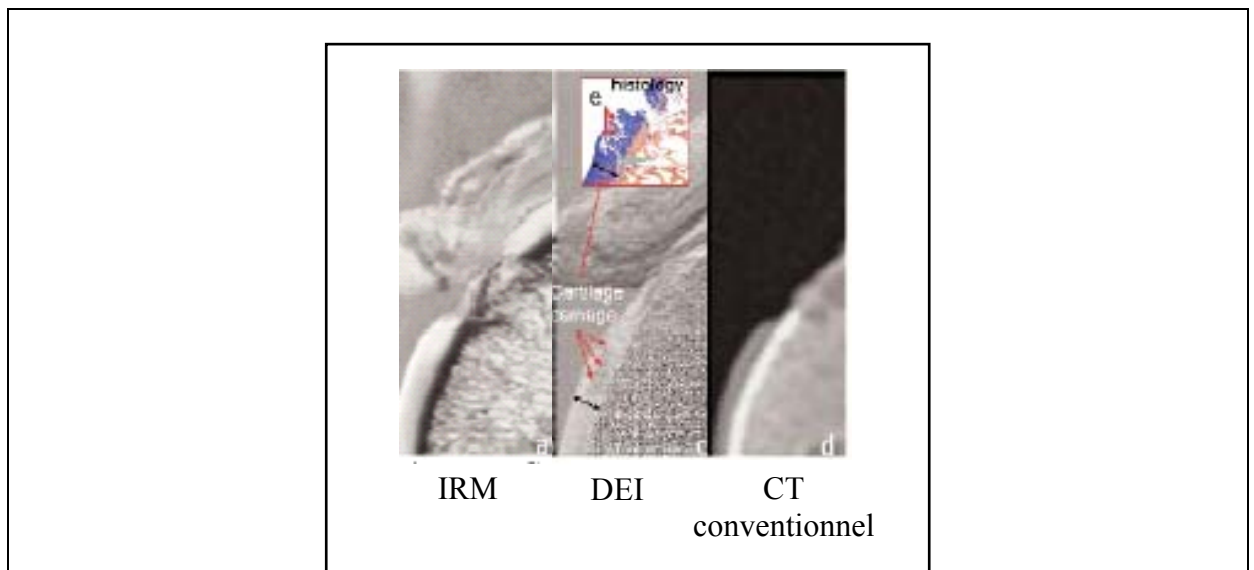
Les *ondulateurs* : les cônes de lumière interfèrent entre eux destructivement ou constructivement, ce qui donne un spectre de raies avec une brillance renforcée pour certaines longueurs d'onde seulement. Le faisceau lumineux produit est très peu divergeant.

A l'intérieur de l'anneau de stockage, il existe un vide très poussé qui permet aux électrons de circuler en produisant le moins de collision possible de manière à augmenter la durée de vie du courant stocké. Le flux des électrons reste dans l'anneau pendant environ cinquante heures (l'intensité diminue graduellement). L'anneau doit donc être rempli de temps en temps. Les rayons X produits à l'ESRF sont très durs, c'est-à-dire qu'ils sont très énergétiques. Ils sont  $10^5$  plus intenses que ceux produits par les sources conventionnelles trouvées dans les hôpitaux. L'intensité et le spectre du faisceau X sont adaptés au type d'expériences envisagé. Le faisceau produit peut être extrêmement focalisé (de l'ordre du micron ou même moins). Bien des domaines autres que la biologie structurale comme: la médecine, la chimie, la physique, les sciences de la Terre, l'études des matériaux, l'industrie et l'environnement utilisent ces sources de lumière pour réaliser des expériences. Toutes ces expériences se déroulent dans des laboratoires spécialement adaptés appelés *lignes de lumière\** (annexe III-b). Il en existe une quarantaine au Synchrotron de Grenoble. Le faisceau est calibré et modifié avant d'arriver sur l'échantillon au niveau de la «experimental hutch». Les modifications sont pilotées depuis la cabine de contrôle, et ce pour toutes les lignes de lumières du synchrotron. L'intensité peut être ajustée ; le spectre de longueur d'onde peut être modifié. Il est aussi possible d'influer sur la largeur du faisceau en construisant des lignes plus longues (exemple: la ligne biomédicale ID17). Il n'existe aujourd'hui, que trois synchrotrons dans le monde opérant à des niveaux d'énergie de l'ordre de 6 GeV: ce sont tous des synchrotrons de troisième génération: au Japon (Spring8), aux Etats Unis (APS) et en France (ESRF).



**Figure 50) Schéma représentatif de l'imagerie par méthode DEI**

Le principe de la Diffraction Enhanced Imaging est représenté sur ce schéma. L'échantillon et le détecteur peuvent être déplacés verticalement. Cette méthode permet d'obtenir de images plus focalisées.



**Figure 51) Exemple d'image obtenue par DEI**

Imagerie du cartilage (orteil humain) réalisée par différentes méthodes (images : P. Coan).

L'image de gauche correspond à une image de cartilage obtenue par imagerie par résonance magnétique (IRM – durée d'obtention > 5 heures), celle du milieu correspond à la DEI (c'est la seule méthode qui donne une information sur l'histologie du cartilage – durée d'obtention : rapide) et l'image de droite correspond à une image de scanner classique (CT : computed tomography).

### **III.1.2.2-La recherche médicale (ligne biomédicale ID17\*)**

Les programmes de recherche de la ligne biomédicale concernent essentiellement l'imagerie médicale (l'angiographie coronarienne, la bronchographie et la tomographie cérébrale) et la radiothérapie expérimentale (Suortti P et Thomlinson W, 2003). Les principales propriétés particulières du rayonnement synchrotron (forte fluence et large gamme spectrale (de 20 keV à 100 keV), et polarisation dans le plan horizontal) et l'utilisation du monochromateur installé sur la ligne biomédicale ID17\* (annexe III-d) permettent aux expérimentateurs de sélectionner un rayonnement quasiment monochromatique à flux intense et ajustable à la longueur d'onde voulue. Le faisceau monochromatique est très peu divergeant (à 150 m du point de source : 150 mm de large et 10 mm de haut). Grâce à ces caractéristiques, le rayonnement synchrotron est un outil de choix pour la recherche médicale. Le fait que le faisceau soit dans un plan horizontal immobile pose cependant un problème technique. Contrairement aux appareils utilisés conventionnellement à l'hôpital où le patient ne bouge pas et le faisceau se déplace, dans ce cas-ci, c'est le patient (ou l'échantillon) qui est déplacé (scan vertical en mode *angiographique* ou rotation sur lui-même en mode *tomographique* ou même combinaison des deux mouvements) (Elleaume H *et al*, 1997 ; Thomlinson W *et al*, 2000). La dosimétrie est très précisément mesurée pour toutes ces expériences grâce à une chambre d'ionisation couplée à un électromètre UNIDOS et au détecteur germanium.

#### **III.1.2.2.1- Les autres applications de la ligne biomédicale ID17**

Le synchrotron ESRF compte quatre longues lignes de lumière dont la ligne biomédicale ID17. Les chercheurs d'ID17 ont mis en place des radiothérapies comme la « Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy » (SSRT) et la thérapie par microfaisceau (MRT). La MRT consiste à faire passer le faisceau de rayons à travers un collimateur en forme de peigne qui le coupe en microfaisceaux de 25 µm de large séparés par 200 µm. Il est possible de modifier la largeur des faisceaux et la largeur d'espacement entre deux raies. La dose délivrée au niveau des pics est assez haute ( $\geq 1\ 000$  Gy) mais la dose vallée (qui correspond à la dose reçue entre les pics) est calculée pour être inférieure à la dose de tolérance du tissu sur lequel l'expérience est pratiquée. La MRT a pour but de cibler la vascularisation tumorale (néo-angiogénique) qui est toujours plus fragile et moins bien organisée que la vascularisation saine.

Plusieurs techniques d'imagerie sont développées sur ID17 : « Absorption Technique », « K-edge imaging », « Computed Tomography » et « Phase Contrast Technique ». Les résultats obtenus en imagerie sur ID17 dépassent, en définition et en résolution, les images obtenues avec des appareils conventionnels (ex : de type scanner).

#### **III.1.2.2.2- DEI ou nouvelle méthode d'imagerie appliquée à l'étude du cartilage**

La technique de « Diffraction Enhanced Imaging » (DEI) par synchrotron constitue une nouvelle méthode d'imagerie par contraste de phase (Chapman D *et al*, 1997). Cette technique se base sur l'utilisation d'un cristal analyseur (monocristal de silicium orienté). Le cristal permet de sélectionner l'énergie à laquelle la détection se fera sur le détecteur et d'ouvrir une fenêtre déplaçable sur la bande passante du faisceau monochromatique incident sur l'échantillon, en fonction de la position angulaire du cristal analyseur (angle de Bragg) (voir figure 50). Cette nouvelle méthode augmente le contraste de l'image obtenue sur des détails peu absorbants (Pageot E *et al*, 2005). Le laboratoire utilise couramment cette méthode

pour, par exemple, l'analyse histologique (sans l'utilisation de marquage) du tissu mammaire (Fernandes M *et al*, 2005) et pour l'étude des articulations et plus particulièrement pour l'analyse du cartilage. Cette nouvelle méthode d'imagerie donne des images du cartilage avec un contraste et une résolution importants, et cela sans l'ajout d'aucun agent de contraste et sans prélèvement de tissu (Wagner A *et al*, 2005). Cette technique servira à terme à imager les articulations de patients atteints d'arthrite (inflammation des articulations) ou d'arthrose (dégénération du cartilage). Cette méthode ne requiert qu'une dose très faible de rayons X (de l'ordre de 10 mGy) et elle permet d'estimer très finement les dommages du cartilage (figure 51 et Mollenhauer J *et al*, 2002 ; Muehleman C *et al*, 2004). Le cartilage, tissu essentiel pour le mouvement, est composé de cellules spécifiques : les chondrocytes. Les chondrocytes sont des cellules de tissu conjonctif particulières : elles contiennent des fibres solides de collagène et occupent un espace de la matrice du cartilage. La dégénération de cet espace cause toutes les maladies des articulations (et pas seulement les maladies dépendantes de l'âge) que nous connaissons aujourd'hui. Plusieurs expériences ont été menées sur un modèle *in vivo* : les cochons d'inde. Ces derniers possèdent la singularité de présenter de l'ostéoarthrite (qui est une forme courante de l'arthrose) dès l'âge de 6 mois (Coan P *et al*, 2005).

La radiosensibilité des chondrocytes (cellules constituant majoritairement le cartilage) issues de culture primaire demeure peu connue (Takahashi T *et al*, 2003). En effet, il a été montré récemment que certaines cellules présentaient une forte radiosensibilité aux faibles doses d'irradiation par rayonnement X (Marple B *et al*, 2004 ; Short SC *et al*, 2005 ; Tubiana M *et al*, 2006). La méthode d'imagerie DEI est-elle radiosensibilisante pour les cellules ? Et l'est-elle plus qu'une méthode d'imagerie utilisant une source d'irradiation de type conventionnel ? Pour tenter de répondre à ces questions, deux marqueurs furent utilisés: la phospho-histone H2Ax ( $\gamma$ H2Ax), un marqueur des cassures double brin de l'ADN (Rothkamm K *et al*, 2003 ; Foster ER et Downs J, 2005) et la protéine de choc thermique HSP70, un marqueur du stress cellulaire. Les résultats obtenus sur deux cultures primaires (chondrocytes de hanche et fibroblastes de peau), sont présentés dans le chapitre III.3.3. Ces expériences consistent en une étude préalable, s'inscrivant dans le cadre de la détermination de la toxicité relative de la méthode d'imagerie DEI, sur les cellules humaines non transformées.

### **III.1.2.2.3- Radiothérapie par photo activation de l'élément platine ou « synchrotron PAT-Plat »**

#### **III.1.2.2.3.1-Les tumeurs cérébrales**

En France, plus de 260 000 nouveaux cas de tumeurs apparaissent chaque année. Parmi tous ces cancers, les tumeurs du cerveau demeurent les plus difficiles à traiter. Elles touchent en général 1 personne sur 10 000 et environ 3 000 nouveaux cas se déclarent en France par an. 65% des tumeurs cérébrales détectées appartiennent à la classe des gliomes (très haut degré de malignité). Chez l'enfant les tumeurs cérébrales sont également très fréquentes, les plus fréquentes après les leucémies. Actuellement, l'espérance de vie des patients atteints de gliomes n'atteint pas 6 mois. Les moyens de traiter ce type de tumeurs cérébrales se révèlent être, aujourd'hui encore, assez limités. La première méthode utilisée reste la chirurgie. La tumeur est enlevée, avec toujours le risque de toucher les centres importants. La radiothérapie seule réduit la taille de la tumeur mais les tissus sains peuvent très mal supporter l'effet des rayons X. La chimiothérapie employée seule se révèle peu efficace et souvent très toxique (neurotoxicité importante). En conclusion, le développement de nouvelles thérapies pour les tumeurs cérébrales relève de la nécessité.

#### **III.1.2.2.3.2- Une nouvelle hypothèse**

Dans les années 1970-80, une hypothèse originale est apparue : la photo-activation. Imaginée par les physiciens, cette idée consiste en l'incorporation d'une molécule de chimiothérapie contenant un élément lourd ( $Z$  élevé) directement dans la tumeur, suivie par l'irradiation de la tumeur à l'énergie de résonance spécifique de cette molécule. Ainsi, en théorie, l'irradiation d'un élément lourd à son énergie d'absorption du seuil K conduit à l'émission de photoélectrons. Ces derniers interagissent à proximité de cet élément lourd et provoquent sans doute le déclenchement d'électrons secondaires. L'émission des électrons Auger décroîtrait brutalement à ce même moment. L'iode, le gadolinium et plus récemment le platine et le plomb ont été testés dans le cadre de la photo activation (Laster BH *et al*, 1993 et Jonsson AC *et al*, 1996, Corde S *et al*, 2003). Les conséquences de cette émission de photoélectrons sont des lésions plus nombreuses et aussi plus difficilement réparables. L'effet produit serait donc fortement accru, par rapport à l'effet observé en présence de la molécule seule. Les lésions produites dans l'ADN seraient dues à un probable effet indirect associé à la formation de radicaux libres. Les irradiateurs classiques, utilisés pour une radiothérapie conventionnelle, ne peuvent pas réaliser cette technique, parce qu'ils ne sont pas capables de produire un rayonnement X avec une puissance et une fluence assez forte. C'est pourquoi, afin de produire des lésions non réparables dans l'ADN des cellules tumorales, des *rayons X monochromatiques issus d'une source synchrotron* sont utilisés pour l'irradiation de la tumeur marquée par la molécule chimiothérapique (Laster BH *et al*, 1993). Cette thérapie est nommée SSRT (Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy). De nombreuses études *in vivo* sur les souris ou rats porteurs de tumeurs (Kimler BF *et al*, 1993), ont été réalisées associant le platine à une irradiation par rayons X pour traiter des tumeurs implantées à des animaux, mais ces études n'ont pas montré, au début, une augmentation significative de la survie.

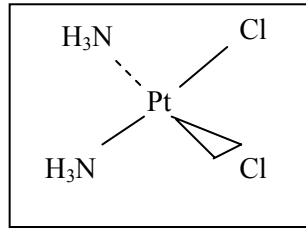
#### **III.1.2.2.3.3- L'effet du cis-platine sur l'ADN**

Le cis-platine (cis-diamino-dichloro-platinum ou cDDP ; figure 52) est une molécule chimiothérapique fréquemment utilisée en clinique (Screnci D et McKeage MJ,1999). Il produit après injection dans l'organisme toute une série de dommages. Il possède la particularité de libérer l'atome lourd de platine qui se fixe à l'ADN, plus particulièrement au niveau des régions linker comme l'histone H1. Sa présence génère des adduits de l'ADN (Dewit L, 1987) mais aussi des « cross-links » (c'est-à-dire des liaisons covalentes) entre l'ADN et les protéines environnantes. Les cellules traitées au cDDP vont devoir réparer leurs lésions d'ADN ou sinon elles risquent des arrêts dans leur cycle cellulaire et même la mort mitotique ou l'apoptose. Récemment, il a été montré que les adduits provoqués par le cDDP avaient la particularité d'inhiber l'activité de la protéine kinase DNA-PK en empêchant sa sous unité Ku de se déplacer sur l'ADN, ce qui va inhiber le mode de réparation par suture (ou NHEJ pour Non Homologous End Joining). Parallèlement, les adduits provoqués par le cDDP ont la capacité de promouvoir l'assemblage des protéines BRCA1 et BRCA2 avec RAD51 pour participer à la réparation par la voie de recombinaison homologue. En conséquence, le cis-platine pourrait se révéler très efficace dans les traitements des cancers présentant des déficiences dans la voie de réparation par recombinaison homologue.

#### **III.1.2.2.3.4- L'utilisation du synchrotron**

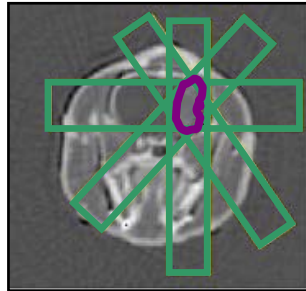
Le rayonnement monochromatique, ultra brillant et possédant un flux de photons très important, de la ligne médicale ID17 du synchrotron de Grenoble, est utilisé pour produire un faisceau de rayons X ayant l'énergie adéquate nécessaire à la photo activation du cis-platine,





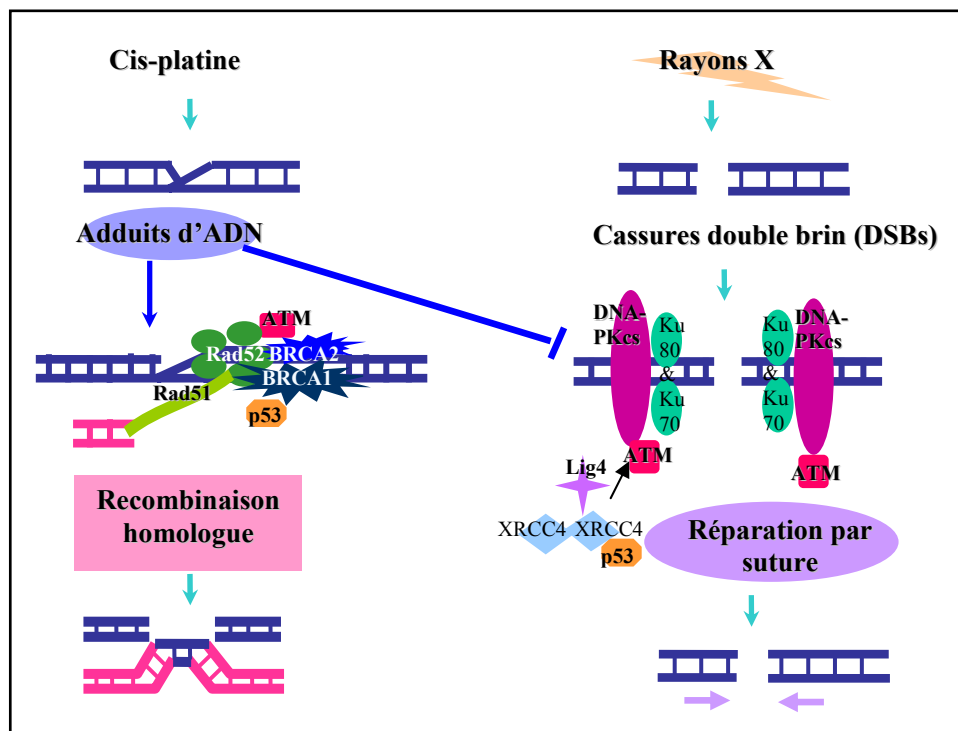
**Figure 52) Molécule de cis-platine (cDDP ; cis-diamino-dichloro-platinum)**

Deux ions ammonium et deux ions chlorure sont attachés sur une molécule de platine en position « cis ».



**Figure 53) Géométrie de l'irradiation de la tumeur – Cerveau de rat**

But : obtenir le maximum de dose au niveau de la tumeur entourée en violet (d'après Biston MC *et al*, 2004).



**Figure 54) Schéma représentatif de la « synchrotron PAT-Plat »**

Les adduits d'ADN créés par la PAT-Plat inhibent la réparation par suture (à travers l'inhibition de la kinase DNA-PK) et favorisent la réparation par recombinaison homologue.

La « synchrotron PAT-Plat » augmente ainsi par 3 le nombre de DSBs irréparables, c'est pourquoi elle est très délétère pour les tumeurs (d'après Corde S *et al*, 2003).

soit à 78,8 keV, l'énergie au dessus du seuil K (ou « above K-edge shell ») de l'élément platine Pt ( $Z=78$ ) : 78,34 keV, ce qui correspond à une longueur d'onde de 0,158 Å. La désintégration d'un composé métastable du cDDP, le  $^{193m}\text{Pt}$ , génère des photoélectrons qui produisent des microdépôts. Ces microdépôts suffisent à créer des cassures double brin d'ADN. Ce phénomène est appelé la photo-activation de l'élément platine ou *synchrotron PAT-Plat*. La tumeur reçoit le maximum de l'irradiation, tout en sauvegardant le plus possible les tissus sains (voir figure 53).

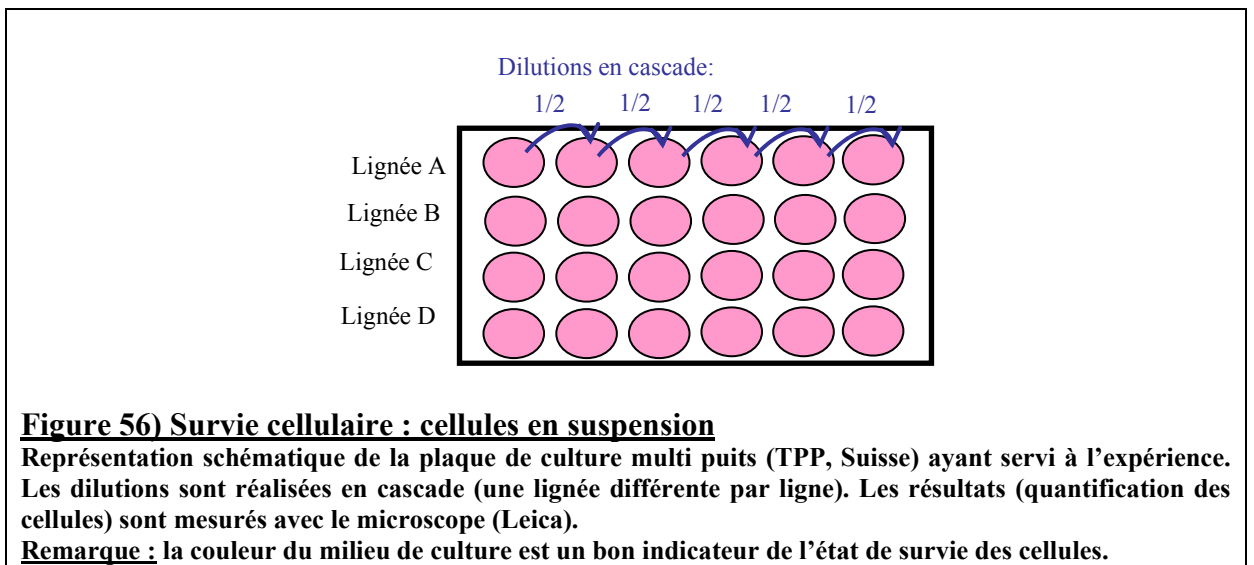
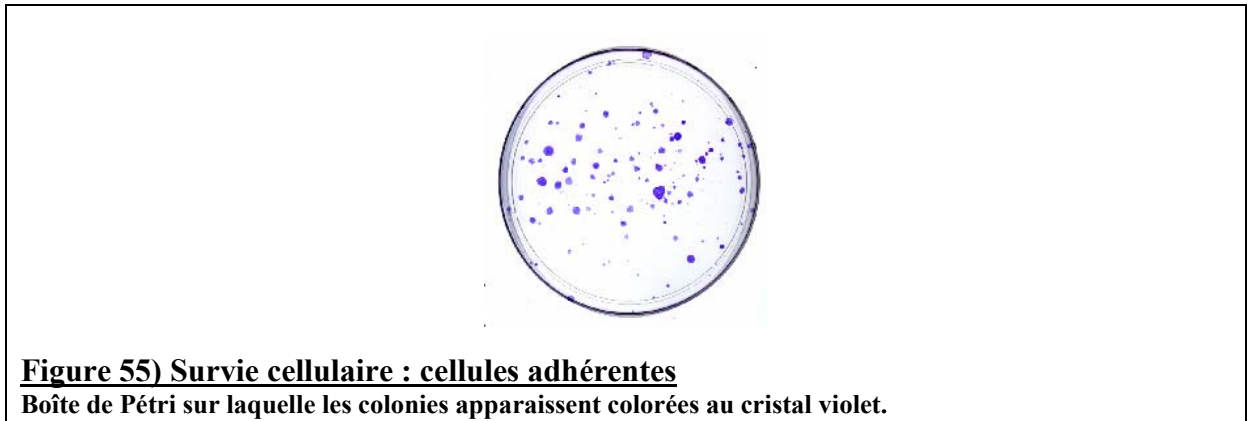
En radiothérapie, il faut toujours tenir compte de l'effet radiotoxique sur les cellules avoisinantes de la tumeur. La balance entre le traitement de la tumeur et l'économie des tissus sains doit toujours être respectée.

#### **III.1.2.2.3.5- Le principe de la photo activation du cis-platine par rayonnement synchrotron**

Le fait d'associer radiothérapie et chimiothérapie pourrait potentiellement augmenter l'effet des traitements anti-cancéreux. La photo activation du cis-platine par rayonnement synchrotron donne un certain nombre de cassures double brin de l'ADN supplémentaires qui sont lentes à réparer (multiplication par 3 du nombre de cassures double brin). L'ADN est comme « haché », ce qui génère un nombre de micronoyaux supplémentaires (en effet, dans ce cas, l'ADN expulsé hors de la cellule forme un ou plusieurs petits noyaux accolés au noyau ; voir figure 14). De plus, la photo-activation du cis-platine par rayonnement synchrotron, via l'inactivation de DNA-PK (voir chapitre I), promeut la réparation par recombinaison homologue médiée par la protéine de réparation à fonction ATPasique Rad51. Depuis environ 7 ans, les chercheurs de l'équipe INSERM U647-RSRM se sont penchés sur le problème de la SSRT utilisant l'élément platine, aussi nommée « synchrotron PAT-Plat ». Les résultats moléculaires, d'abord décrits par Corde S et ses collaborateurs en 2003 après des études sur une lignée cellulaire humaine (SQ20B) (figure 54), ont été confirmés dans la lignée de gliome de rat F98. Ce même modèle a permis d'obtenir des résultats prometteurs après une étude de survie *in vivo* menée en 2004 (Biston MC *et al*, 2004). L'irradiation de la tumeur (en mode tomographique) requiert une géométrie particulière. Après l'ajustement des dimensions du faisceau à la taille de la tumeur, et puisque le faisceau de rayons X reste fixe, l'orientation de l'animal s'effectue de manière à obtenir le maximum de dose au niveau de la tumeur et de façon à ce que les rayons X ne traversent qu'une seule fois les tissus sains. L'axe de rotation du support se positionne au niveau du centre de la tumeur (figure 53). Cette étude, réalisée chez les rats Fisher porteurs de gliomes F98 a montré que le traitement de « synchrotron PAT-Plat » (c'est-à-dire de SSRT impliquant l'élément platine), avec une dose de 15 Gy et une concentration finale de 30µM de cDDP, augmentait la survie des rats. Ainsi, 34% des rats demeuraient vivants un an après le traitement, et, fait remarquable : guéris de leur tumeur.

Les premiers essais cliniques impliquant des dérivés du platine (de faisabilité : phase I) sont en cours de discussion et d'autres impliquant des dérivés iodés seront bientôt mis en place.

Le rôle potentiel joué par HSP70 a été investigué dans le cadre de ces études préalables. Toute une série de tests préliminaires a été réalisée pour déterminer les effets du cDDP seul, de l'irradiation seule. La combinaison du cDDP et du rayonnement synchrotron au seuil K du platine (au-dessus, soit à 78,8 keV) a été effectuée et un test d'immunofluorescence a suivi. Les résultats sont montrés dans le chapitre III.3.4.



## **III.2- Matériels et méthodes : radiobiologie**

Ce chapitre reprend les méthodes utilisées pour les expériences visant à démontrer le rôle joué par HSP70 et HSP22 dans les voies de la réparation de l'ADN.

### **III.2.1- Culture de cellules humaines**

Le milieu de culture utilisé est le milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco-Invitrogen France, Cergy Pontoise) supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal) et 1% (v/v) des antibiotiques pénicilline + streptomycine pour les cellules adhérentes ou le milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco-Invitrogen) supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal) et 1% (v/v) de pénicilline + streptomycine pour les cellules en suspension. Les cellules sont cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules humaines adhérentes suivantes ont été utilisées :

#### Les témoins :

- 1BR3 : fibroblastes de peau normales
- 1BR3 Neo : fibroblastes de peau transformés par le virus de singe SV40
- 293: cellules épithéliales de rein d'embryon
- HMEC : cellules épithéliales immortalisées avec le virus SV40

#### Les mutants dans les systèmes de réparation de l'ADN :

- AT5BIVA : fibroblastes de peau transformés par SV40 (mutation de la protéine ATM)
- AT1BR : fibroblastes primaires issus d'un patient atteint d'Ataxia telangiectasia
- HCC 1957 : cellules dérivées d'un carcinome ductal (mutation de la protéine BRCA1)
- MO59K : cellules de glioblastome
- MO59J : cellules de glioblastome (mutation de la protéine DNA-PK)

#### Les lignées tumorales :

- PC3 : cellules provenant d'un adénocarcinome de prostate
- HT29 : cellules dérivées d'un carcinome colorectal
- H1299 : cellules provenant d'un carcinome pulmonaire
- IGROV-1 : cellules provenant d'un carcinome ovarien
- MCF7 : cellules issues d'un carcinome mammaire (non invasif)
- MDA-MB231 : cellules issues d'un carcinome mammaire (invasif)
- T47-D : cellules provenant d'un adénocarcinome mammaire

#### Les cellules humaines en suspension suivantes (mutants HSP22) ont été utilisées :

- CMT M10: lymphocytes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (mutation K141N/E du gène *hsp22*)
- CMT M17: lymphocytes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (mutation K141N/E du gène *hsp22*)
- CMT 570/AJ135: lymphocytes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (mutation R78M du gène *hsp22*).

Les cellules CMT (pro lymphocytes non différenciés totalement) sont immortalisées à l'aide de l'EBV (Epstein Barr Virus).

Création de lignées mutantes en HSP70 :

- 1BR3Neo HSP70-1(+) : lignée surexprimant stablement HSP70-1 sauvage
- 1BR3Neo HSP70-1(Cla1) : lignée surexprimant stablement HSP70-1 tronquée
- 1BR3Neo siRNA-HSP70 : lignée sous-exprimant transitoirement HSP70

**Remarque : tous les temps de réparation sont obtenus pour des cellules maintenues dans leur milieu de culture supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.**

**III.2.2- Obtention des mutants HSP70-1**

Ces mutants 1BR3Neo-HSP70 surexpriment HSP70-1 ou une version tronquée de HSP70-1 de façon permanente après avoir acquis le plasmide utilisé pour la réalisation de cette expérience.

**III.2.2.1- Clonage**

Le HSP70-1 normal est cloné dans le plasmide pCDNA6 V5 His (Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France). Le procédé se déroule de la façon suivante : un plasmide contenant HSP70-1 est utilisé. L'insert HSP70-1 est amplifié par PCR, en utilisant les sites de restriction des enzymes BamH1 et EcoR1, en trois étapes : dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, hybridation des amorces à 52°C pendant 45 secondes et extension des amorces à 68°C pendant 2 minutes et 30 secondes (voir détails de la PCR dans le chapitre II.2). Pour le mutant surexprimé HSP70-1 sauvage (séquence vérifiée par EMBL Heidelberg Sequencing Platform), l'insert obtenu à partir de pBud-HSP70-1 a été directement cloné dans le plasmide pCDNA-6 V5 His (Invitrogen, contenant les résistances à la blasticidine et à l'ampicilline) (enzymes de restriction utilisées : BamH1 et EcoR1). Pour le mutant surexprimé tronqué HSP70-1 Cla1, le plasmide pCDNA6 contenant l'insert HSP70-1 a été clivé par l'enzyme de restriction Cla1, purifié sur gel puis reliqué pendant 2h à 37°C à l'aide de la T4 DNA ligase (New England Biolabs). Les transformations ont été réalisées dans les bactéries compétentes *E. coli* Top10 (Invitrogen) et les plasmides ont été extraits après 12 heures de culture à 37°C (dans du milieu Luria Broth supplémenté avec 150µg/ml d'ampicilline) à l'aide du Qiagen Maxi-prep Kit.

**III.2.2.2- Transfection stabilisée**

Pour la transfection, différents plasmides sont insérés dans les fibroblastes humains contrôles 1BR3Neo avec la lipofectamine (Invitrogen) puis les fibroblastes sont mis en culture dans du milieu DMEM + 10% de sérum de veau foetal *sans antibiotique*.

Le premier jour, 60µg d'ADN (plasmide à transférer) est dilué avec 150µl de lipofectamine dans 2ml de milieu sans antibiotique et sans sérum. Puis le mélange est ajouté sur les cellules (boîte de 175 cm<sup>2</sup> avec le milieu et le sérum) qui sont remises en culture (à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>).

Le deuxième jour, le milieu est remplacé par du milieu supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal et 1% (v/v) de pénicilline + streptomycine et une concentration donnée en blasticidine (5µg/ml) pour la sélection et mise en culture (conditions normales) des cellules. Ensuite, la survie des cellules est observée par rapport au plasmide transféré et les cellules survivantes sont cultivées dans le même milieu (avec blasticidine à une concentration de

2,5µg/ml par la suite pour la culture). Au bout de quelques passages (2 ou 3), les mutants sont sélectionnés (ils ont acquis le plasmide et expriment d'une façon stabilisée l'insert porté par ce même plasmide) et sont alors prêts pour les expériences (cytométrie, immunofluorescence...).

### **III.2.3- siRNA : petits ARN d'interférence (spécifiques de HSP70), servant à inhiber l'expression de HSP70 endogène par blocage de la traduction**

Les siRNA ou small interfering RNA sont des petits morceaux d'ARN simple brin complémentaires de l'ARN messenger du gène d'intérêt (ici : HSP70). Ces siRNA vont, lorsqu'ils sont transfectés dans la cellule, venir se lier par complémentarité à l'ARN<sub>m</sub> de HSP70 et ainsi empêcher transitoirement la traduction de l'ARN<sub>m</sub> de HSP70 en protéine. Ceci a pour effet de supprimer, de façon quasiment totale, la synthèse et donc l'expression de HSP70. Des siRNA HSP70 (concentrés à 10µM) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) sont transfectés, selon le protocole préconisé par la notice d'emploi, sur une culture de fibroblastes témoins 1BR3Neo ou 1BR3. Des siRNA dirigés contre le gène codant pour c-Abl (Santa-Cruz-Biotechnologies-France (Tebu-Bio, Le Perray, France) servent de contrôles négatifs.

### **III.2.4- Marquage à l'Iodure de Propidium (IP) pour l'étude du cycle cellulaire au FACS (cytomètre de flux)**

Cette expérience permet d'analyser le contenu en ADN d'une population de cellules donnée dans des conditions données. Il est ainsi possible de déterminer le nombre de cellules situées dans chacune des phases du cycle cellulaire (sub-G<sub>1</sub> : débris cellulaires, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ou phase quiescente, S ou phase de synthèse de l'ADN, G<sub>2</sub> ou phase pré-mitotique et M ou phase de mitose). Cette expérience est réalisée grâce à l'utilisation d'un cytophotomètre de flux (FACStar<sup>Plus</sup>, BD biosciences, San Diego, CA) (INSERM U548-CEA Grenoble) : plusieurs milliers de cellules défilent devant un faisceau laser (à travers une buse micrométrique) dans un flux constant de tampon physiologique. Suivant la longueur d'onde, la lumière diffusée est recueillie dans 2 directions différentes (l'une peut être corrélée avec la taille et la seconde avec la réfringence de la cellule, ce qui donne une idée sur la granulosité des cellules). L'appareil peut analyser la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de la quantité d'ADN, marqué à l'iodure de propidium : un agent intercalant de l'ADN fluorescent.

#### Procédure de fixation des cellules

Après rinçage des cellules au PBS\* (1X) et trypsination des cellules, lorsque les cellules sont détachées et qu'elles ont été centrifugées, un nouveau rinçage avec 1,5ml de PBS (1X) est effectué puis vient une centrifugation à 2 000 tours/minute pendant 2minutes.

Après élimination du surnageant, 1ml de d'éthanol à 70% (25ml d'éthanol absolu + 10ml d'H<sub>2</sub>O) est ajouté goutte à goutte sur le culot cellulaire puis les cellules sont congelées à -20°C après avoir été homogénéisées soigneusement.

#### Préparation des échantillons avant passage au cytophotomètre en flux

Les cellules en suspension vont passer devant un laser qui va mesurer leur taille et leur granulosité ainsi que le marqueur ou les marqueurs d'intérêt (ici : iodure de propidium).

2ml de PBS (1X) sont ajoutés aux cellules. Puis les cellules sont centrifugées à 2 000 tours/minute pendant 2minutes. Après élimination du surnageant, une incubation avec 500µl

de la solution d'IP (la concentration finale d'iodure de propidium est de 0,1mg/ml dans du PBS 1X + 0,1mg/ml de RNase) est réalisée dans la glace pendant au moins 20 minutes.

Remarque: pour les cellules non adhérentes, le même protocole (hormis l'étape de trypsination) a été réalisé.

La suite de l'analyse est réalisée à l'aide de programmes informatiques permettant de traiter les données de cytométrie en flux (ex : le logiciel WinMDI 2.8 ou le logiciel CellQuest®). Le pic G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> est conventionnellement placé à 300 u (marquage à l'iodure de propidium).

### **III.2.5- Survie cellulaire**

#### **III.2.5.1- Survie cellulaire : Cellules adhérentes**

Les tests de clonogénicité *in vitro* standard ont été réalisés pour déterminer la radiosensibilité intrinsèque (Palumbo G *et al*, 2001, Biston MC *et al*, 2003, entre autres). Les cellules en phase de croissance en plateau ont étéensemencées immédiatement. La radiosensibilité intrinsèque a été quantifiée en calculant la fraction de survie à 2 Gy (SF2). En radiobiologie, la cellule est jugée *viable* ou survivante lorsqu'elle a donné naissance à un clone contenant au moins 50 cellules. En pratique, le nombre de colonies visibles est inférieur au nombre de cellulesensemencées. Les résultats obtenus sont corrigés en utilisant le *coefficient de clonage (Plating Efficiency ou PE)* qui correspond aux cellules ayant effectivement adhéré à la boîte de culture. Le coefficient de clonage varie avec la lignée cellulaire étudiée. Plusieurs boîtes servant de témoins sont donc utilisées pour chaque expérience. La survie de chaque boîte est calculée de la façon suivante :

$$\text{Survie(dose)} = \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{PE} \times \text{Nombre de cellules}}$$

Le comptage des colonies survivantes se réalise de la façon suivante : après stress, les cellules sont comptées, à l'aide d'un hémocytomètre de Malassez sous microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar Germany), puisensemencées dans des boîtes de Pétri (milieu DMEM + 10% SVF) et mises à incuber à 37°C, 5%de CO<sub>2</sub>. Après 15 jours, les cellules sont rincées au PBS et puis sont fixées et colorées pendant 1min avec 2ml d'une solution de cristal violet (75% alcool à 95°, 25% cristal violet (Prolabo, Corée)) puis rincées à nouveau à l'eau. Le cristal violet (anciennement gentian violet) est utilisé couramment dans ce type d'expérience parce qu'il est un colorant spécifique des protéines. Les colonies ainsi visualisées, leur comptage peut être réalisé directement sur la boîte de Pétri (voir figure 55). Le modèle linéaire-quadratique (le plus couramment utilisé pour ajuster les données de survie) a été décrit par Tubiana M en 1986. Il définit la survie de la façon suivante :

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Le paramètre  $\alpha$  détermine la pente de la courbe de survie aux faibles doses (pente initiale), c'est à dire l'amplitude de l'épaule. Le paramètre  $\beta$  détermine l'augmentation de la pente de la courbe aux fortes doses (Balosso J et Foray N, Cancérologie Fondamentale, Collection John Libbey, 2005).

### **III.2.5.2- Survie cellulaire : Cellules en suspension**

De même, la radiosensibilité intrinsèque des cellules en suspension peut être déterminée. Le procédé est sensiblement différent. La radiosensibilité intrinsèque est aussi calculée après une irradiation de 2 Gy. Des dilutions en cascade sont réalisées sur cellules non irradiées et sur cellules irradiées (mêmes dilutions) en parallèle.

Les cellules ont été comptées à l'aide d'un hémocytomètre de Malassez. La première dilution est choisie en fonction des lignées et une même concentration de départ est adoptée pour toute une série d'expériences (quelque soit la lignée et quelque soit le stress). Il est en effet nécessaire d'adopter une même concentration de base pour pouvoir ensuite être reproductible et comparer une même lignée (sans et avec stress) et les différentes lignées entre elles. Pour les lymphocytes mutants HSP22, j'ai choisi de commencer avec 4 000 cellules par millilitres. Les cellules sont mises en culture dans du milieu RPMI supplémenté avec 10% SVF. La figure 56 schématise l'expérience. Les différences de survie sont mesurées après 10 jours. La survie à 2 Gy est donnée pour :

$$S(2Gy) = (\text{dilution limite à 2 Gy}) / (\text{dilution limite à 0 Gy}).$$

**Si  $S(2Gy) \geq 50\%$ , la lignée étudiée est radiorésistante.**

**Si  $S(2Gy) \leq 25\%$ , la lignée est considérée comme étant radiosensible.**

### **III.2.6- Protocole pour les extraits nucléaires (Britten)**

Cette méthode permet de séparer les différents constituants protéiques de la cellule en deux parties : les protéines provenant du cytoplasme et celles provenant du noyau. Les extraits se font sur des cellules qui ont été soumises à un stress donné (par exemple : irradiation de 15Gy) et dont le temps de réparation (à 37°C) a été comptabilisé soigneusement.

Pour une condition donnée (c'est-à-dire pour un stress donné, un temps de réparation donné et un type cellulaire donné), une boîte de culture de 75cm<sup>2</sup> minimum a été utilisée (cellules à confluence).

#### Récolte des cellules

Après rinçage des cellules au PSB (1X), les cellules par grattage (rubber) sont récupérées dans un minimum de 5 ml de milieu. Puis, les cellules sont centrifugées à 1500 tr/min pendant 5 minutes à 4°C. Enfin, le culot est lavé au PBS et re-centrifugé à 1500 tr/min pendant 5 minutes à 4°C. *A partir de ce stade, tout est maintenu à 4°C.*

Remarque : l'utilisation de la trypsine est fortement déconseillée puisque le risque de digestion des membranes est non négligeable et donc, dans ce cas, cela devient impossible de réaliser des extraits cytoplasmiques.

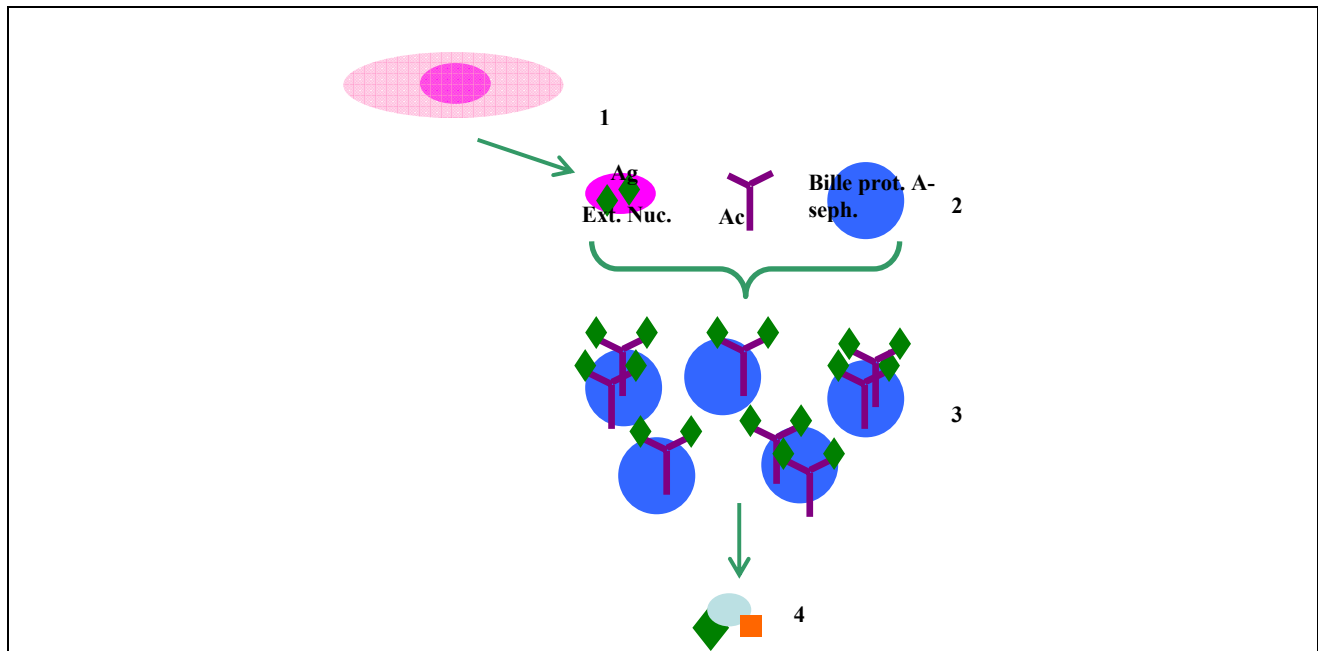
#### Premier choc (hypotonique)

Le PBS est enlevé consciencieusement. Les cellules sont alors re-suspendues dans 2-3 ml de tampon HYPO\*. Les cellules sont incubées pendant 15 min dans la glace en agitant de temps en temps, puis elles sont centrifugées à 4000 tr/min pendant 5 minutes à 4°C.

#### Second choc (hypertonique)

Le surnageant est enlevé en prenant soin de ne pas toucher au culot (*le surnageant constitue l'extrait cytoplasmique*). Ensuite, le culot est mis en suspension dans 100-500µl de tampon HYPER\* (selon les cellules, la grosseur du culot et/ou la concentration voulue) et le culot est

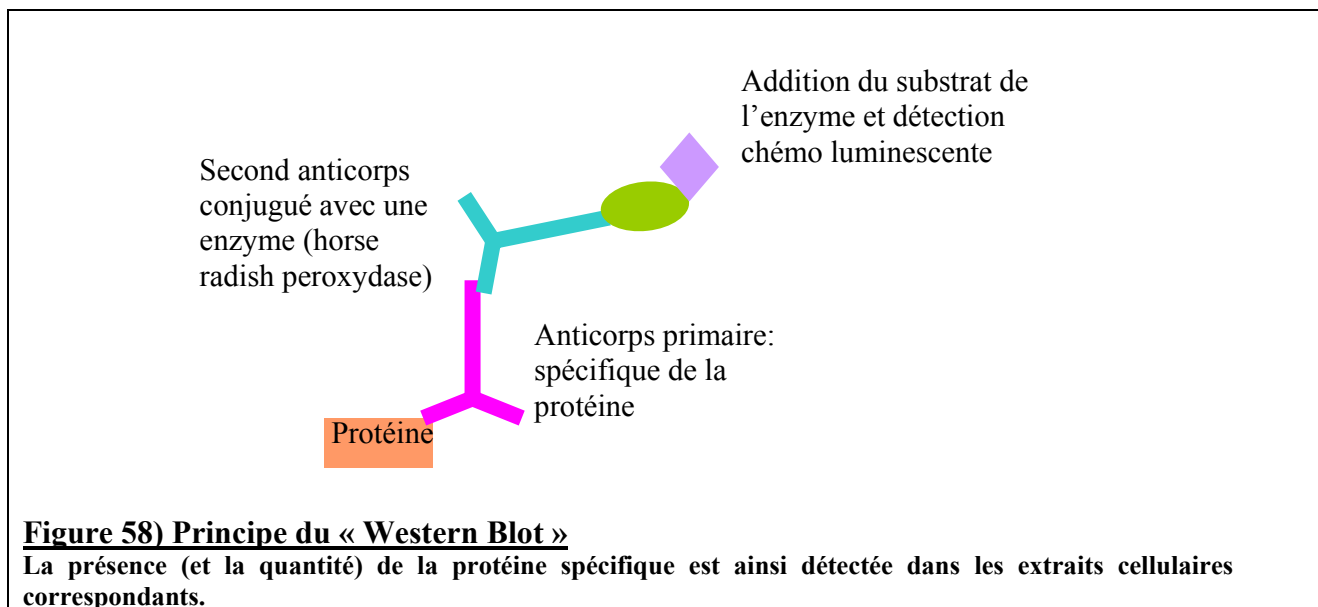




**Figure 57) Principe de l'immunoprécipitation**

Schéma représentant les différentes étapes de l'immunoprécipitation :

- 1- Préparation des extraits nucléaires. Ces extraits vont contenir la protéine d'intérêt (notée « Ag » pour antigène)
- 2- Ajout des billes de protéine A-Sepharose et des anticorps monoclonaux spécifiques (notés « Ac »).
- 3- Ac+Ag vont précipiter sur les billes
- 4- Récupération de la protéine d'intérêt Ag et des ses partenaires protéiques. Ces protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE.



**Figure 58) Principe du « Western Blot »**

La présence (et la quantité) de la protéine spécifique est ainsi détectée dans les extraits cellulaires correspondants.

mélangé à le tampon HYPER. Ensuite, le mélange est incubé pendant 20 min sur la glace en agitant manuellement (régulièrement) puis centrifugé à 12000 tr/min (toujours à 4°C) et enfin, le surnageant est aliquoté et puis congelé. *Le surnageant final constitue l'extrait nucléaire.* Les protéines contenues dans ces extraits cellulaires sont dosées à l'aide de la méthode de Bradford\*.

### **III.2.7- Immunoprécipitations**

Les immunoprécipitations ont été réalisées par incubation de 300 µg d'extraits nucléaires, 1,5 à 1 µg de l'anticorps monoclonal spécifique et des billes de protéine A-Sepharose (Pharmacia, Buckinghamshire, U.K.) dans du tampon NET-N\*, pendant 4 heures à 4°C (Foray N *et al*, 2002 ; figure 57). Les billes de protéines A-Sepharose précipitent le complexe anticorps/antigène (Wampler JL *et al*, 2004). Après centrifugation ( $\leq 1$  min, 10 000rpm) suivie de plusieurs lavages dans le tampon NET-N, les immunoprécipitations sont collectées, ébouillantées et stockées dans le tampon de bleu de charge. Les immunoprécipitations sont ensuite séparées par SDS-PAGE (voir chapitre III.2.8). Du sérum de lapin pré-immun (DAKO, Glostrup, Denmark) et des immunoglobulines G (IgG) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) servent de contrôles.

### **III.2.8- Western Blots**

Cette méthode permet la révélation *spécifique* de la protéine d'intérêt (utilisation d'anticorps dirigé contre la protéine). Cette méthode montre l'évolution des taux cellulaires de la protéine d'intérêt (provenant d'extraits totaux ou d'extraits cytoplasmiques ou d'extraits nucléaires) au cours du temps de réparation après un stress donné (figure 58).

#### SDS-PAGE - Gels d'acrylamide\*

Le principe de cette méthode est basé sur l'utilisation du SDS. Le SDS (sodium dodécyl sulfate) est un détergeant qui ajoute des charges négatives aux protéines et rompt les liaisons hydrophobes. Les protéines sont donc toutes chargées négativement et sous forme monomérique. Elles migrent alors toutes dans la même direction (vers la borne positive) et la séparation se fait uniquement en fonction du poids moléculaire des protéines. Pour être certain d'avoir les protéines sous leur forme monomérique, encore un réducteur de ponts disulfures, le  $\beta$ -mercaptoéthanol, est ajouté dans le tampon de bleu de migration.

Remarque : le pourcentage d'acrylamide va définir la taille du treillis qui va retenir les protéines. Suivant la protéine à analyser, le pourcentage d'acrylamide utilisé varie. Le pourcentage d'acrylamide requis est inversement proportionnel au poids moléculaire de la protéine. Le gel de séparation est réalisé en premier lieu puis le gel de concentration est coulé au dessus du gel de séparation. La préparation des échantillons protéiques est réalisée de la façon suivante : 10-20µl de protéines (suivant la concentration et la taille des puits utilisés, voir ci après : dosage par la méthode de Bradford) sont mélangés au tampon de bleu de charge pour la migration des protéines\*. Après une incubation au bain-marie (95°C) pendant 5 minutes, les échantillons protéiques sont chargés sur le gel (ainsi que des marqueurs de poids moléculaire). Le gel est mis à migrer à 110Volts dans la cuve contenant du tampon de migration jusqu'à ce que le front bleu atteigne le bas du gel.

**Remarque :** les protéines sont tout d'abord concentrées dans le gel de concentration puis elles sont séparées en fonction de leur poids moléculaire dans le gel de séparation.

Transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, utilisation du Semi-Dry transfer system (BioRad, Hercules, CA, USA)

Après arrêt de l'appareil, le gel est alors enlevé de la cuve et débarrassé du dispositif en verre. Le transfert des protéines est réalisé depuis le gel d'acrylamide jusque sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher and Schuell BA83). Le gel est mis en contact avec la membrane de nitrocellulose et le tout est entouré de papier épais spécial BIORAD (blotting extra thick paper) préalablement trempé dans le *tampon de transfert\**. Les différentes couches sont disposées de telle sorte à ce qu'elles soient organisées en une sorte de sandwich. Sont placés dans l'ordre: le papier de migration sur la platine de l'appareil de transfert, puis le gel, puis la membrane de nitrocellulose puis le deuxième papier de migration. Le système est déclenché (25V). Plus la protéine est grosse et plus le temps de migration est long (par exemple : 1h30 pour HSP70 et 1heure pour HSP22).

Hybridation des membranes de nitrocellulose avec l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt

La membrane de nitrocellulose est récupérée et bloquée avec des protéines de lait. Pour ce faire, la membrane est incubée dans PBS (Phosphate Buffered Saline) + 5% lait + Tween 20 à 0,5/1000 (détergent qui empêche les fixations non spécifiques) pendant 2 h (agitation à température ambiante). Ensuite la membrane est incubée avec l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt (PBS+ 5% lait + Tween 20 à 0,5 /1000 + l'anticorps primaire à une dilution de 1/1000<sup>ème</sup>) sous agitation à 4°C pendant la nuit. Après rinçage de la membrane dans du PBS+ Tween 20 à 0,5/1000, une nouvelle incubation de la membrane est pratiquée avec l'anticorps secondaire (espèce spécifique, conjugué à la peroxydase) (PBS+ 5% lait + Tween 20 à 0,5/1000 + l'anticorps secondaire à une dilution de 1/1500<sup>ème</sup> (kit ECL RPN 2108 Amersham Pharmacia)) pendant 1h. Enfin la membrane est rincée avec du PBS+ Tween 20 à 0,5 /1000.

Révélation des membranes à l'aide du kit ECL (Amersham Pharmacia)

Les solutions vont servir à la détection par chémoluminescence de la protéine d'intérêt. Le mélange des deux solutions du kit est versé sur la membrane de nitrocellulose (1ml + 1ml) qui est mise à incuber à température ambiante pendant 2 minutes. Le marquage apparaît uniquement au niveau des protéines détectées par l'anticorps utilisé. Sous lumière rouge, un film kodak est disposé sur la membrane et le tout est placé à 4°C pendant une nuit (boîte noire). Le film est alors révélé (à l'aide de solutions pour développer les photos ; Kodak).

**Remarque :** les gels de Western Blots et d'immunoprécipitation présentés dans la partie résultat sont au minimum dupliqués. 100 µg d'extraits cellulaires (totaux, nucléaires ou cytoplasmiques) sont déposés par puits.

### III.2.9- Immunofluorescence

Cette technique est utilisée depuis les années 1960 pour visualiser la localisation de la protéine d'intérêt (par exemple HSP70) après stress et temps de réparation donné, dans une lignée cellulaire donnée, et ce, directement sur la cellule (ex : Foray N *et al*, 2003 ; figure 59 A).

#### Préparation des cellules

Deux jours avant la réalisation du stress (rayons X, UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou cis-platine), les cellules sont ensemencées sur des lamelles stériles dans des boîtes de Pétri, à raison de 2 lamelles par boîte, soit environ 200 000 cellules par boîte. Les cellules adhèrent sur les lamelles de verre (2cm<sup>2</sup>). Les temps d'incubation des cellules sont réalisés à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Fixation des cellules

Les cellules sont fixées par l'ajout de 50µl de *tampon de fixation\** par lamelle. L'incubation des lamelles avec la solution de fixation se prolonge pendant 10-20 minutes à température ambiante. Les cellules sont rincées à trois reprises avec du PBS (1X).

#### Perméabilisation des cellules

Les cellules sont perméabilisées avec *la solution de lyse\** (500µl par lamelle) : pendant moins de 5 minutes à 4°C. Le temps d'incubation doit être impérativement respecté puisque si ce temps est dépassé, les cellules risquent d'être trop lysées et donc détruites. Les cellules sont rincées à trois reprises avec du PBS (1X).

#### Hybridation des cellules avec les anticorps

50µl par lamelle d'anticorps primaire (ex : anti-HSP70 humain, anti-IgG polyclonal lapin de la firme Upstate (Euromedex, Mundolsheim, France) sont ajoutés par lamelle et l'incubation avec l'anticorps primaire s'effectue pendant 40 minutes à 37°C (dilution au 1/100ème dans du PBS supplémenté avec 2% de BSA (sérum albumine bovine ; Sigma-Aldrich)). Les cellules sont rincées à trois reprises avec du PBS (1X). L'incubation suivante se fait avec 50µl par lamelle d'anticorps secondaire couplé à une molécule de détection (anti-lapin polyclonal couplé au TRITC ou anti-souris monoclonal couplé au FITC ou anti-chèvre polyclonal couplé au TRITC) (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes à 37°C (dilution au 1/100ème dans du PBS supplémenté avec 2% de BSA). Le choix de l'anticorps secondaire correspond à l'animal dans lequel a été élaboré l'anticorps primaire. Les cellules sont rincées à trois reprises avec du PBS (1X).

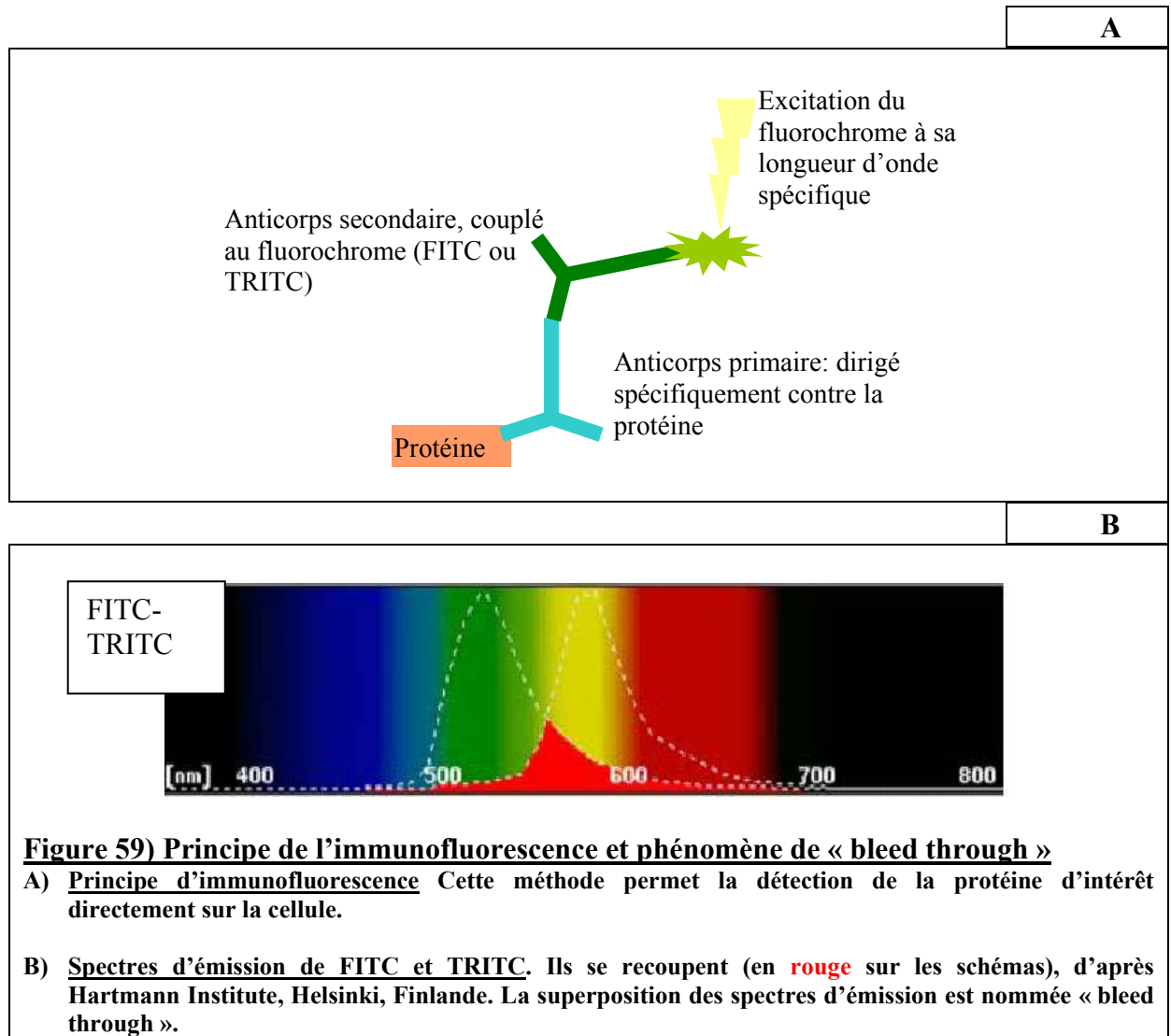
Remarque : il existe plusieurs fluorochromes (molécules de détection) qui peuvent être couplées aux anticorps ou qui peuvent servir à détecter l'ADN (tableau 10).

#### Montage et marquage des noyaux, à l'abri de la lumière

Les noyaux sont marqués au 4,6-Diamidino-2-phenylindole (Dapi) (contenu dans le liquide de montage : Vectashield (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)). La lamelle est montée sur une lame de verre puis la préparation est scellée. La préparation peut être conservée quelques jours à 4°C, à l'abri de la lumière.

#### Observation sous microscope à fluorescence

Les noyaux marqués au Dapi et des protéines d'intérêt spécifiquement marquées par la méthode décrite précédemment sont observés avec un microscope optique à fluorescence (Olympus-France, Paris). Toutes les images de cette thèse représentant des cellules marquées furent réalisées à l'aide de ce microscope. Ce microscope possède la particularité de produire un spectre fluorescent qui excite spécifiquement un fluorochrome (fusionné à l'anticorps secondaire ou le Dapi). Le fluorochrome, ainsi excité, émet un spectre caractéristique, permettant l'analyse de la préparation cellulaire (figure 59 B et tableau 10).



Sondes	Excitation (nm)	Emission (nm)	Notes
<b>Phycoérythrine (PE)</b>	480;565	578	
<b>Fluorescéine</b>	495	519	FITC; sensible au pH
<b>TRITC</b>	547	572	TRITC (tétra méthyl rhodamine iso thio cyanate)
<b>X-Rhodamine</b>	570	576	XRITC
<b>Texas Red</b>	589	615	Sulfonyl chloride
<b>Sondes pour acides nucléiques</b>			
<b>Hoechst 33342</b>	343	483	AT-sélectif
<b>Dapi</b>	345	455	AT- sélectif

**Tableau 10) Quelques fluorochromes.** Dans ce tableau sont indiqués quelques fluorochromes fréquemment utilisés et les sondes pour acides nucléiques les plus fréquemment employées, notamment pour les expériences d'immunofluorescence.

Remarque : induction et rythme de réparation des cassures double brin

Le taux de cassures double brin de l'ADN générées a été évalué par une technique d'immunofluorescence. Il a été montré par Rothkamm K et coauteurs, en 2003 qu'une des premières étapes de la réponse moléculaire aux DSBs est la phosphorylation de l'histone H2Ax. De plus, une corrélation entre le nombre de *foci*  $\gamma$ H2AX (foyer lumineux rond et distinct) et le nombre de cassures d'ADN double brin induites par l'irradiation a été établie (Foster E *et al*, 2005).

Le même protocole est suivi ici, sauf que pour l'anticorps  $\gamma$ H2Ax, la dilution utilisée est moins importante lors de l'étape de marquage des cellules puis qu'il s'agit d'une dilution au 1/800ème dans du PBS supplémenté avec 2% de BSA (sérum albumine bovine ; Sigma-Aldrich)). Ainsi, comme les histones sont très importantes en quantité au niveau de l'ADN, ce n'est pas nécessaire d'utiliser une forte concentration d'anticorps.

Anticorps utilisés

Les anticorps primaires anti-HSP70, anti- $\gamma$ -c-jun, anti- $\gamma$ H2AX, et anti- $\gamma$ CHK1 proviennent de chez Upstate Cell Signaling Solutions Inc-France, Paris. L'anticorps anti-BRCA1 provient de chez Santa-Cruz-Biotechnologies-France (Tebu-Bio, Le Perray, France). L'anticorps anti-SQ/TQ provient de chez Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA). Les anticorps secondaires anti-IgG de souris TRITC et anti-IgG de lapin FITC proviennent de chez Sigma-Aldrich. L'anticorps dirigé contre HSP70-1 phosphorylée en Ser<sup>254</sup> a été produit par la firme CovaLab (Lyon, France). Le polypeptide NH<sub>2</sub>-KHKKDISQNKRA-COOH a été synthétisé et purifié puis injecté à des lapins intradermiquement aux jours 0, 21 et 43. Les sérums pré-immuns et post-injections ont été testés. Les fractions d'IgG (immunoglobulines G) totales ont été purifiées en utilisant des billes de protéines A-Sépharose. Les anticorps dirigés contre la protéine humaine HSP22 (monoclonal souris et polyclonal chèvre) proviennent de chez Abcam-France, Paris.

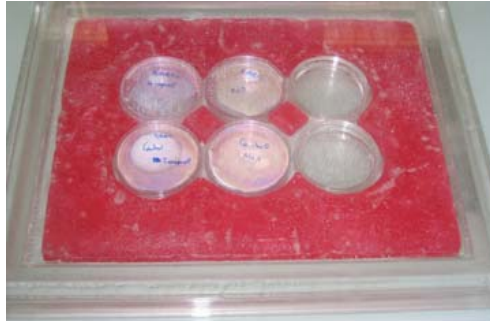
**III.1.10- Immunofluorescence sur cellules en suspension (lymphocytes ou lymphoblastes) à l'aide du Cytospin**

Cette méthode permet de réaliser une expérience d'immunofluorescence classique sur des cellules non adhérentes.

Remarque : il faut environ 10 000 cellules par spot pour obtenir une densité adéquate.

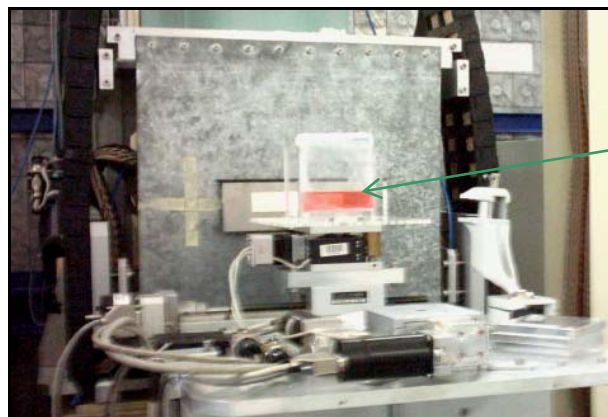
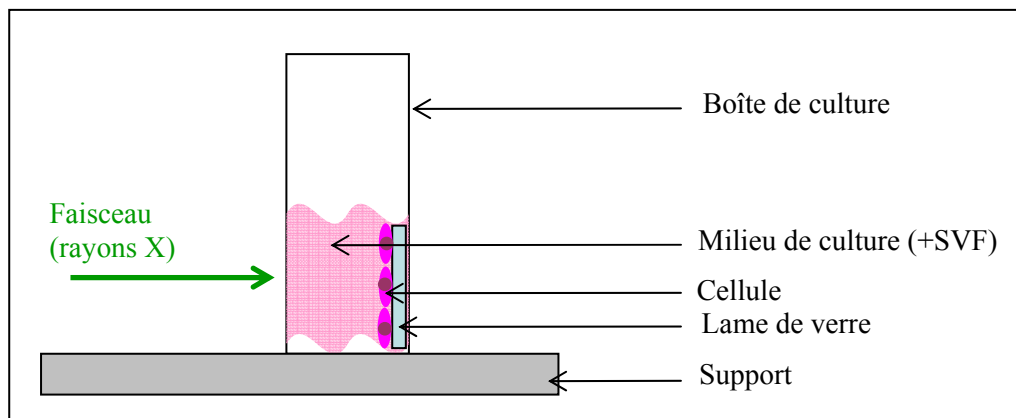
Après traitement les cellules en suspension sont centrifugées à 1000 tr/min pendant 5 minutes. Le surnageant est vidé totalement (utilisation d'une micropipette). Le culot cellulaire est resuspendu avec 200 $\mu$ l de solution de fixation d'immunofluorescence. Les cellules sont placées dans le dispositif (cuve+lame) dans l'appareil Shandon Cytospin (Thermo Electron Corporation, MA, Etats-Unis), puis centrifugées à 800 tr/min pendant 2 minutes. A partir de ce stade, le protocole d'immunofluorescence reste inchangé.

**Remarque :** les résultats présentés dans la partie résultat concernant l'immunofluorescence correspondent à une mesure effectuée sur N=50 cellules représentatives par expérience, avec N=2 ou N=3 expériences distinctes par marqueur (c'est-à-dire par anticorps primaire) utilisé.



**Figure 60) dispositif en plexiglas utilisé pour l'irradiation des cellules avec la source de rayons X conventionnelle**

Les cellules sont placées dans des boîtes de Pétri stériles en vue de l'irradiation. Le faisceau X provient de dessus. La dose est calculée pour l'utilisation du dispositif en plexiglas en photographie ci-dessus (1, 234 Gy/min).



**B**  
Cellules placées dans le faisceau pour l'irradiation

**Figure 61) Irradiation des cellules: procédure utilisée sur ID17**

**A) Schéma.** Dispositif d'immunofluorescence sur ID17 pour des cellules adhérentes. Le faisceau traverse la paroi de la boîte de culture (plexiglas) et le milieu de culture complet, et, atteint alors les cellules (adhérentes sur une lame de verre de 2 cm<sup>2</sup>).

**Remarque :** ce même dispositif est utilisé pour les tests réalisés en mode DEI et en mode SSRT.

**B) Photographie.** Les cellules sont placées dans le faisceau de rayons X toujours dans du milieu de culture complétement avec 10% de sérum pour éviter des effets artéfactuels dus à la déshydratation et à la faim des cellules, mais aussi pour éviter leur décollement (en cas de cellules adhérentes sur lamelles de verre).

### **III.2.11- Irradiation (X ou UV)**

#### **III.2.11.1- Irradiation X (source conventionnelle)**

Un générateur X clinique dévolu à la recherche a été utilisé pour réaliser les irradiations. Une anode de tungstène produit le faisceau de rayons X (le voltage est fixé à 200 kV et l'intensité à 20 mA grâce à l'utilisation d'un filtre en cuivre d'une épaisseur de 0,1mm). Le débit de dose est de  $1,234 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ , approximativement (figure 60).

#### **III.2.11.2- Irradiation UV**

Les irradiations UV ont été réalisées à l'aide d'une chambre délivrant 254 nm UV(C) à  $7 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Fisher-Bioblock Scientific, Illkirch - France) sur des cellules (+ milieu complet) contenues dans une boîte de Pétri dont le couvercle avait précédemment été retiré pour permettre le passage des rayons UV jusqu'aux cellules.

#### **III.2.11.3- Irradiation X avec le synchrotron (ligne de lumière biomédicale ID17)**

Le dispositif utilisé pour les irradiations des cellules, en vue d'expériences d'immunofluorescence, reste identique pour les deux types d'expériences réalisées et il est décrit dans la figure 61.

Les doses sont mesurées précisément à l'aide d'une chambre d'ionisation spécialement adaptée à la dose délivrée lors des expériences.

##### **III.2.11.3.1- SSRT / "synchrotron PAT-Plat"**

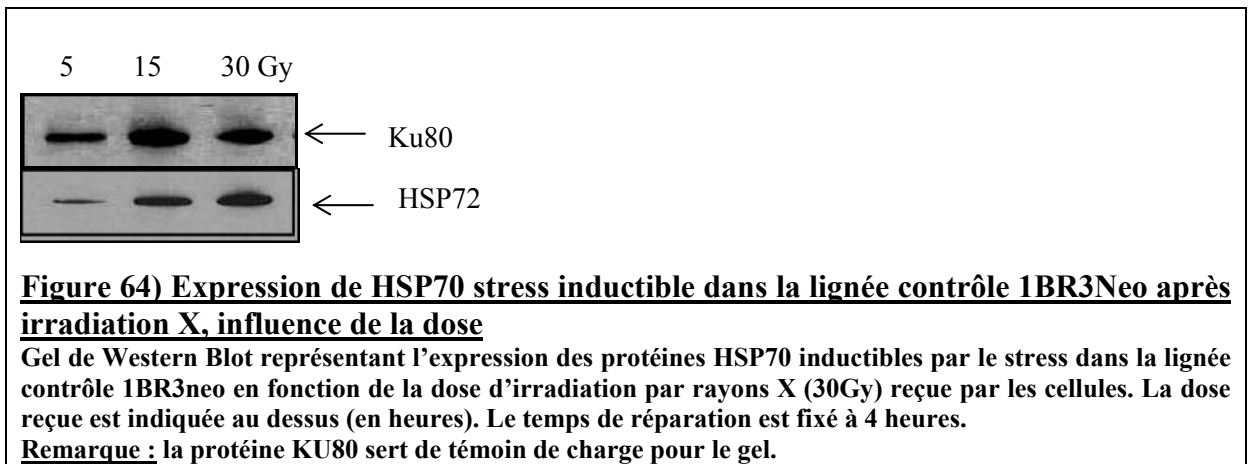
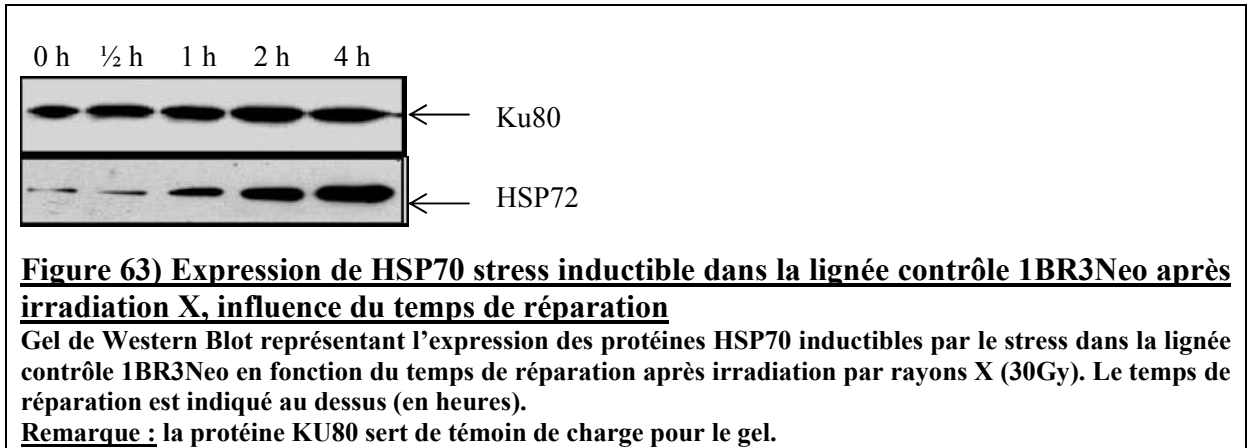
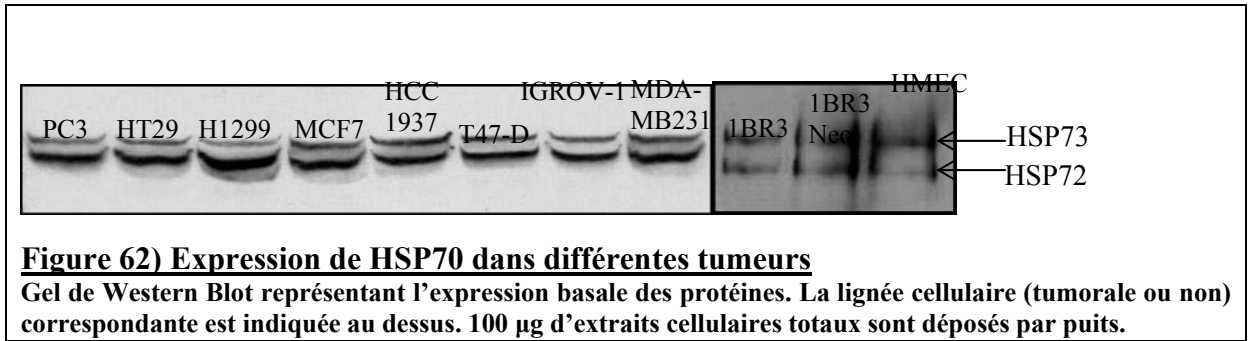
Les cellules de rat F98 adhérentes sur des lamelles de verre sont incubées en présence de platine (concentration finale de cis-platine en solution de  $10\mu\text{M}$ ) pendant 24 heures (avec ou sans wortmannine,  $25 \mu\text{M}$ ) avant l'irradiation.

L'énergie d'irradiation utilisée correspond à la couche d'énergie K de l'élément Platine, c'est-à-dire 78,34 keV. Or, d'après les résultats obtenus précédemment (Biston MC *et al*, 2004), il fut remarqué que l'irradiation au dessus du seuil K, soit à 78,8 keV, donnait de meilleurs résultats que l'irradiation au dessous de ce seuil, soit à 78,0 keV. C'est pourquoi l'énergie de 78,8 keV est retenue pour ces expériences. Pour les mêmes raisons et compte tenu de la nature de l'expérience qui a suivi (immunofluorescence), la dose utilisée reste fixée à 15 Gy.

##### **III.2.11.3.2- DEI**

L'énergie requise pour ce type d'expérience d'imagerie permettant l'obtention d'une information histologique sur le tissu/patient analysé se situe aux alentours de 51,5 keV. La dose délivrée correspond à la dose nécessaire à l'élaboration des trois scans constituant une image, soit environ 9 mGy. Les cellules humaines non transformées (fibroblastes 1BR3 ou chondrocytes) adhèrent sur des lamelles de verre et sont irradiées dans leur milieu de culture sans additif, comme indiqué dans la figure 61. L'expérience d'immunofluorescence suit l'irradiation (avec ou sans incubation à  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , suivant le cas et le temps de réparation souhaité).





### **III.3- Résultats: Les HSP, implication dans les voies de la réparation de l'ADN**

Ce chapitre décrit les études réalisées sur HSP70 (III.3.1) et HSP22 (III.3.2), visant à déterminer leur implication dans les mécanismes de la réparation de l'ADN. Les études impliquant HSP70, appliquées aux recherches à visée médicale mises au point sur la ligne biomédicale de l'ESRF, sont développées ici (III.3.3 et III.3.4).

#### **III.3.1- Implication de HSP70 dans les voies de réparation de l'ADN**

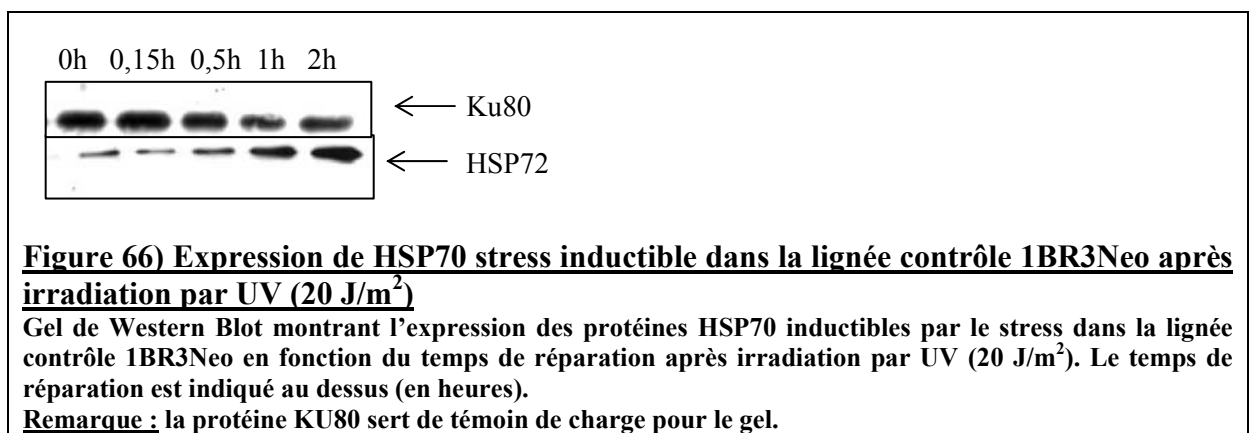
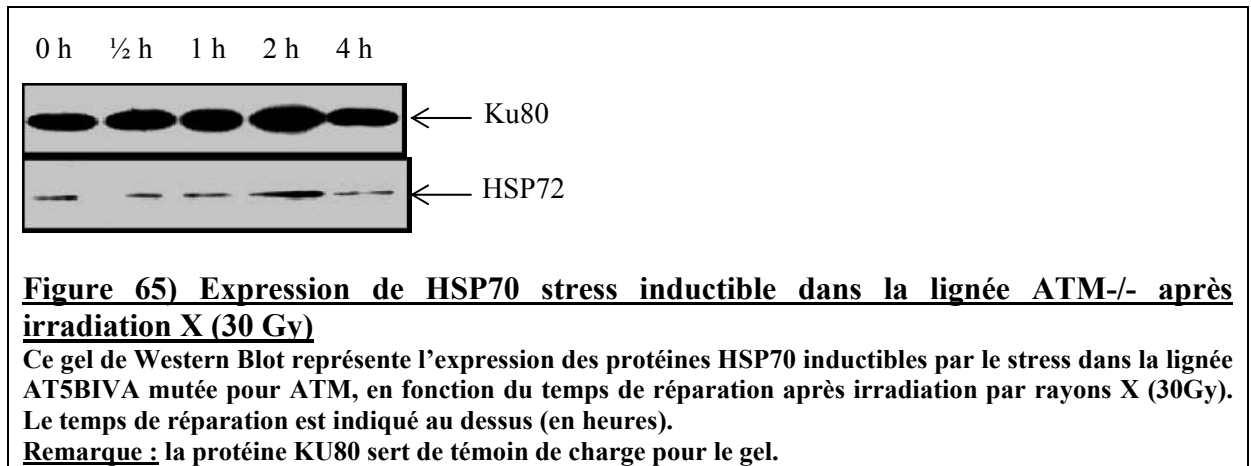
##### **III.3.1.1- La navette nucléaire de HSP70 après stress**

###### **III.3.1.1.1- Expression de HSP70 après stress**

La protéine stress inductible HSP70-1 (aussi nommée HSPA1A, poids moléculaire : 70 052 g/mol) serait surexprimée dans les cellules après hyperthermie (Lindquist S et Craig E, 1988) mais aussi après d'autres stress (voir chapitre II.1). L'anticorps polyclonal utilisé (Upstate, Cell Signaling Solutions Inc) est dirigé contre deux protéines humaines : HSP72 (aussi nommée HSPA2, qui serait aussi stress inductible, poids moléculaire : 70 021 g/mol, nommée « inducible HSP70 »), Faure O *et al*, 2004 ; Febbraio MA *et al*, 2004) et HSP73 (HSC70, poids moléculaire : 70 898 g/mol) et reconnaît aussi l'homologue HSP70 chez le rat. Il existe 86,2% d'identité entre les deux protéines HSP72 et HSP73 (*résultats : Expasy Biotoools : Sim*). L'anticorps est obtenu par inoculation de lapins avec la protéine DnaK (l'homologue de HSP70 chez E.coli). Au début des expériences et jusqu'à fin février 2006, cet anticorps était censé être dirigé contre les protéines humaines HSP70 (c'est-à-dire HSP70-1 ou HSPA1A) et HSP73. L'annexe I-c représente la recherche de similarité effectuée sur toutes les protéines qui seraient potentiellement reconnues par l'anticorps utilisé. Toutes les séquences d'acides aminés des protéines correspondantes sont très proches car elles possèdent au moins 80% d'identité. Il faut noter que selon la littérature, HSP73 est exprimée constitutivement (Moehler M *et al*, 2003 ; Auger I et Roudier J, 2005). Les résultats obtenus avec cet anticorps semblent en effet en accord avec cette hypothèse puisque les poids moléculaires correspondent. De plus, la protéine de poids inférieur présente bien une augmentation après stress, comme les résultats suivants le montrent. Le même anticorps est néanmoins maintenant décrit comme étant dirigé contre HSP72 et HSP73.

Par la suite, à l'aide d'un mutant surexprimant HSP70-1, il a pu être vérifié que l'anticorps utilisé reconnaissait également HSP70-1. De plus, HSP70-1 semble aussi surexprimée après stress.

La bande correspondant à 70 kDa, et reconnue par l'anticorps dirigé contre HSP70, est susceptible de contenir plusieurs HSP70 en mélange puisque HSP70-1, HSP70-2 (qui est l'isoforme de HSP70-1 à une base près) et HSP72 possèdent toutes une masse moléculaire proche de 70 kDa. La protéine HSP73, quant à elle, a une taille légèrement supérieure ( $\approx 71$  kDa), suffisante pour apparaître séparée des autres sur le gel avec le pourcentage d'agarose utilisé (10%). La figure 62 montre l'expression basale (c'est-à-dire sans stress) de ces protéines HSP70 (soit HSP72 et HSP73) dans différentes lignées cellulaires. L'expression des HSP70 testées semble constante dans toutes les tumeurs considérées (figure 62). Ces lignées tumorales ont été décrites précédemment (Chavaudra N *et al*, 2004). Les lignées tumorales PC3 proviennent d'un adénocarcinome de prostate, les HT29 d'un carcinome colorectal, les H1299 d'un carcinome pulmonaire, les MCF7 d'un carcinome mammaire (non invasif), les HCC 1937 d'un carcinome ductal, les T47-D d'un adénocarcinome mammaire, les IGROV-1



d'un carcinome ovarien et les MDA-MB231 d'un carcinome mammaire (invasif). Ces tumeurs semblent en état de stress constant puisqu'elles expriment toutes la stress inductible HSP70 (HSP72) à un niveau basal relativement élevé. Au contraire, les lignées cellulaires témoins (1BR3 (fibroblastes de peau non transformés), 1BR3Neo qui sont les mêmes fibroblastes mais transformés) et HMEC (cellules épithéliales immortalisées)) ne l'expriment pas au même niveau.

L'expression des HSP70 inductibles par le stress est étudiée après radiations ionisantes dans différentes lignées cellulaires humaines : AT5BIVA mutée (ATM-/-) et 1BR3Neo, une lignée témoin (figures 63 à 66). L'effet des rayons X sur l'expression de la protéine HSP70 fut étudié en premier. Après irradiation par rayonnement X, il est observé une augmentation significative de l'expression de la protéine HSP70 inductible, par rapport au témoin de charge, la protéine Ku80, dans la lignée contrôle 1BR3Neo (figure 63). Une corrélation directe notable existe entre le temps de réparation et les taux nucléaires de HSP70 stress inductible. Lorsque la dose de rayons X reçue varie (figure 64), l'expression de la protéine HSP70 inductible dans la lignée contrôle 1BR3Neo, apparaît variable, elle aussi. La quantité nucléaire de la protéine HSP70 inductible augmente parallèlement avec la dose reçue. Il existe une relation dose-effet entre la dose reçue (en Gy) par les cellules contrôles et l'expression de HSP70. Ceci reste observable sur la figure, même si le témoin de charge ne reste pas tout à fait constant. L'expression nucléaire de l'inductible HSP70 après rayons X (figure 65) est étudiée dans une autre lignée cellulaire mutée sur la protéine de réparation ATM.

La protéine Ku80 sert ici de témoin de charge (82,6kDa). Les taux de HSP70 inductible par le stress restent très faibles. Ce gel ne présente pas d'augmentation pour HSP70. Ceci sous entend que la présence ou la fonction de la protéine ATM est requise pour l'expression de HSP70 après rayons X.

L'impact du rayonnement UV sur l'expression de HSP70 a ensuite été étudié. Les résultats correspondants pour la lignée cellulaire témoin 1BR3Neo sont présentés figure 66. En comparant avec le témoin de charge, après UV, une augmentation sensible des taux nucléaires de HSP70 est observée (lignée contrôle), en fonction du temps de réparation.

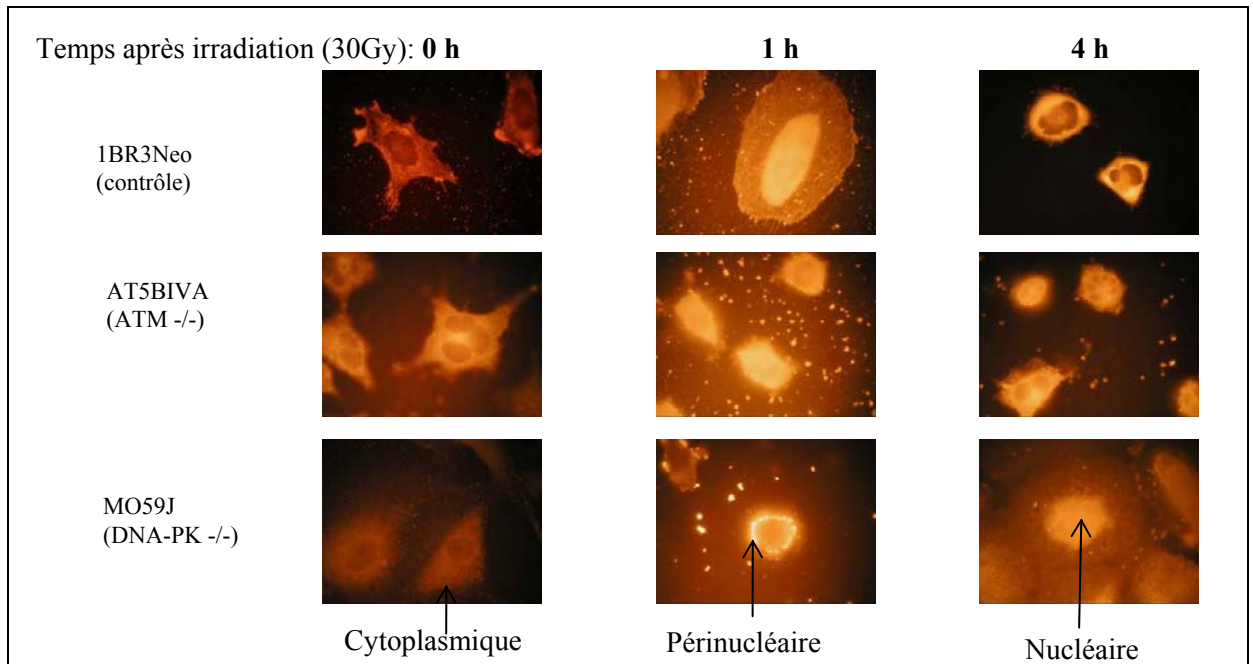
Remarque : les temps de réparation étudiés varient avec le mode d'irradiation utilisé (X ou UV). Ceux-ci sont définis en fonction de la vitesse de réparation (Goodhead DT, 1989).

L'expression de HSP70 apparaît comme étant dose dépendante et étant induite par tous les stress testés : cis-platine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV, rayons X, champs magnétiques. Pour la suite des expériences, HSP73 : l'autre HSP70 reconnue par l'anticorps, a été écartée de l'étude. Etant donné son poids moléculaire d'environ 71 kDa (70 898 g/mol exactement), il a été facile de l'exclure des résultats montrés ci-après. Seul le poids moléculaire de 70 kDa (correspondant très probablement à un mélange de au moins HSP72 et HSP70-1/2) a été considéré.

D'après ces premiers résultats, la protéine ATM semble nécessaire à l'expression de HSP70. Néanmoins, à ce stade, les résultats ne permettent pas de discriminer si c'est la présence d'ATM ou seulement sa fonction kinase qui est requise pour l'expression de HSP70 stress inductible.

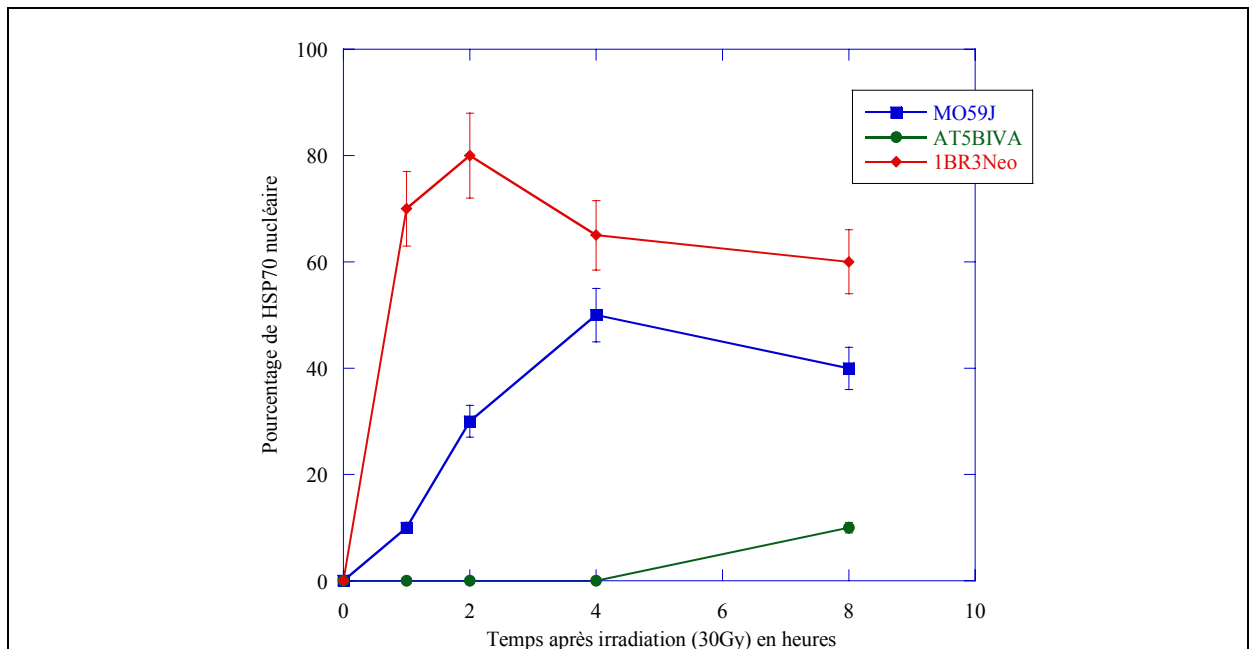
### **III.3.1.1.2- Observation du phénomène de « navette nucléaire »**

HSP70 est connue pour se déplacer depuis le cytoplasme jusqu'au noyau en cas de stress (Velazquez et Lindquist, 1984 ; Welch et Suhan, 1986) dans les cellules d'insecte et de rat. Est-ce aussi le cas pour les cellules d'origine humaine ?



**Figure 67) Test de différentes lignées humaines mutées pour les protéines de réparation de l'ADN**

Photographies (expériences d'immunofluorescence) réalisées après irradiation (30 Gy) avec une source conventionnelle (200 kV). Les temps de réparation sont indiqués au dessus des images. Les résultats concernant la localisation des HSP70 stress inductibles (TRITC ; rouge) sont présentés pour trois lignées cellulaires humaines : le contrôle (1BR3Neo), le mutant ATM<sup>-/-</sup> (AT5BIVA) et le mutant DNA-PK<sup>-/-</sup> (MO59J). En bas, sont indiquées par des flèches les différentes localisations prises par HSP70. Les images sont réalisées par microscope optique à fluorescence avec un grossissement 1000.



**Figure 68) La navette nucléaire de HSP70 stress inductible après rayons X**

Représentation graphique de la fraction de HSP70 nucléaire (par rapport à la fraction totale) en fonction du temps de réparation après irradiation par rayons X (30 Gy).

Existe-il des différences suivant le type de stress ou la lignée cellulaire ? Et notamment, ce phénomène se produit-il dans la même mesure pour les lignées mutées dans les protéines de réparation ?

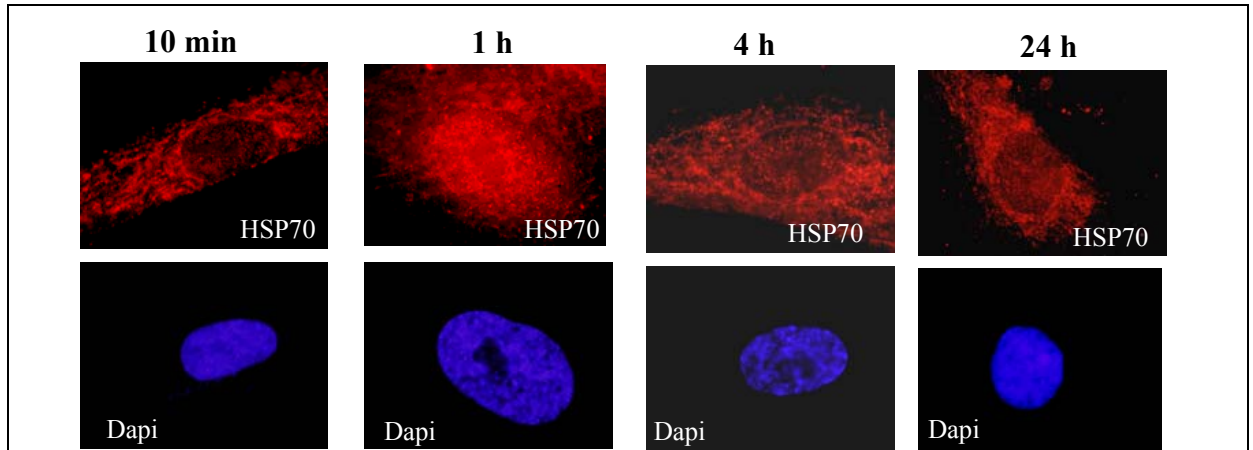
Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées pour étudier la localisation des HSP70 inductibles par le stress dans différentes lignées cellulaires mutées dans les protéines de réparation et ce après différents stress. L'effet des radiations ionisantes sur la localisation de HSP70 est étudié. La localisation de HSP70 est analysée après irradiation par rayons X (30 Gy) sur différentes lignées cellulaires mutées pour les protéines de réparation (figures 67 et 68). HSP70 (stress inductible) possède la particularité de réaliser un déplacement depuis le cytoplasme jusqu'au noyau en cas de stress et ce seulement dans les cellules non mutées dans les protéines de la réparation de l'ADN, après une exposition aux rayons X. HSP70 réintègre ensuite le cytoplasme après stress, lorsque les conditions physiologiques reviennent à la normale. Ce déplacement entre le cytoplasme et le noyau existe aussi dans les cellules humaines et il a été nommé : « navette nucléaire ou nucleoshuttling » de HSP70 après stress. Une absence totale de déplacement est observée lorsque ATM est mutée, ce qui suggère un rôle prédominant de ATM dans le déplacement de HSP70 stress inductible. La ligne mutée en DNA-PK montre, quant à elle, un phénotype retardé pour la navette nucléaire. Le phénomène de navette nucléaire réalisée par HSP70 après stress est visualisé plus clairement sur le graphique (figure 68). La navette nucléaire est nettement visible pour le témoin 1BR3Neo (courbe rouge).

Remarque : Une augmentation entre 4 et 8 heures de réparation pour la lignée mutée en ATM est remarquée sur la courbe verte correspondant au mutant ATM<sup>-/-</sup>. Ceci s'expliquerait par la présence de la protéine ATR (non mutée dans cette lignée) qui prend le relais de ATM déficiente (Foray N *et al*, 2002). Ceci sous entend que la localisation nucléaire serait contrôlée par ATM et dans une moindre mesure par ATR.

Ce phénomène de navette nucléaire est-il ou non dépendant de la dose d'irradiation reçue par les cellules ? Une irradiation avec une dose quinze fois plus faible (2 Gy) a été testée sur les cellules témoins (figure 69). La dose n'apparaît pas être essentielle au déplacement de HSP70 du cytoplasme au noyau après irradiation par rayons X, puisque, même à 2 Gy, la navette nucléaire s'avère être effectuée.

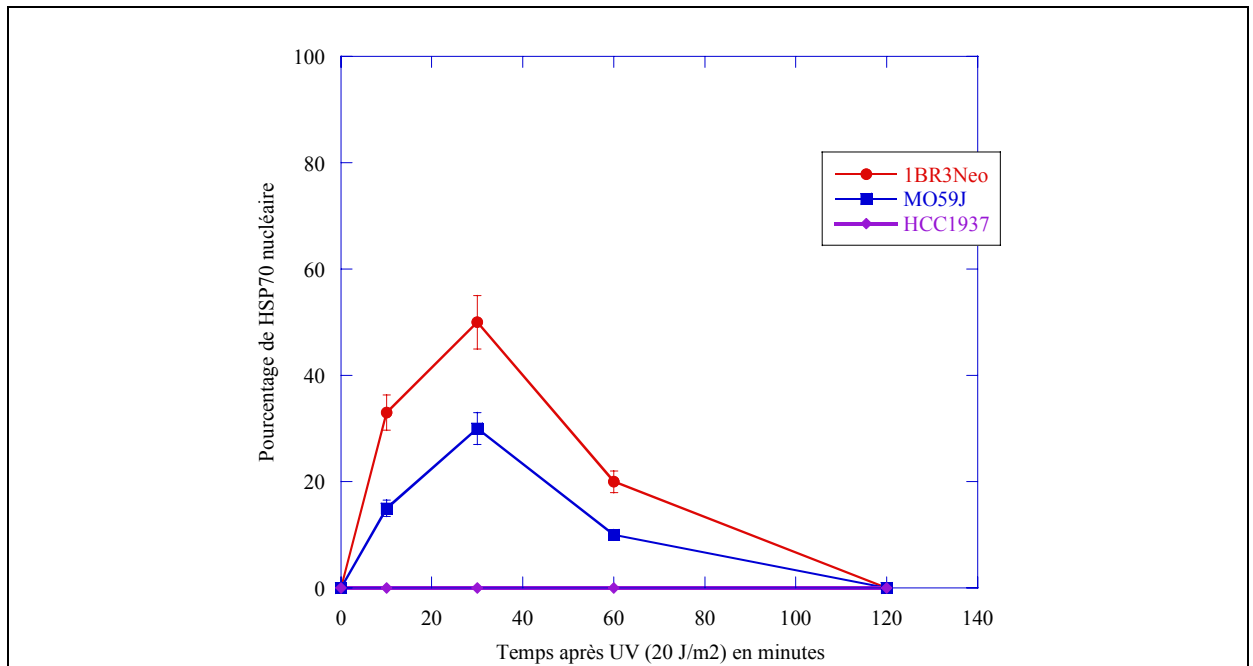
D'autres stress ont été ensuite testés, en utilisant la même méthode, et notamment l'irradiation par les UV et la soumission des cellules à un champ magnétique (à l'aide d'une source du CRSSA). La localisation de la protéine HSP70 après UV (20 J/m<sup>2</sup>) a été testée dans différentes lignées cellulaires mutées dans les protéines de réparation de l'ADN (figure 70).

Après UV, le phénomène de navette nucléaire est observable, même s'il n'a pas la même amplitude. La fraction nucléaire de HSP70 stress inductible n'atteint pas le même maximum qu'en cas d'irradiation par rayons X (voir figures 68 et 70). L'effet visible se révèle plus précoce qu'après irradiation par rayons X, ce qui pourrait être corrélé avec les vitesses de réparation des différents types de dommages créés par les rayons X et par les UV (voir chapitre I ; Goodhead DT, 1989). Ces résultats soulignent également le rôle de DNA-PK et ATM pour la navette nucléaire réalisée par HSP70 après stress. Les kinases DNA-PK et ATM apparaissent comme étant requises pour la navette nucléaire, induite par le rayonnement X et par le rayonnement UV, de la protéine chaperonne HSP70 inductible (correspondant très probablement à un mélange de plusieurs HSP70 très proches, dont HSP72 notamment). ATR joue sans doute aussi un rôle dans cet aller-retour de HSP70 du cytoplasme au noyau. Les résultats obtenus après irradiation avec des champs magnétiques ne sont pas présentés ici par souhait de la collaboratrice du CRSSA. Il faut néanmoins ajouter que l'effet produit après ce stress est un phénomène de navette nucléaire pour HSP70 et que cet effet est bien marqué.



**Figure 69) La navette nucléaire de HSP70 stress inductible dans des cellules 1BR3 après rayons X (2Gy)**

Les photographies d'expériences d'immunofluorescence ci-dessus sont réalisées après irradiation (2 Gy), avec une source conventionnelle (200 kV). Les temps de réparation sont indiqués au dessus des photographies. Les résultats concernant la localisation des HSP70 stress inductibles (TRITC ; rouge) sont présentés pour une lignée fibroblastique humaine non transformée (1BR3). Les noyaux des cellules sont marqués à l'aide du Dapi (bleu). Les images sont réalisées avec un grossissement 1000.



**Figure 70) La navette nucléaire de HSP70 après UV**

Représentation graphique de la fraction de nucléaire de HSP70 en fonction du temps de réparation après irradiation UV (20 J/m<sup>2</sup>). Les temps de réparation (cellules maintenues à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) sont indiqués en abscisse. La fraction de HSP70 nucléaire par rapport à la fraction totale est indiquée en ordonnée. Les résultats concernant la localisation des HSP70 stress inductibles sont présentés pour trois lignées cellulaires humaines : le contrôle (1BR3Neo), le mutant BRCA1-/- (HCC1937) et le mutant DNA-PK-/- (MO59J).

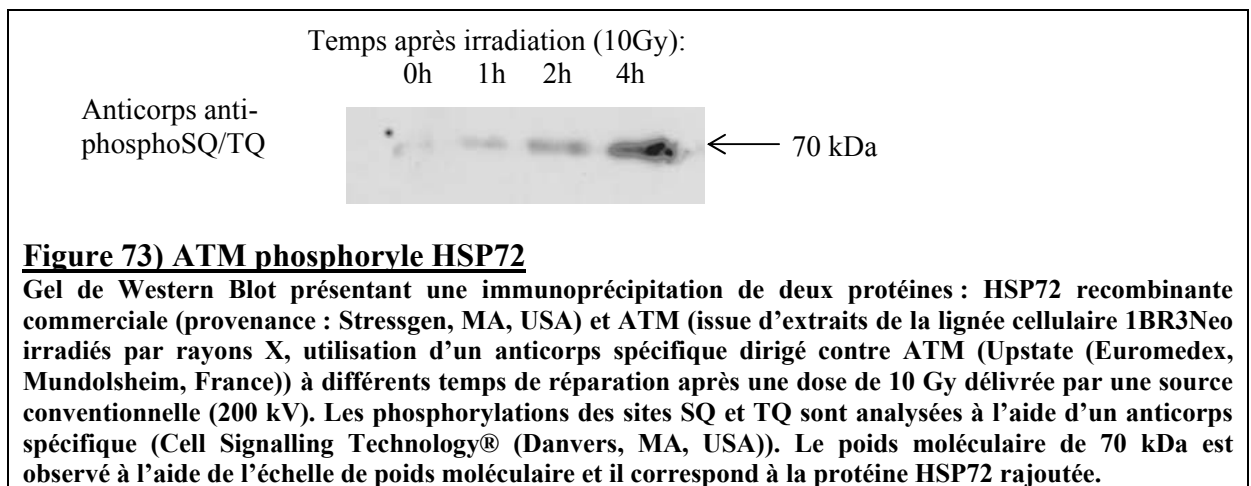
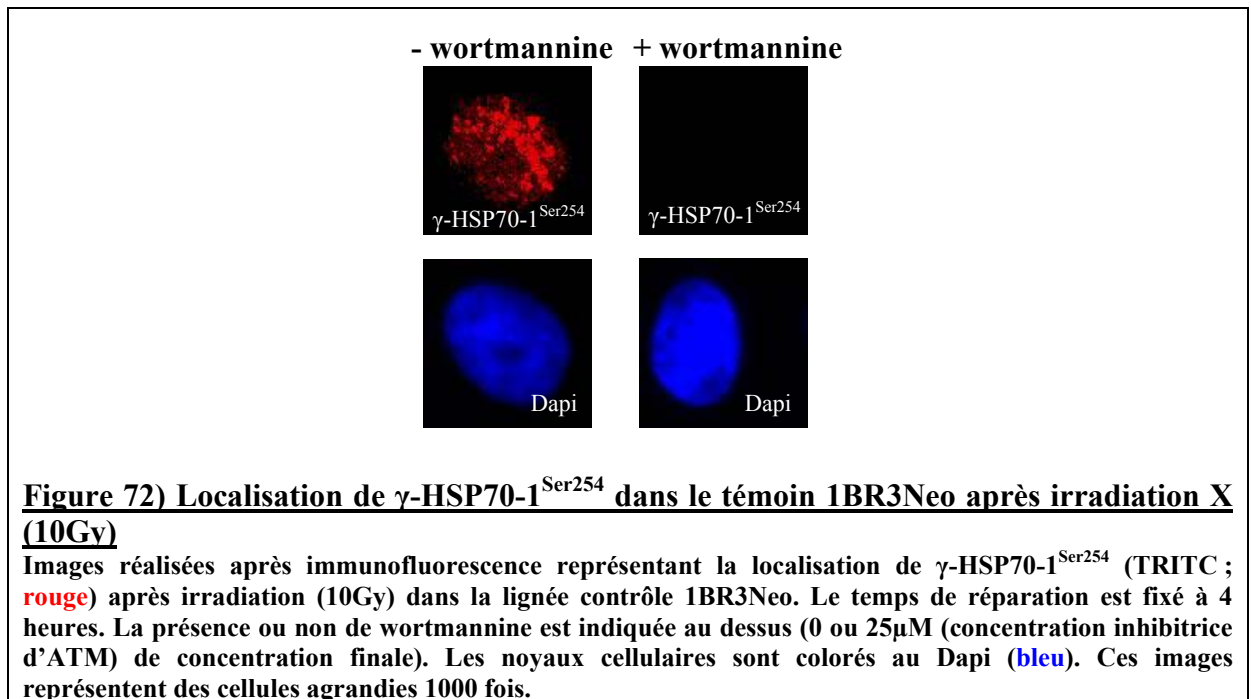
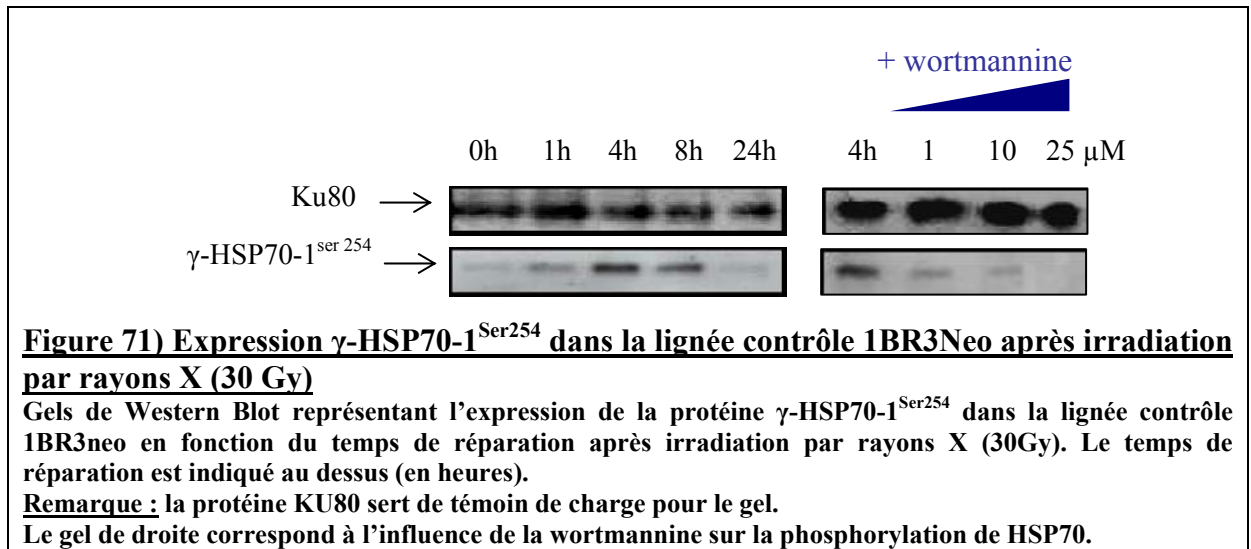
Les autres stress testés (incubation avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou avec cis-platine) n'ont, quant à eux, pas montré de variation marquée concernant la localisation de la protéine HSP70.

### **III.3.1.1.3- Dépendance vis-à-vis de la protéine kinase ATM**

D'après les résultats obtenus précédemment, à savoir que lorsque la protéine ATM est mutée, il n'y a ni expression ni navette nucléaire, et d'après l'hypothèse de départ qui suppose que HSP70-1 est un substrat potentiel d'ATM, un anticorps phospho spécifique a été réalisé. Cet anticorps est dirigé contre la phospho-Sérine 254 de la protéine HSP70-1 (annexe I-d). Le peptide suivant a été injecté comme antigène : **NH<sub>2</sub>-KHKKDISQNKRA-COOH**. Ce peptide est homologue d'une partie de HSP70-1 (voir en rouge sur l'annexe I-c). Il est situé dans le domaine ATPasique de la protéine. Il peut reconnaître théoriquement HSP72 (à 83% d'identité), comme les résultats de « Blast » du serveur expasy.org le montrent. Néanmoins, la sérine en position 254 est absente de la séquence de HSP72. A cause de la phospho-spécificité de l'anticorps utilisé ici, sa reconnaissance de HSP72 semble improbable. Les résultats obtenus avec cet anticorps sont présentés ci-après. L'expression nucléaire de la protéine HSP70-1 phosphorylée sur la sérine numéro 254 a été étudiée après irradiation (30 Gy) en fonction du temps de réparation (figure 71). Sur la droite de cette figure apparaissent les résultats en présence d'une drogue : la wortmannine, possédant la capacité d'inhiber les protéines de la famille des PI3kinases (phosphatidylinositol-3 kinases). ATM, ATR et DNA-PK sont apparentées à cette famille protéique. La présence de wortmannine devrait logiquement diminuer le signal obtenu, si ce sont bien des enzymes apparentées à la famille des PI3kinases qui phosphorylent HSP70-1. Le tableau 11 (d'après Sarkaria JN *et al*, 1998) montre les concentrations de wortmannine correspondantes aux demi inhibitions des différentes « PI3kinases-like ». Pour une concentration de wortmannine de 25µM, on considère que la totalité de l'activité kinase de ATM est inhibée (Sarkaria JN *et al*, 1998). La protéine Ku80 sert de témoin de charge pour les gels de Western Blots réalisés. Lorsque la fonction kinase de la protéine ATM est inhibée (utilisation de 25 µM de wortmannine), HSP70-1 n'est plus phosphorylée (figure 72). Ceci sous entend que c'est principalement ATM qui est responsable de la phosphorylation de HSP70-1 sur cette sérine 254. Néanmoins, la baisse de l'intensité du signal dès 1 µM de wortmannine suggère que d'autres kinases de la famille des PI3kinases ou apparentée sont susceptibles de phosphoryler HSP70-1 en plus de ATM. Ces résultats montrent que la forme phosphorylée de HSP70-1 est visiblement nucléaire, après irradiation par rayons X (10Gy) dans la lignée cellulaire témoin (figure 73). A la concentration d'inhibition de ATM, l'anticorps phospho spécifique ne reconnaît plus rien. HSP70-1 apparaît comme étant phosphorylée en Ser<sup>254</sup> par ATM. La navette nucléaire concerne aussi HSP70-1, tout comme HSP72 (voir figures 67, 68 et 69). De plus, la navette nucléaire est corrélée à une phosphorylation (au minimum sur la sérine 254) de la protéine HSP70-1. C'est sous sa forme phosphorylée que HSP70-1 réalise la navette nucléaire. Ceci sous entend que la fonction kinase de l'enzyme ATM, plus que sa présence physique, est requise pour la navette nucléaire de HSP70-1.

ATM phosphoryle-t-elle aussi HSP70 inductible par le stress ? La phosphorylation des sites SQ/TQ est analysée à l'aide d'une immunoprécipitation de ATM et HSP70 (HSP72) (commerciale) (figure 73). D'après les résultats obtenus, ATM phosphoryle après irradiation (10Gy) l'inductible HSP70, sur ses sites SQ/TQ spécifiques puisque ATM est une sérine-thréonine kinase (Abraham RT, 2004). La même observation s'applique aux autres sites SQ/TQ de HSP70 puisque la Sérine 254 est manquante sur la séquence de HSP72. ATM, activée par irradiation X, phosphoryle spécifiquement HSP70.





L'expression nucléaire de HSP70 après irradiation (X ou UV) dans la lignée contrôle (figure 74) ou dans la lignée ATM<sup>-/-</sup> (figure 75) est étudiée avec un ajout de wortmannine (la concentration est fixée à 25µM pour ces expériences).

<b>Concentration de wortmannine</b>	3,6 µM	5,8 µM	100 µM
<b>Protéines inhibées (pour 50% de l'activité)</b>	DNA-PK	ATM	ATR

**Tableau 11) Concentrations de demi inhibition pour la wortmannine. Tableau regroupant les différentes concentrations inhibitrices de wortmannine en correspondance avec les Phosphatidyl-Inositol-3-Kinases-like. C'est l'activité kinase qui est à moitié inhibée pour ces concentrations dans des cellules témoins A549 (adénocarcinome pulmonaire) (Sarkaria JN *et al*, 1998).**

Dans le cas des cellules témoins, la wortmannine bloque totalement la surexpression de HSP70. Dans le cas des cellules mutantes, la présence de wortmannine n'a aucun effet sur l'expression de HSP70. D'après ces résultats, il apparaît que c'est réellement la fonction kinase d'ATM qui est nécessaire à la surexpression de HSP70 et que ATM est un des acteurs principaux de la phosphorylation de HSP70 après irradiation.

La concentration de wortmannine utilisée ne bloque pas ATR mais bloque DNA-PK et ATM. ATR semble donc ne pas être capable de phosphoryler HSP70. DNA-PK pourrait, quant à elle phosphoryler, dans une moindre mesure, HSP70. Le fait que dans la lignée mutée ATM<sup>-/-</sup>, HSP70 ne soit pas phosphorylée ne gène pas cette hypothèse puisque ATM/ATR activent par phosphorylation DNA-PK et que après rayons X, il faut attendre au minimum 4 heures pour que ATR soit activée (Foray N *et al*, 2002).

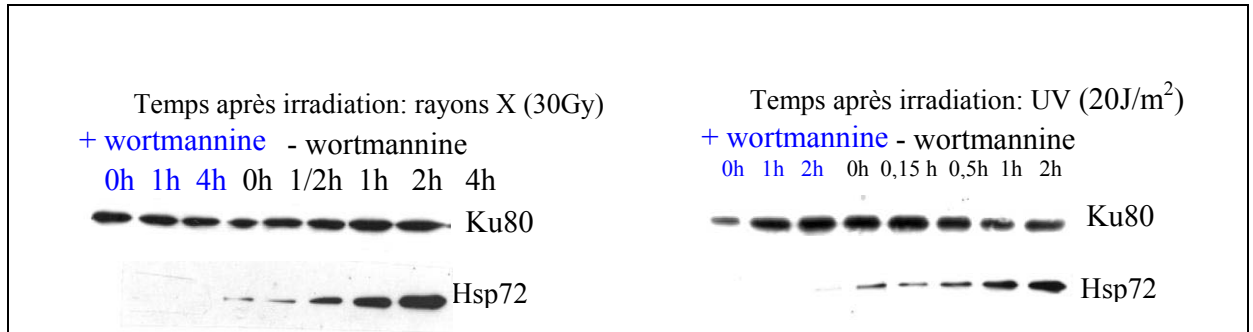
Le tableau 12 récapitule les résultats obtenus dans cette première partie.

<b>Lignées cellulaires</b>	<b>1BR3Neo (contrôle)</b>	<b>AT5BIVA (ATM<sup>-/-</sup>)</b>	<b>MO59J (DNA-PK<sup>-/-</sup>)</b>	<b>HCC (BRCA1<sup>-/-</sup>)</b>
<b>Surexpression de HSP70 après UV, rayons X, H2O2, cis-platine (30µM)</b>	++++	-	+	-
<b>Navette nucléaire de HSP70 après UV, rayons X et champs magnétiques</b>	++++	-	(Retardé) +	-

**Tableau 12) Résumé du comportement de la protéine HSP70 après stress**

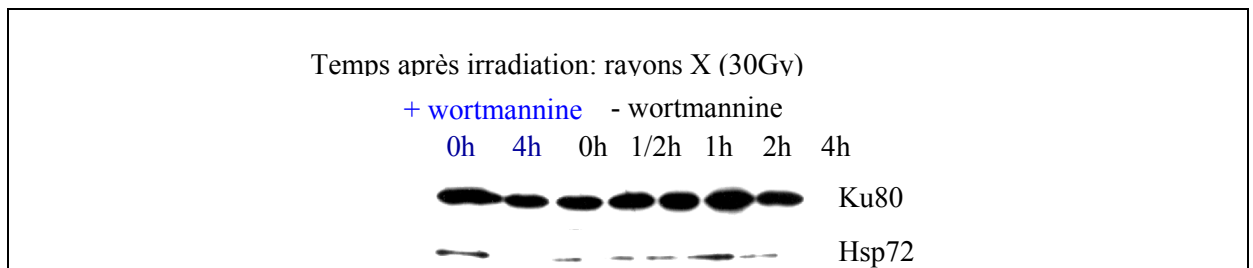
### **III.3.1.2- Partenaires protéiques de HSP70 après stress**

Les résultats obtenus par immunoprécipitation et concernant les différents partenaires protéiques de HSP70 sont exposés dans cette partie. HSP70 est immunoprécipitée avec BRCA1 principalement à l'état basal et à moins forte mesure après rayons X (figure 76). HSP70 est immunoprécipitée avec Rad51 avec un maximum obtenu pour un temps de réparation égal à 2heures, après rayons X (figure 77). Les voies de réparation par recombinaison homologue et par suture sont associées à la réparation des cassures double brin et de par ce fait sont un peu plus lentes à ce mettre en place (chapitre I). C'est pourquoi, directement après irradiation, BRCA1 n'est pas a priori à son maximum d'activité, mais que par contre, aux alentours de deux heures après irradiation Rad51 doit être encore actif. Rad51 est une protéine associée à la réparation par recombinaison homologue, comme BRCA1.



**Figure 74) Expression de HSP70 dans la lignée 1BR3Neo (contrôle) après irradiation (rayons X ou UV), impact de la wortmannine**

Gels de Western Blots montrant l'impact de l'utilisation de la wortmannine (25 $\mu$ M ; la totalité de l'activité kinase de ATM est censée être inhibée à cette concentration) sur l'expression de la protéine HSP70 après radiations ionisantes (X ou UV) en fonction du temps de réparation.



**Figure 75) Expression de HSP70 dans la lignée AT5BIVA (ATM<sup>-/-</sup>) après irradiation (rayons X), impact de la wortmannine**

Gels de Western Blots montrant l'impact de l'utilisation de la wortmannine (25 $\mu$ M) sur l'expression de la protéine HSP70 après radiations ionisantes (X) en fonction du temps de réparation.

Ceci suggère que HSP70 pourrait être impliquée dans la recombinaison homologue. D'après les résultats montrés dans le tableau 13, il apparaît que c'est seulement lorsque les protéines de réparation sont activées (c'est-à-dire ATM et ATR après UV et ATM, DNA-PK, un peu BRCA1 et Rad51 après rayons X) qu'elles interagissent avec HSP70 (directement ou indirectement : cette technique ne permet pas de discriminer de ce point). Conformément à l'hypothèse de départ, HSP70-1 se révèle être un substrat de phosphorylation de la kinase de réparation ATM.

<b>Stress / Interaction HSP70 avec protéines de réparation</b>	<b>ATM</b>	<b>ATR</b>	<b>BRCA1</b>	<b>DNA-PK</b>	<b>Rad51</b>
<b>UV</b>	++	±	-	-	-
<b>Rayons X</b>	+++	±	±	++	++

**Tableau 13) Récapitulatif des interactions de HSP70 avec les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN après stress.** Tableau regroupant plusieurs résultats obtenus par immunoprécipitation. Sont indiqués les différentes protéines partenaires et leur interaction ou non avec HSP70 en fonction du stress donné (rayons X ou UV).

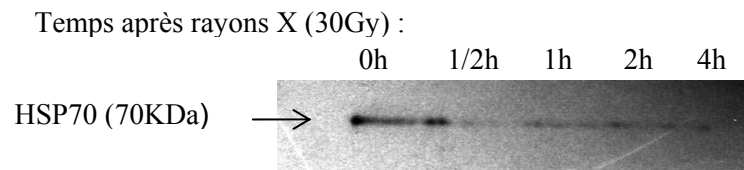
### **III.3.1.3- Position et rôles joués par HSP70-1 dans la réparation de l'ADN**

#### **III.3.1.3.1- Construction de mutants HSP70-1**

Des mutants HSP70-1 (figure 78) ont été réalisés pour parfaire cette étude de HSP70-1 dans le cadre de la réparation de l'ADN. Des mutations ponctuelles des bases Ser→Gly et Thr→Gly ont été réalisées sur les quatre sites SQ/TQ, par mutation dirigée (à l'aide du Kit Direct Mutation de chez Qiagen). Elles n'ont pas donné de lignée cellulaire transfectée viable. Il en fut de même pour le mutant tronqué par l'enzyme de restriction Pst1.

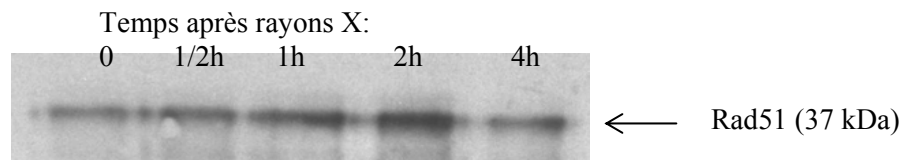
Seul le mutant tronqué par l'enzyme de restriction Cla1 (en plus du HSP70-1 sauvage) a pu donner une lignée cellulaire viable. L'expression stabilisée est permise par l'utilisation d'un plasmide comportant la résistance à la blasticidine. La blasticidine est un antibiotique très toxique pour les cellules (notice du produit- Sigma Aldrich). Par rapport à la transfection du plasmide vide, il a été observé que la possession de HSP70-1 (sauvage) augmente, en plus de la présence du gène de résistance à la blasticidine porté par le plasmide pcDNA-6 (Invitrogen), la capacité des cellules à résister à l'antibiotique. De plus, une différence significative au niveau de la croissance cellulaire apparaît entre le témoin transformé avec le plasmide vide et la lignée transformée avec le plasmide contenant HSP70-1 non tronquée. La lignée possédant HSP70-1 pousse environ 1,5 fois plus rapidement. La lignée possédant HSP70-1 tronquée par Cla1 montre, par contre, une légère perte d'adhérence vis à vis du support.

Remarque : d'autres mutants surexprimant HSP70 ont été réalisés avec le même type de construction (Iordanskiy S *et al*, 2004).



**Figure 76) Interaction entre les protéines: immunoprécipitation de BRCA1 avec HSP70 après irradiation par rayons X**

Gel de Western Blot montrant une immunoprécipitation de BRCA1 provenant d'extraits 1BR3Neo après irradiation, en fonction du temps de réparation (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) après une irradiation de 30 Gy. Les partenaires protéiques sont révélés par le gel, avec ici les résultats concernant HSP70 (utilisation de l'anticorps dirigé contre HSP70).



**Figure 77) Immunoprécipitation de HSP70 avec Rad51 dans des extraits nucléaires 1BR3Neo soumis aux rayons X (30Gy)**

Gel de Western Blot présentant une immunoprécipitation de HSP70 provenant d'extraits 1BR3Neo après irradiation (30 Gy), en fonction du temps de réparation. Les partenaires protéiques sont révélés par le gel, avec ici les résultats concernant Rad51 (utilisation de l'anticorps dirigé contre Rad51).

### **III.3.1.3.2- Tests des mutants HSP70**

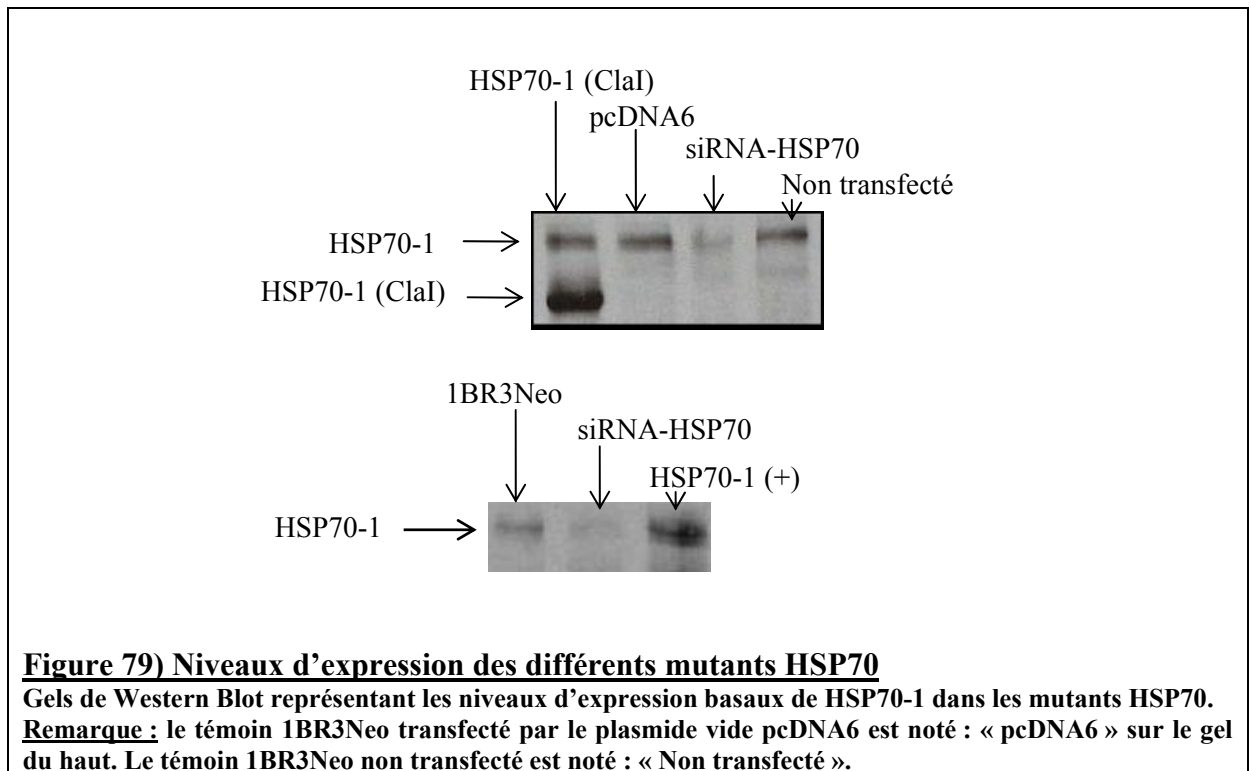
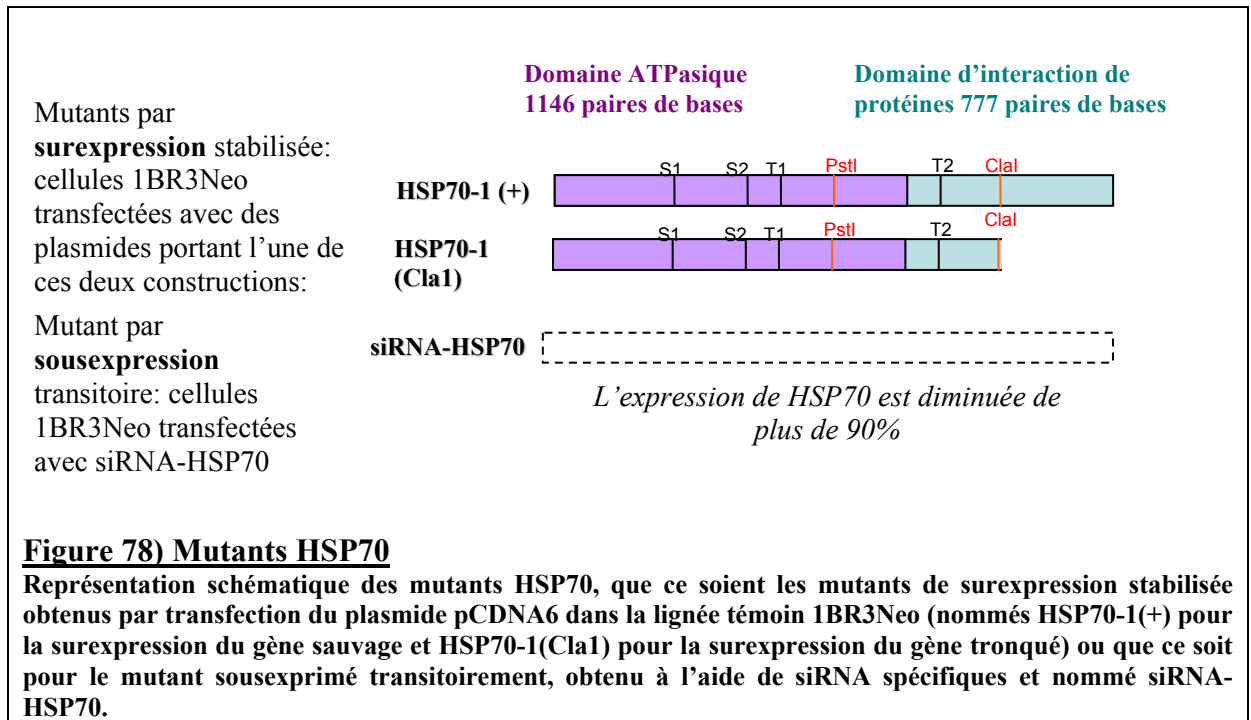
L'expression nucléaire à l'état basal de la protéine HSP70 chez les différents mutants HSP70 réalisés est étudiée (figure 79). L'anticorps utilisé ici est celui provenant de chez Upstate : ceci montre que cet anticorps est aussi capable de reconnaître HSP70-1 en plus de HSP72 et HSP73. Les mutants HSP70 expriment la protéine HSP70 au niveau attendu. L'expression de HSP70-1 à l'état basal des mutants de surexpression est plus marquée et un léger décalage dû à la troncature est observé chez le mutant HSP70-1 (Cla1). En effet, le mutant tronqué, ayant un poids moléculaire inférieur à la version sauvage de la protéine va migrer plus loin sur le gel.

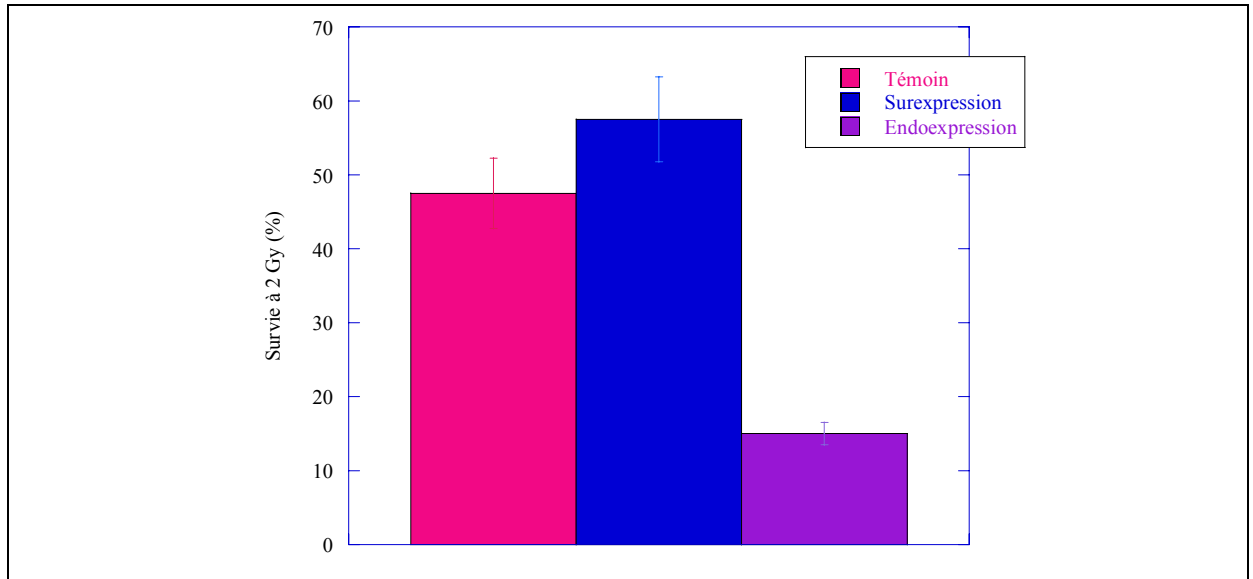
Le mutant de sous expression, quant à lui, sousexprime, de façon transitoire, la protéine HSP70, conformément à ce qui est indiqué sur la notice des siRNA-HSP70 (diminution d'environ 90% des taux d'expression) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Ces faits sont observés sur les gels (figure 79).

La survie des mutants HSP70 a été étudiée à 2Gy au moyen d'un test de clonogénicité standard (figure 80). Les mutants furent irradiés à 2 Gy puis traités selon le protocole indiqué (chapitre III.2).

Le mutant de sousexpression siRNA-HSP70 présente une survie faible à 2 Gy, par rapport au témoin. Le mutant de surexpression HSP70-1(+) montre une survie augmentée par rapport au témoin à 2 Gy. Ces résultats se traduisent par un phénotype plutôt radiosensible pour le mutant de sousexpression et par un phénotype plutôt radiorésistant pour le mutant de surexpression HSP70-1(+). Le test de clonogénicité standard réalisé (voir figure 80) supporte les données de la littérature, à savoir que HSP70 est une protéine de survie. Ainsi, le fait de surexprimer, de façon constitutive HSP70, augmente significativement la survie des cellules 1BR3Neo à 2 Gy.

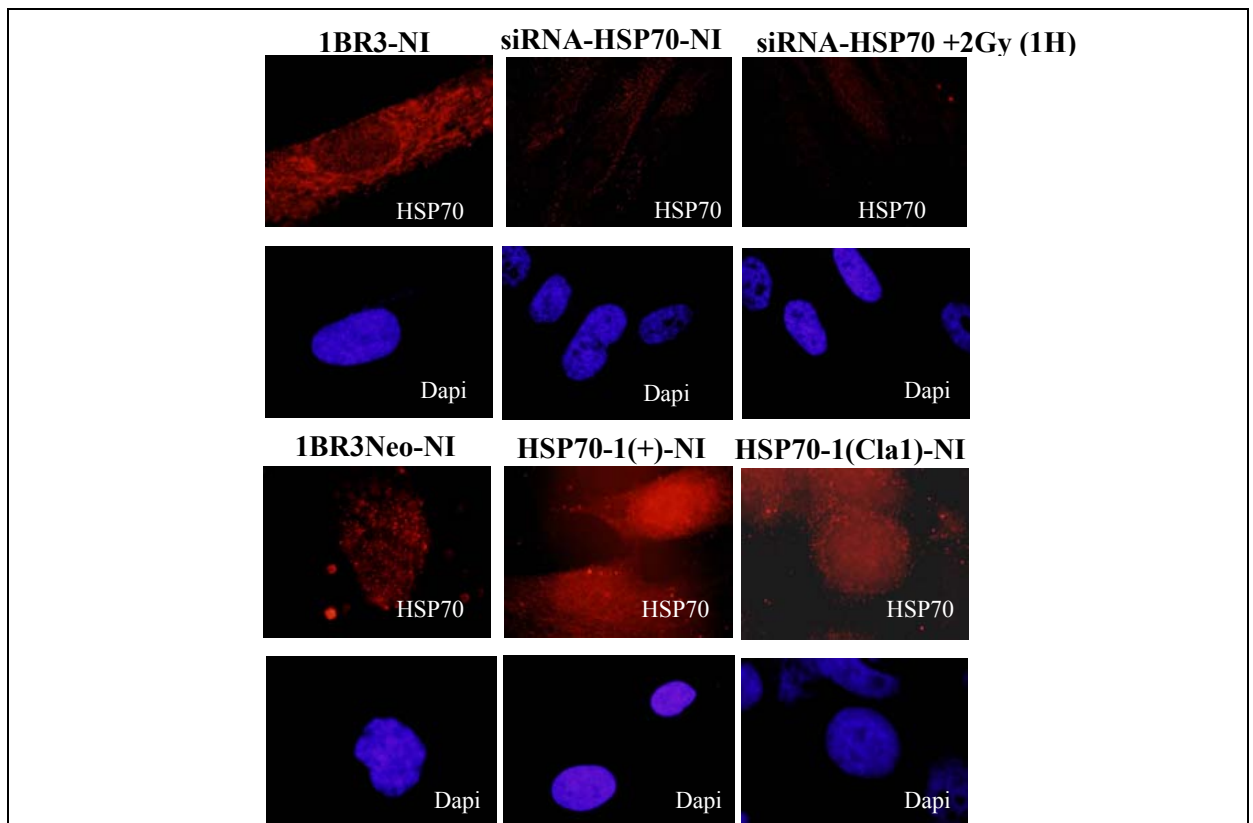
La localisation de HSP70 stress inductible est étudiée par des expériences d'immunofluorescence chez les différents mutants à l'état basal et après une exposition à une dose de 2 Gy pour le mutant de sousexpression (figure 81). Chez ce mutant siRNA-HSP70, le marquage HSP70 apparaît cytoplasmique et plus faible que pour le témoin 1BR3, bien que l'intensité lumineuse reste constante pour toutes les photographies. Toutes ces expériences furent réalisées en parallèle. D'autre part, il n'y a pas de délocalisation de HSP70 dans le noyau après irradiation pour le mutant de sousexpression siRNA-HSP70, contrairement au témoin 1BR3 (voir figure 69). Ceci peut être dû au fait que le signal est trop faible que pour être détecté. Cette expérience constitue un test concluant supplémentaire du bon fonctionnement des small interfering RNA dirigés contre HSP70. Les mutants de surexpression, HSP70-1(+) et HSP70-1(Cla1), montrent une localisation majoritairement nucléaire pour la protéine HSP70 à l'état basal. Le mutant HSP70-1(+) produit un signal plus intense pour le marquage HSP70 que le mutant de surexpression de la version tronquée de HSP70-1 (HSP70-1(Cla1)), eux-mêmes produisant un signal d'intensité augmentée par rapport aux témoins 1BR3 et 1BR3Neo pour ce même marquage. La protéine HSP70-1 apparaît bien surexprimée pour les deux mutants de surexpression HSP70-1(+) et HSP70-1(Cla1). Le fait que les protéines HSP70-1 soient localisées dans le noyau des mutants de surexpression peut s'expliquer par leur production en haute concentration qui a pu empêcher ou gêner leur relocalisation dans le cytoplasme.





**Figure 80) Survie à 2 Gy des différents mutants HSP70**

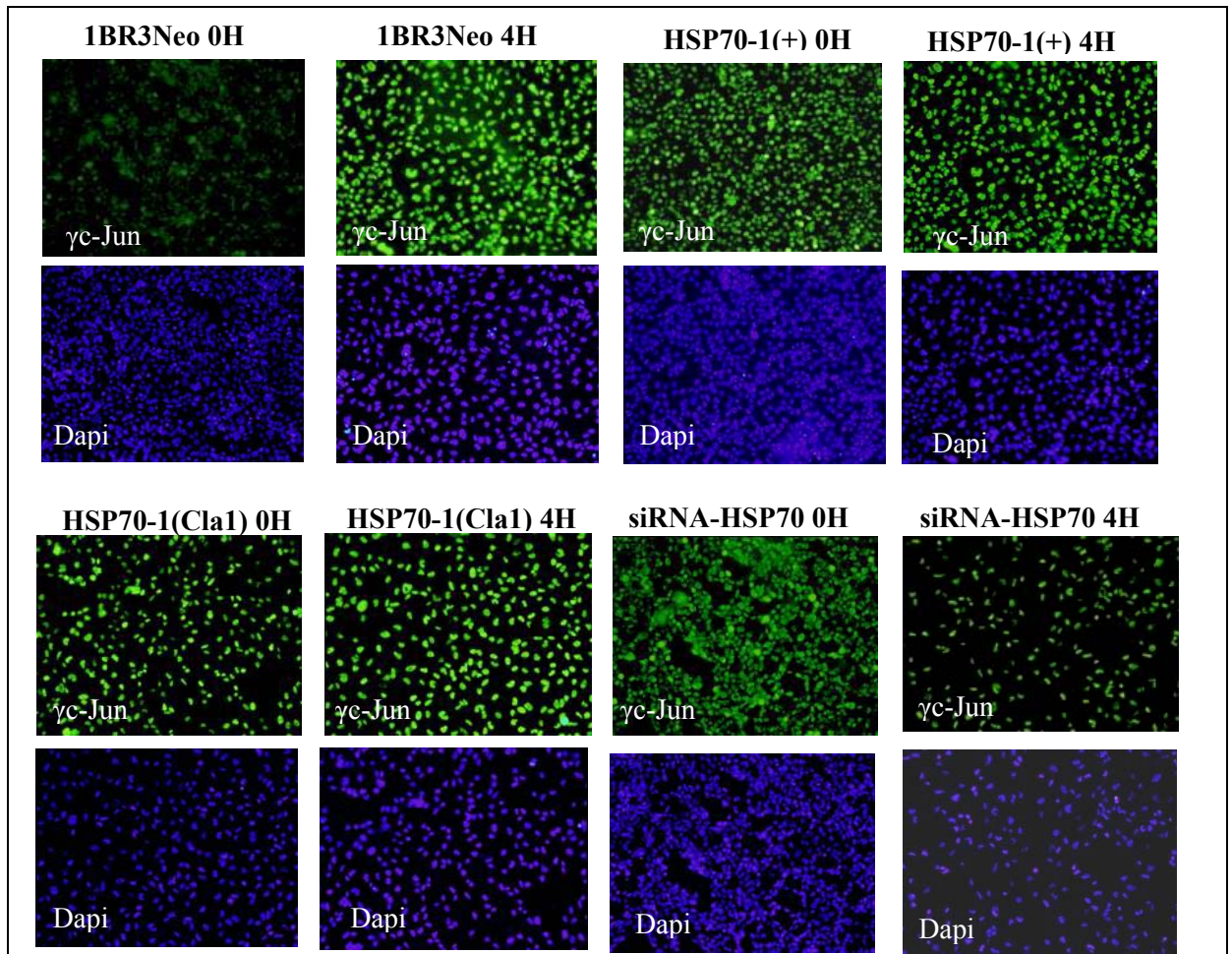
Représentation par diagramme des résultats obtenus pour des tests de clonogénicité standard réalisés après une irradiation de 2Gy pour les différents mutants HSP70. Le pourcentage de survie clonogénique observé dans la lignée cellulaire indiquée (témoin : 1BR3Neo, surexpression : HSP70-1(+), sous-expression : siRNA-HSP70) est indiqué pour des cellules ensemencées directement après l'exposition à 2Gy. Les résultats sont notés avec une barre d'erreur représentant deux expériences indépendantes.



**Figure 81) Localisation de HSP70 chez les mutants HSP70**

Photographies obtenues après une expérience d'immunofluorescence sur cellules de fibroblastes de peau non transformés 1BR3 irradiées (ou non) avec une dose de 2 Gy directement après transfection des siRNA (pour les 6 premières images) ou de fibroblastes 1BR3Neo non irradiés (notés NI, pour les 6 autres images). La localisation de HSP70 est observée (TRITC, rouge). Les noyaux cellulaires sont marqués à l'aide du Dapi (bleu). Ces images représentent des cellules agrandies 1000 fois.





**Figure 82) Phosphorylation de c-Jun (après 10Gy) pour les différents mutants HSP70**

Photographies obtenues après une expérience d'immunofluorescence sur cellules 1BR3Neo irradiées avec une dose de 10 Gy directement après transfection des siRNA. La localisation de phospho-c-Jun est ainsi observée (FITC ; **vert**). Les temps de réparation (0H : directement après irradiation ou 4H : quatre heures après irradiations) sont comptabilisés pour les cellules en milieu complet (c'est-à-dire complété avec 10% de sérum), à 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Les noyaux sont colorés à l'aide du Dapi (**bleu**). Un grossissement 100 est utilisé au microscope pour la réalisation de ces images.

**Remarque :** cet anticorps marque toutes les cellules. Cette expérience analyse les différences d'intensité du marquage. Les cellules apparaissant les plus lumineuses sont considérées comme étant positives.

### **III.3.1.3.3- Les mutants HSP70 et le modèle vertical de la réparation de l'ADN**

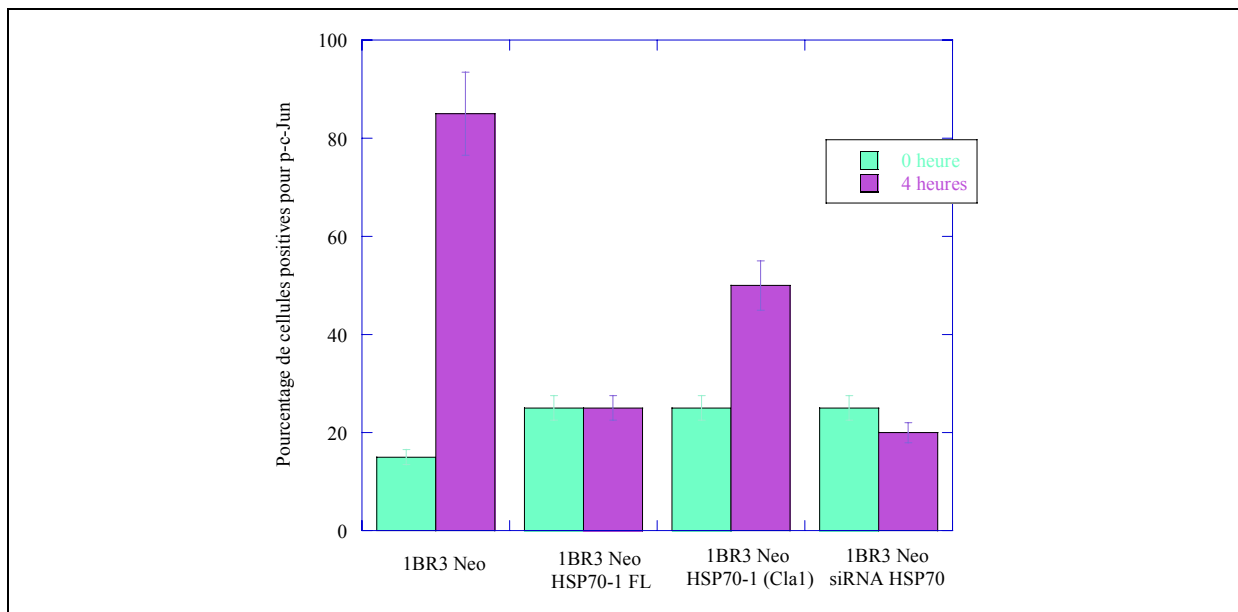
A quel niveau du modèle vertical de la réparation de l'ADN est-il possible de placer les protéines HSP70 inductibles par le stress (voir figure 11, chapitre I ; Foray N *et al*, 2003) ?

Pour répondre à cette question, une série d'expériences d'immunofluorescence a été réalisée avec les différents marqueurs spécifiques de chaque étape du modèle vertical de la réparation de l'ADN et ce pour les différents mutants HSP70. La phosphorylation de l'antioncogène cellulaire c-Jun est connue pour indiquer l'apoptose cellulaire (Angel P *et al*, 1988 ; Jacobs-Helber S *et al*, 1998). Ce marqueur a été testé chez les différents mutants HSP70 sans et après irradiation de 10 Gy (figures 82 et 83). Ni les mutants de surexpression ni celui de sous expression ne présentent le même profil que le témoin 1BR3Neo par rapport au marqueur c-Jun. A quatre heures après irradiation, les cellules mutantes siRNA-HSP70 et HSP70-1(+) n'apparaissent pas positives pour le marqueurs c-Jun. HSP70-1(Cla1) présente une réponse intermédiaire après irradiation (50%, voir figure 83, barre d'erreur de 10%). En l'absence de HSP70, la phosphorylation de c-Jun ne s'effectue pas et la cellule n'entre pas en apoptose alors qu'elle est censée le faire après avoir reçu une dose de 10 Gy, comme le montre le témoin 1BR3Neo pour le temps de réparation de 4 heures (85%, voir figure 83, barre d'erreur de 10%). D'après les résultats obtenus, la présence de HSP70 influe fortement sur la phosphorylation de c-Jun. Les taux de phosphorylations pour c-Jun et donc d'apoptose sont plus élevés pour le témoin que pour les mutants de surexpression de HSP70-1 pour le temps de réparation de quatre heures après une irradiation de 10 Gy. La surexpression de HSP70 est connue pour son activité anti-apoptotique.

Remarque : Les résultats obtenus s'accordent avec certaines données de la littérature puisqu'une surexpression constante de HSP70 (HSP72) (à l'aide du même type de vecteur) apparaît comme étant anti-apoptotique dans d'autres types cellulaires (cellules du cancer du colon : Rashmi R *et al*, 2004 ; cellules : promyélocytes ; Guo F *et al*, 2005). De même, la survie des fibroblastes WI-38 normaux après déplétion de HSP70 a été observée alors que la déplétion de HSP70 entraîne normalement l'apoptose dans des cellules tumorales (Nylandsted J *et al*, 2000).

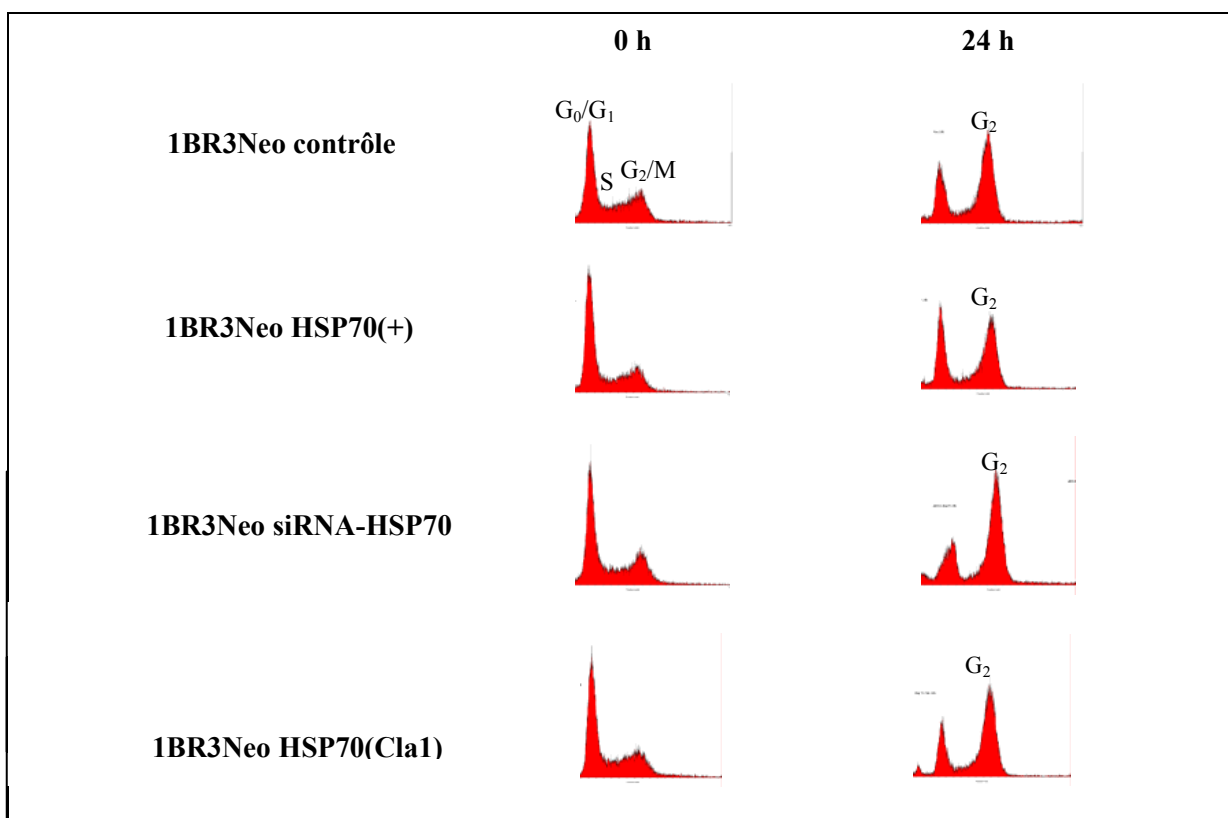
Il faut noter que c-jun peut être phosphorylée par une autre voie cellulaire : celle passant par la kinase activée par le stress « stress activated kinase » (Gong Y *et al*, 2006).

Des expériences d'étude du cycle cellulaire ont été réalisées pour chaque mutant (figure 84). Toutes les cellules présentent un pic correspondant à la phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> relativement élevé et correspondant au non irradié (0 heure), dans les cycles cellulaires. Ceci suggère que les cellules sont peu proliférantes et que la grande majorité de ces cellules est en phase quiescente. L'arrêt en phase du cycle G<sub>2</sub> apparaît bien marqué pour tous les mutants, ainsi que pour le témoin, pour 24 heures de temps de réparation après une irradiation de 10 Gy (pic G<sub>2</sub>/M élevé, figure 84). Néanmoins, l'arrêt en G<sub>2</sub> le plus marqué reste celui du mutant de sous-expression siRNA-HSP70. La déplétion de HSP70 entraîne donc un arrêt du cycle en G<sub>2</sub>/M. Pour prouver cette hypothèse, la phosphorylation de la protéine CHK1 a été étudiée. CHK1 est, lorsqu'elle est phosphorylée, responsable d'un arrêt en phase G<sub>2</sub>/M (figures 85 et 86) (O'Connell MJ *et al*, 2000). Après quatre heures après irradiation (10 Gy), seul le mutant de sous-expression présente une phosphorylation significative de CHK1 (environ 60% des cellules ; figure 86). D'après les résultats obtenus par cytométrie (figure 84), il apparaît aussi que les cycles correspondant à la surexpression de HSP70-1(+) présentent un arrêt en G<sub>1</sub> après irradiation par rayonnement X, ce qui sous-entend une phosphorylation de CHK2.



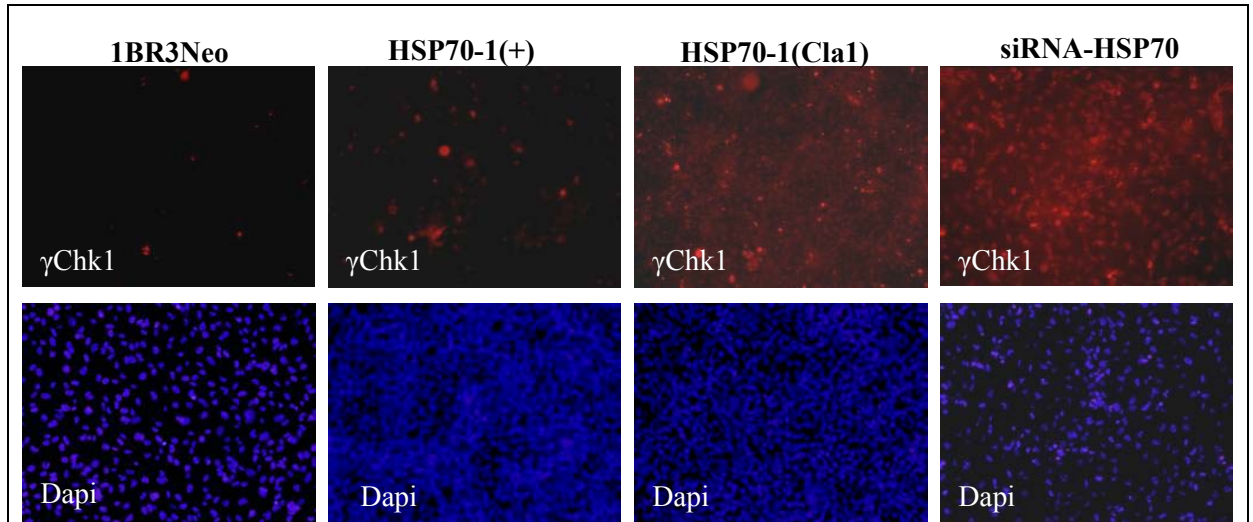
**Figure 83) Phosphorylation de c-Jun (après 10Gy) chez les mutants HSP70**

Représentation graphique du pourcentage de cellules positives pour le marquage de  $\gamma$ -c-Jun en fonction des différents mutants HSP70, pour des temps de réparation équivalents à 0 heure (c'est-à-dire directement après irradiation) ou après 4 heures de réparation, après une irradiation de 10 Gy



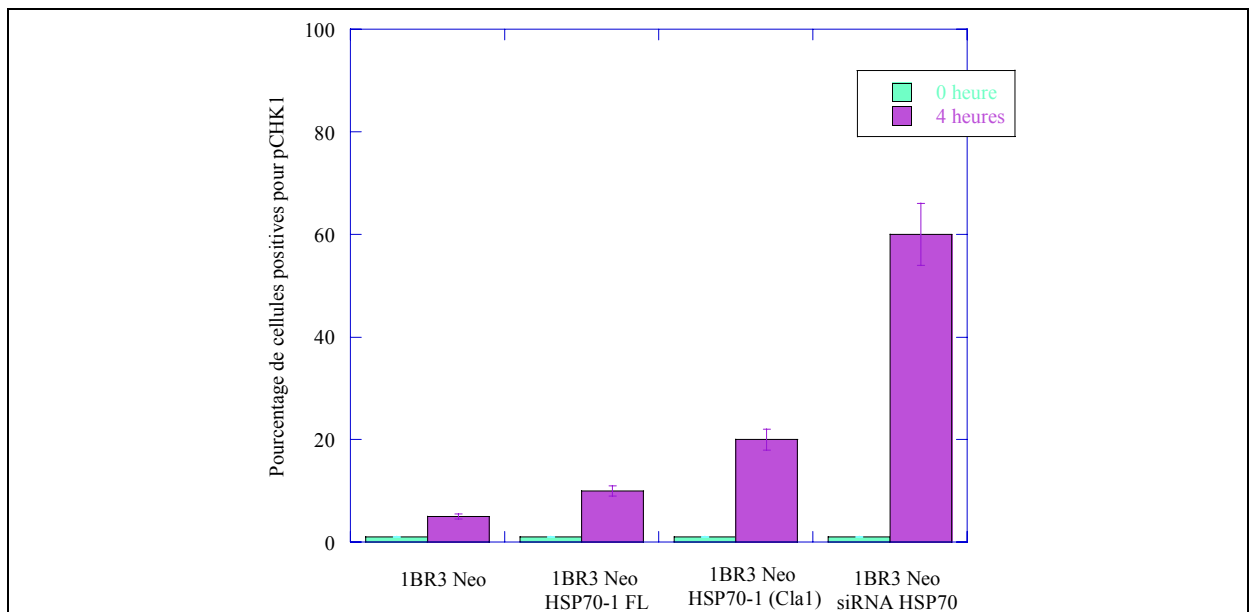
**Figure 84) Cycles cellulaires pour les différents mutants après irradiation (10Gy)**

Cycles cellulaires obtenus, à l'aide du cytophotomètre en flux et d'un logiciel de traitement d'image WinMDI2.8, pour les conditions suivantes : sans irradiation et après 24 heures de réparation après 10 Gy. Les mutants HSP70, ainsi que le témoin, sont représentés.



**Figure 85) Phosphorylation de CHK1 (après 10Gy) pour les différents mutants HSP70**

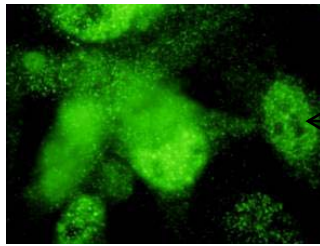
Photographies obtenues après une expérience d'immunofluorescence sur cellules 1BR3Neo irradiées avec une dose de 10 Gy. La localisation nucléaire de phospho-CHK1 est observée (TRITC, rouge). Les temps de réparation sont fixés à 4 heures (cellules en milieu complet (c'est-à-dire complétement avec le sérum), à 37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Les noyaux sont colorés à l'aide du Dapi (bleu). Ici, le grossissement 100 est utilisé au microscope.



**Figure 86) Phosphorylation de CHK1 chez les différents mutants HSP70-1 après irradiation (10 Gy)**

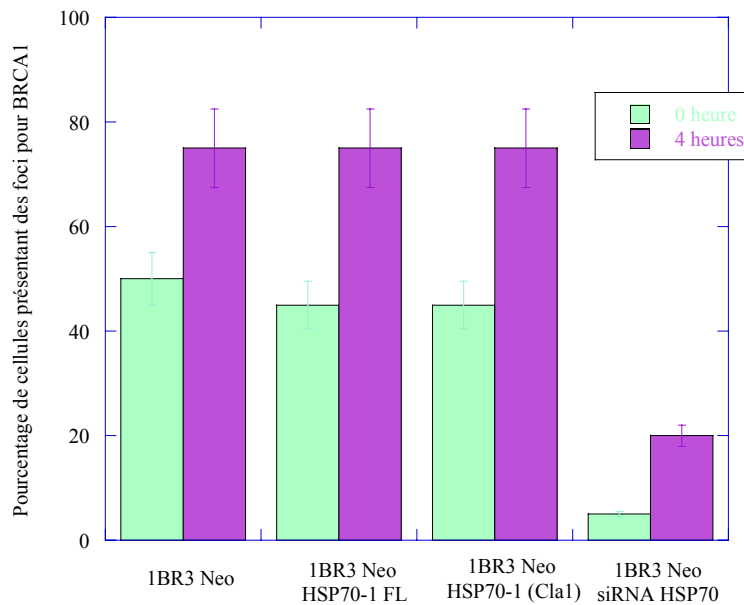
Représentation graphique du pourcentage de cellules positives pour le marquage de phospho-CHK1 en fonction des différents mutants, directement après une irradiation de 10 Gy (0 heure) ou après un temps de réparation égal à 4 heures.

**Foci BRCA1 sur cellules 1BR3 Neo (4H)**



**Figure 87) Exemple de foci de BRCA1 dans la lignée témoin 1BR3Neo, 4heures après une irradiation de 10 Gy**

Photographie, obtenue par immunofluorescence, montrant l'état de phosphorylation de BRCA1 (FITC ; vert) chez le témoin 1BR3Neo après une irradiation de 10 Gy. Les foci BRCA1 sont visibles sur cette photographie et sont indiqués par la flèche (points verts lumineux). Cette image représente des cellules grossies 1000 fois.



**Figure 88) Phosphorylation de BRCA1 chez les mutants HSP70**

Représentation graphique du pourcentage de cellules montrant des foci pour la protéine BRCA1 (c'est-à-dire une phosphorylation de BRCA1), après une irradiation (10 Gy), en fonction des différents mutants HSP70, et ce pour deux temps de réparation différents : 0 et 4 heures.

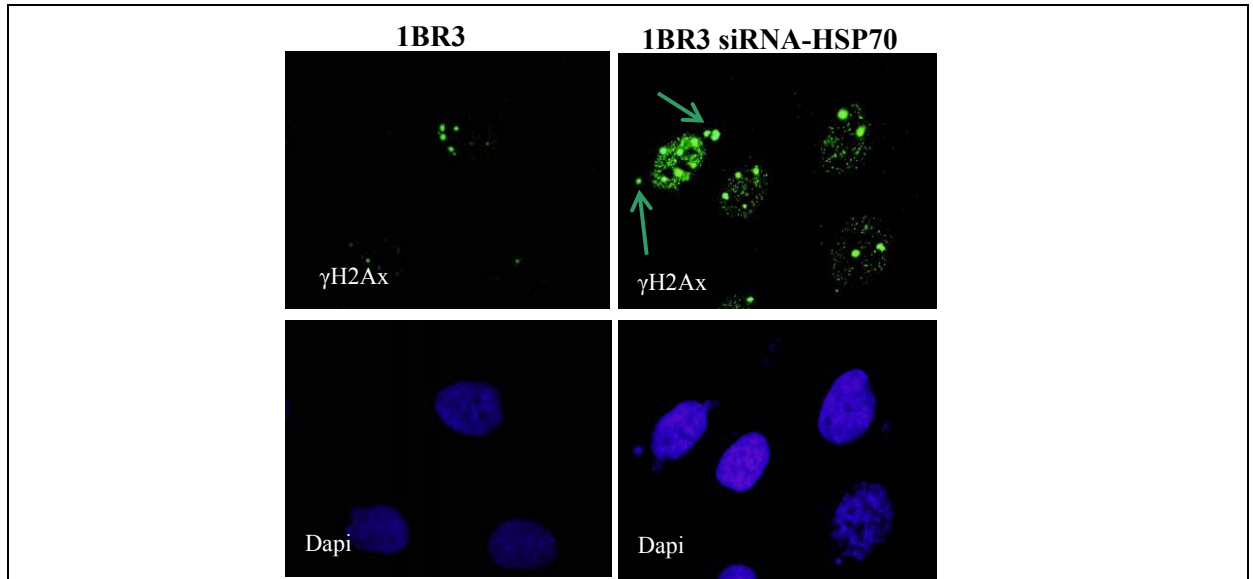
Lorsque HSP70 est sous-exprimée, l'arrêt du cycle en G<sub>2</sub>/M est plus marqué, ce qui se traduit par un pic plus élevé correspondant à une plus grande quantité de cellules arrêtées en phase du cycle G<sub>2</sub>/M. La surexpression de HSP70-1 limite la prolifération cellulaire (arrêt en G<sub>1</sub> et arrêt intermédiaire en G<sub>2</sub>), de même que la sous-expression de HSP70 (arrêt en G<sub>2</sub>/M marqué). HSP70 n'apparaît pas comme étant activée aux mêmes niveaux que c-Jun et que CHK1. Les investigations dans la hiérarchie du modèle vertical de la réparation de l'ADN doivent être poursuivies.

Les résultats concernant la présence des foci BRCA1 (correspondant à une phosphorylation de BRCA1) sont présentés dans les figures 87 et 88. BRCA1 apparaît relativement peu phosphorylée après irradiation chez le mutant de sous-expression (cette phosphorylation apparaît pour environ 20% des cellules). Il n'y a, par contre, aucune différence observée entre le témoin 1BR3Neo et les mutants de surexpression HSP70-1(+) et HSP70-1(Cla1), par rapport à la phosphorylation de BRCA1 (c'est-à-dire à la présence de foci nucléaires de BRCA1) après irradiation (aux alentours de 75% des cellules présentent une phosphorylation de BRCA1). HSP70 est nécessaire à la phosphorylation de BRCA1 et donc à la formation de foci de BRCA1. L'activation de HSP70 s'effectue, par conséquent, encore plus précocement dans le modèle vertical proposé pour la réparation de l'ADN.

La phosphorylation de l'histone H2Ax chez le mutant de sous-expression siRNA-HSP70 a ensuite été étudiée (figures 89 et 90). L'histone H2Ax est connue pour être phosphorylée en cas de cassures double brin de l'ADN. Les cassures double brin de l'ADN apparaissent alors comme des foci bien définis, grâce au marquage  $\gamma$ H2Ax (Foster E *et al*, 2005). La représentation du nombre de foci  $\gamma$ H2Ax par cellule normalisé en pourcentage (sachant que 2 Gy produisent en moyenne 80 cassures double brin, soit 80 foci  $\gamma$ H2Ax par cellule ; Goodhead DT, 1989) en fonction du temps de réparation est conventionnellement appelée *courbe de réparation* (figure 90) (Balosso J et Foray N, Collection John Libbey, 2005). D'après ces courbes de réparation, le mutant de sous-expression est déficient en réparation (plus lent et moins efficace pour réparer ses cassures double brin d'ADN) que le témoin 1BR3. Ainsi, après un temps de réparation de 24 heures, il reste encore environ 35% de cassures double brin non réparées chez le mutant siRNA-HSP70, alors que ce même pourcentage se trouve aux alentours de 0% pour le témoin 1BR3.

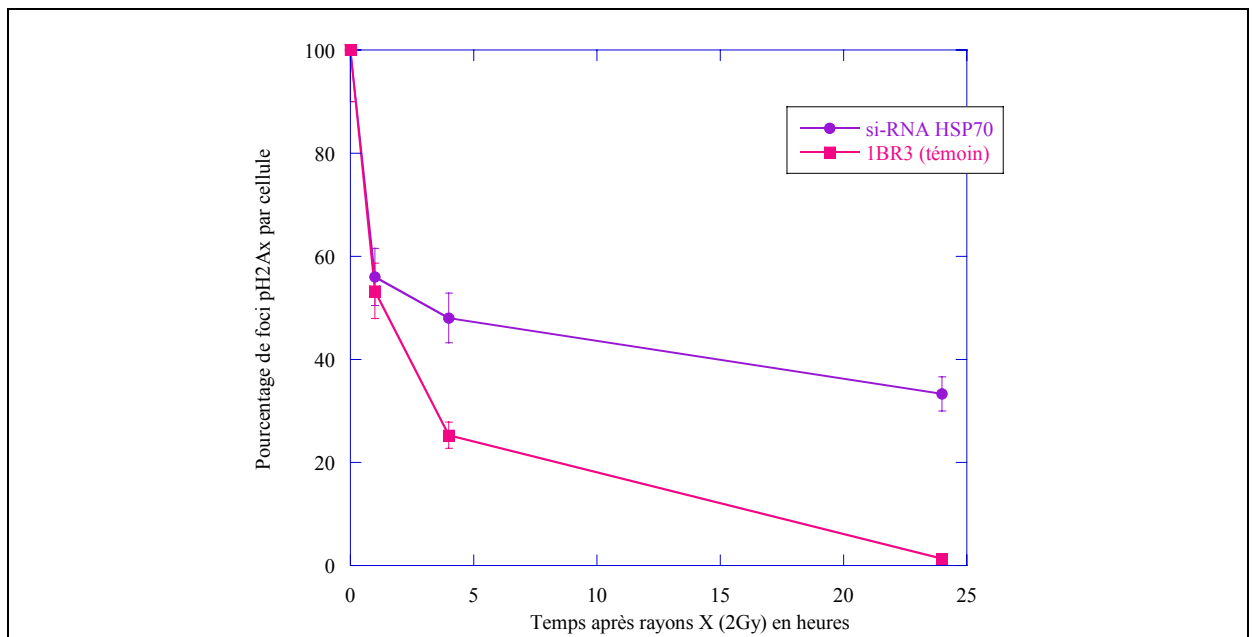
La sous-expression de HSP70 se traduit par un phénotype *radiosensible*.

Au vu des résultats, HSP70-1 est activée par phosphorylation par ATM et sans doute aussi par DNA-PK et par ATR dans une moindre mesure, dans les stades précoces de la réparation de l'ADN ; de plus, HSP70-1 joue un rôle dans la réparation de l'ADN. HSP70-1 apparaît bien comme étant inductible par le stress, tout comme HSP72. Il y a donc au minimum deux HSP70 inductibles par le stress. HSP72 se trouve être, elle aussi, un substrat des kinases ATM, ATR et DNA-PK.



**Figure 89) Phosphorylation de H2Ax après 24 heures après une irradiation de 2 Gy (témoin 1BR3 et mutant siRNA-HSP70)**

Photographies, obtenues par immunofluorescence, montrant l'état de phosphorylation de l'histone H2Ax (FITC ; vert) chez le témoin 1BR3 et chez le mutant de sous-expression de HSP70 après une irradiation de 2 Gy et un temps de réparation égal à 24 heures. Les noyaux sont colorés au Dapi (bleu). Ces images représentent des cellules agrandies 1000 fois. Les flèches vertes indiquent des micronoyaux du mutant siRNA-HSP70 et mettent en évidence les cassures double brin d'ADN qu'ils contiennent (foci  $\gamma$ H2Ax).



**Figure 90)  $\gamma$ H2Ax après 2 Gy et 24 heures (cellules 1BR3-siRNA HSP70), courbes de réparation**

Représentation graphique montrant l'état de phosphorylation de l'histone H2Ax chez le témoin et chez le mutant de sous-expression de HSP70 après une irradiation de 2 Gy.



### **III.3.2- Implication de HSP22 dans les voies de la réparation de l'ADN**

La protéine de choc thermique HSP22 possède un site SQ ; un tel site pourrait être un potentiel site substrat de phosphorylation de certaines kinases de la famille des PI3kinases et notamment de ATM/ATR et de DNA-PK (Sarkaria JN *et al*, 1998 ; Abraham RT, 2004). Auquel cas, HSP22 pourrait être éventuellement impliqué dans les mécanismes de la réparation de l'ADN. L'étude suivante reprend ce fait comme hypothèse de travail tout en cherchant à déterminer plus finement le rôle de HSP22.

#### **III.3.2.1- HSP22 en réponse au stress cellulaire**

##### **III.3.2.1.1- Expression de HSP22 après stress**

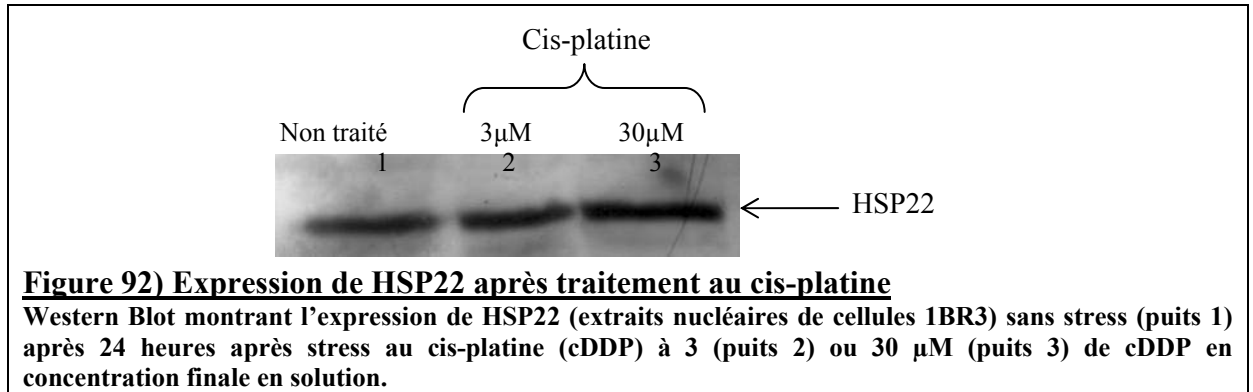
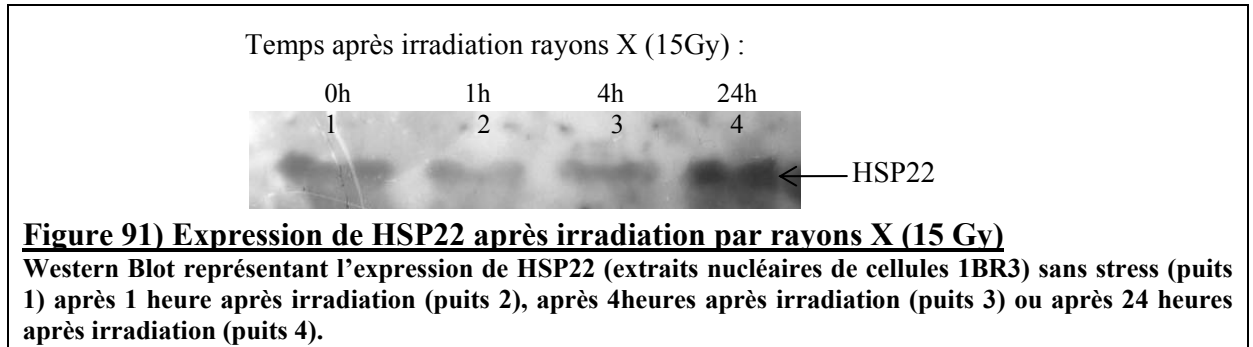
L'expression nucléaire de la protéine de choc thermique humaine HSP22 a été étudiée après différents stress : après irradiation par rayons X (figure 91), après irradiation par UV (tableau 14) et après incubation avec différentes concentrations de cis-platine (figure 92). L'expression nucléaire de HSP22 après une irradiation par rayons X (15 Gy) (figure 91) commence sensiblement à augmenter après un temps de réparation équivalent à 4 heures. Son expression augmente encore pour un temps de réparation équivalent à vingt-quatre heures. L'expression nucléaire de HSP22 après un traitement au cis-platine (3 ou 30  $\mu$ M de concentration finale ; figure 92) croît légèrement en présence d'une forte concentration de cis-platine. D'après les résultats présentés dans le tableau 14, les UV (20 J/m<sup>2</sup>) n'induisent pas l'expression nucléaire de HSP22 (et ce, même pour des temps de réparation longs (c'est-à-dire 2 heures pour les UV)), contrairement à l'irradiation par rayons X ou à l'incubation avec du cis-platine (temps longs de réparation uniquement ou forte concentration, respectivement). Ceci suggère qu'ATR n'est pas responsable de l'augmentation de l'expression de HSP22, étant donné que les rayonnements UV n'impliquent pas de variation dans l'expression nucléaire de cette protéine et que ATR est activée par les UV (Foray N *et al*, 2003).

Remarque : d'après ces premiers résultats, une différence significative, au niveau de l'expression, entre les deux protéines de choc thermique étudiées HSP22 et HSP70 stress inductible, peut être notée. En effet, HSP70, contrairement à HSP22, est surexprimée dans le noyau après rayonnement UV.

##### **III.3.2.1.2- Localisation de HSP22 après stress**

La localisation de HSP22 est étudiée à l'aide d'expériences d'immunofluorescence, dans différentes lignées cellulaires humaines mutées pour certaines protéines de réparation (ATM ou DNA-PK ; figures 93 et 94), après irradiation par rayons X (2 Gy). Seules les photographies correspondant à un temps de réparation égal à 24 heures sont représentées ici. La quantité de HSP22 nucléaire est ensuite représentée en fonction du temps de réparation. D'après les résultats obtenus, une tendance à un déplacement entre le cytoplasme et le noyau directement après irradiation est notée chez le témoin (courbe rouge). Cette navette nucléaire incomplète (puisque HSP22 ne retourne pas dans le cytoplasme après retour aux conditions physiologiques normales) apparaît caractéristique de HSP22. Les mutants ATM et DNA-PK sont caractérisés par un retard et une atténuation dans le déplacement nucléaire de HSP22 (courbes verte et bleue, respectivement).





Traitement	Non traité	cDDP (3μM) (24h)	cDDP (30μM) (24h)	UV (20 J/m <sup>2</sup> ) (2h)	Rayons X (15 Gy) (24h)
Expression de HSP22	++	+++	++++	++	+++++

**Tableau 14) Expression de HSP22 après différents stress (résultats obtenus par Western blots).** Représentation des maximums relatifs obtenus pour l'expression protéique de HSP22 dans des extraits nucléaires de 1BR3 24 heures après plusieurs types de traitements : incubation avec du cis-platine (concentration de cDDP : 3 ou 30μM), irradiation par rayons X ou irradiation par UV.

De plus, la localisation de HSP22, apparaît, tout comme celle de HSP70, être assez dépendante de la présence des protéines de réparation, puisque, dans les lignées mutées pour les protéines de réparation, HSP22 ne présente pas la même localisation que chez le témoin. L'autre chose à noter concernant ces résultats est la présence de foci HSP22 chez le témoin et l'absence de focus chez les mutants ATM et DNA-PK. Les foci, qui apparaissent comme des foyers ronds et bien visibles lors d'une expérience d'immunofluorescence, sont souvent associés à une phosphorylation de protéines (Foster ER et Downs J, 2005).

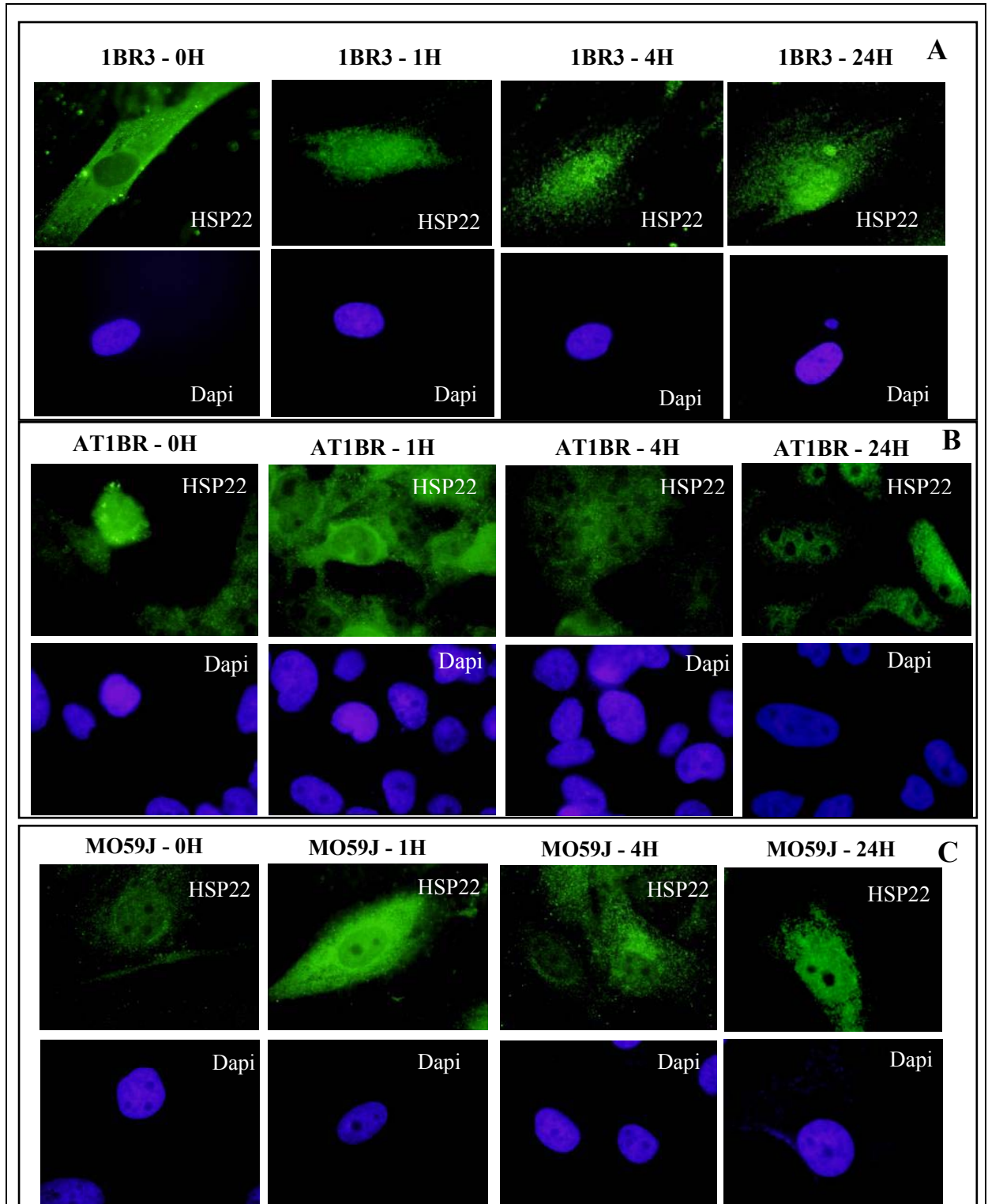
L'impact de la dose d'irradiation reçue par les cellules sur la localisation de la protéine HSP22 a été étudié (figure 95). Après examen des résultats obtenus, il n'apparaît pas de différence significative pour un même temps de réparation entre les différentes doses reçues par les cellules, que ce soit concernant la localisation de HSP22 majoritairement nucléaire, ou le nombre de foci HSP22 par cellule.

Qu'en est-il de la localisation de HSP22 après UV ? D'après l'hypothèse de départ supposant que HSP22 soit, de par sa séquence en acides aminés, un substrat potentiel de ATM, ATR et/ou de DNA-PK, le résultat attendu serait aussi une sorte de navette nucléaire après UV, ce qui renforcerait l'hypothèse que HSP22 soit un substrat de ATM/ATR (et plus particulièrement de ATR).

La cinétique de la figure 96 obtenue après irradiation par rayonnement UV (20 J/m<sup>2</sup>) est résumée graphiquement (figure 97). Plusieurs éléments de ces résultats sont à souligner. HSP22 ne réalise pas de déplacement après UV et reste cytoplasmique. HSP22 ne forme pas de focus après UV. HSP22 n'apparaît pas du tout être activée par les UV, contrairement, aux rayons X. Ceci suggère que HSP22 est activée par phosphorylation, probablement, puisqu'il y a une formation de foci lorsque HSP22 se déplace. Ceci sous-entend également qu'ATR n'active pas HSP22. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Western Blots au paragraphe précédent. ATM pourrait, par contre, activer HSP22, de même que DNA-PK, puisque ces deux kinases sont elles-mêmes activées par le rayonnement X et semblent nécessaires à la navette nucléaire incomplète réalisée par HSP22 (Foray N *et al*, 2003 ; Lobrich M et Jeggo PA, 2004). En effet, leur absence s'accompagne d'un retard significatif et d'une atténuation du phénomène de navette nucléaire (figure 94).

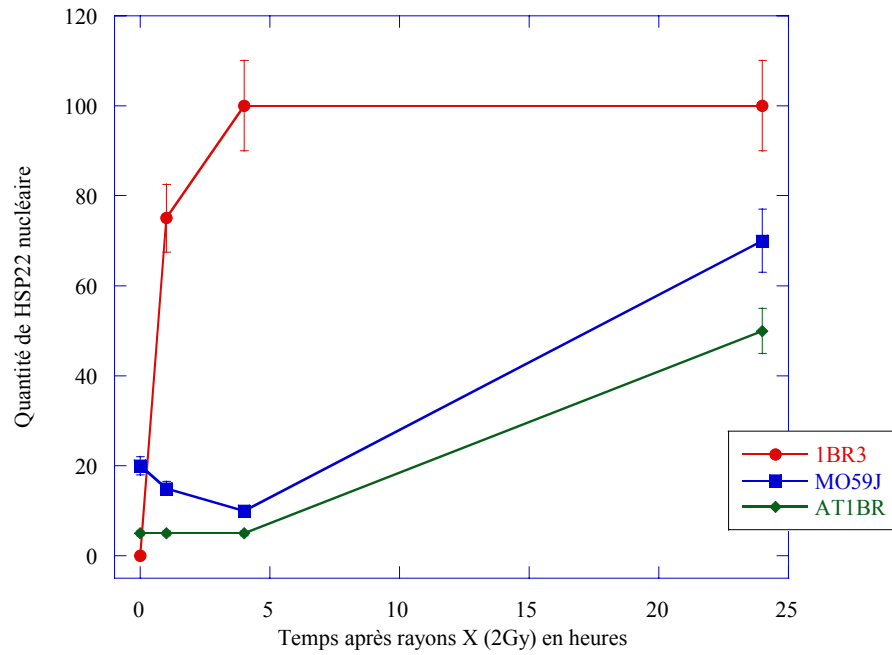
La localisation de HSP22 a été testée après d'autres types de stress que les radiations ionisantes : le stress au cis-platine et le stress au nitrate de plomb Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. La figure 98 représente l'évolution de la fraction nucléaire de HSP22 par rapport à la fraction totale en fonction du traitement subi par les cellules (le temps de réparation, en présence du stress, en fixé à vingt quatre heures). Après 24 heures d'exposition au traitement, seule une fraction modérée de HSP22 est nucléaire dans les cellules témoin 1BR3. De plus, il n'a pas été observé de foci. HSP22 serait donc peu activé par cis-platine et nitrate de plomb, même si, concernant le cis-platine, une augmentation de l'expression de HSP22, croissante avec la concentration, a pu être observée.

De nouvelles expériences ont ensuite été réalisées pour comparer le nombre de foci HSP22 en fonction de la dose d'irradiation reçue (rayonnement X, 2 ou 15 Gy) par les cellules 1BR3 (figures 99, 100 et 101). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 15.



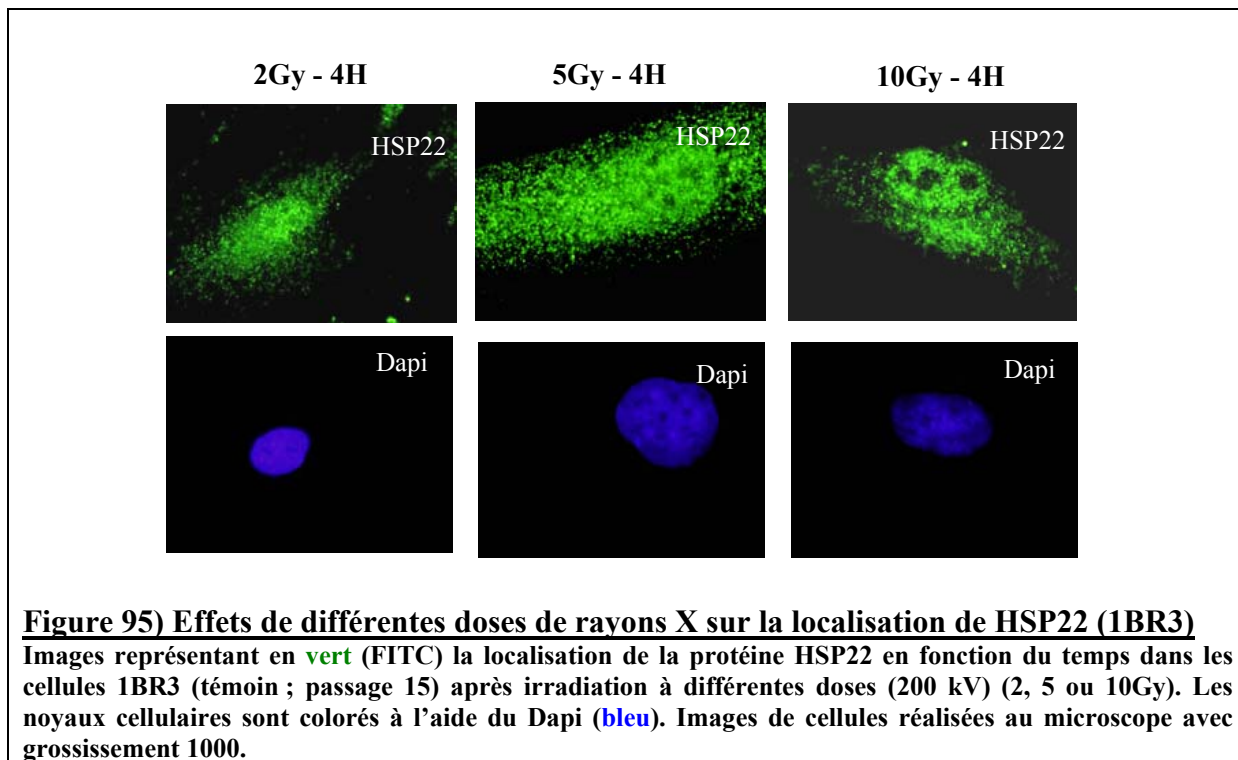
**Figure 93) Localisation de HSP22 après rayons X (2Gy)**

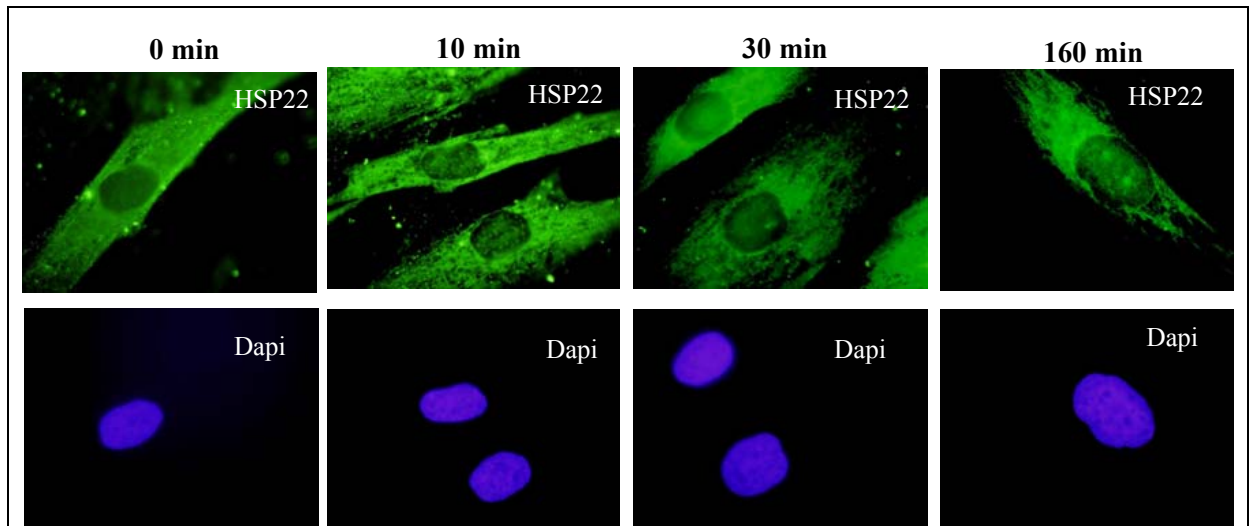
Images représentant en vert (FITC) la localisation de la protéine HSP22 (A : cellules 1BR3 : témoin à passage 15 ; B : AT1BR : muté ATM<sup>-/-</sup> ; C : MO59J : muté DNA-PK<sup>-/-</sup>) après une irradiation de 2Gy. Le temps de réparation est indiqué au dessus des images. Les noyaux cellulaires sont localisés à l'aide du Dapi (bleu). Images de cellules prises au microscope optique à fluorescence, grossissement 1000.



**Figure 94) Localisation de HSP22 après rayons X (2Gy)**

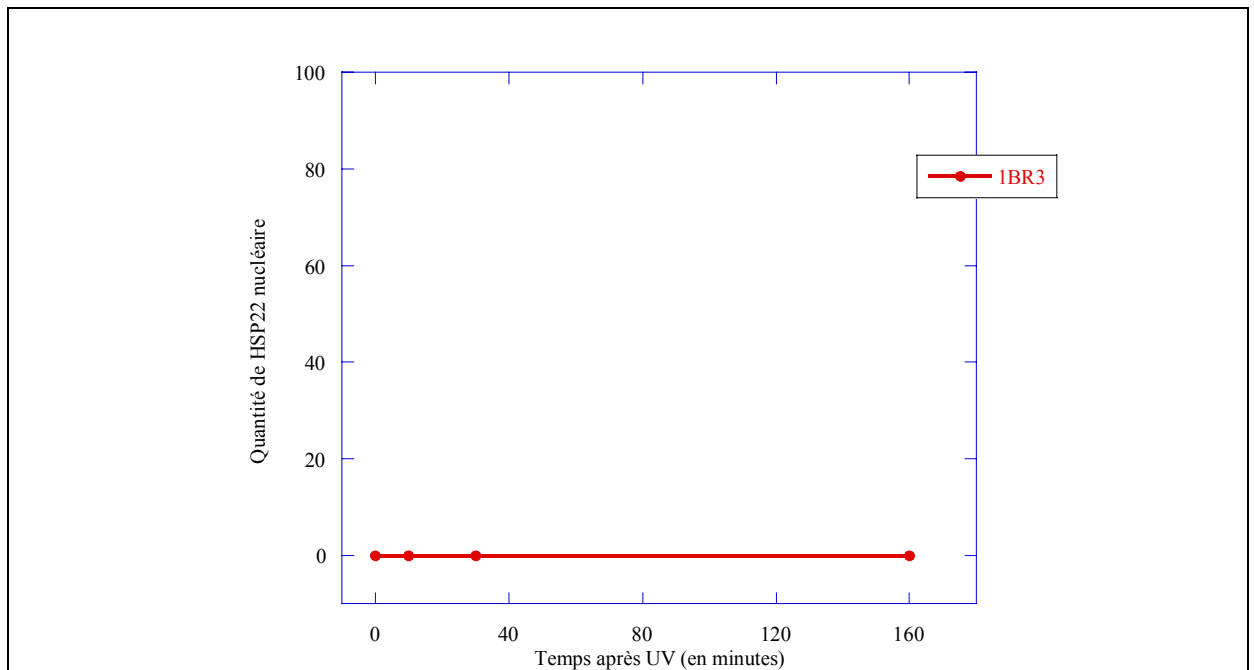
Représentation graphique de la localisation nucléaire de la protéine HSP22 en fonction du temps dans les cellules correspondantes (**rouge** : cellules 1BR3 : témoin ; **vert** : AT1BR : muté ATM<sup>-/-</sup> ; **bleu** : MO59J : muté DNA-PK<sup>-/-</sup>) après une irradiation avec une dose de 2Gy.





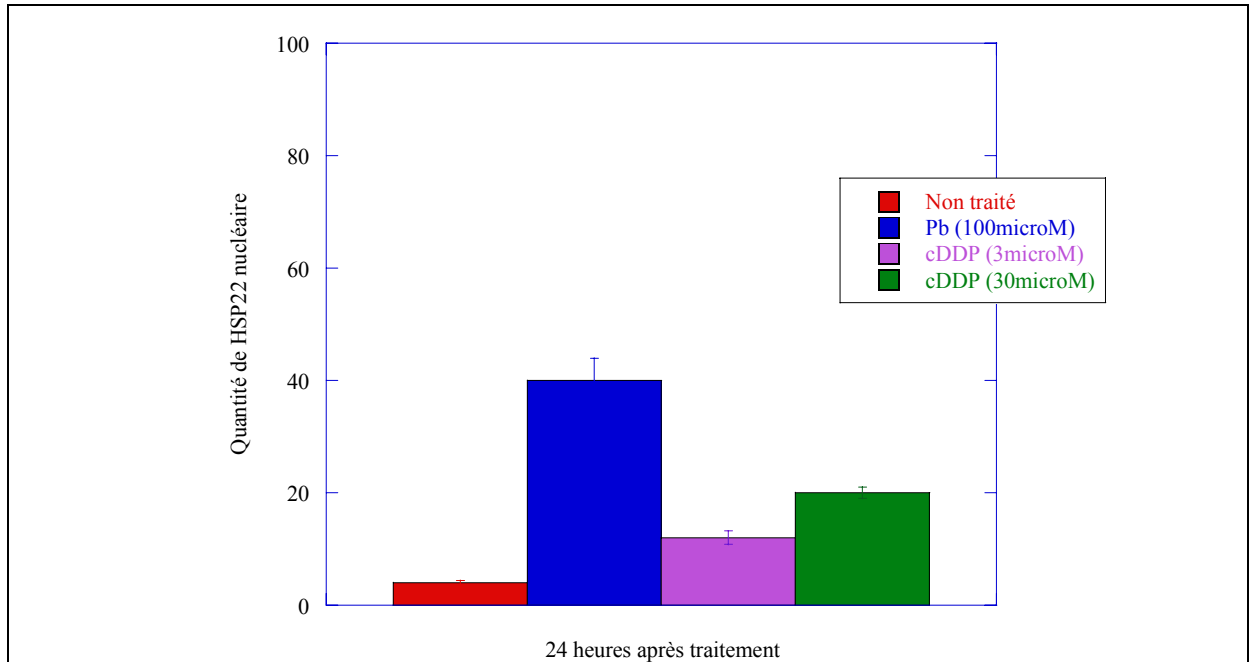
**Figure 96) Localisation de HSP22 après UV ( $20\text{J/m}^2$ )**

Images montrant en vert (FITC) la localisation de la protéine HSP22 (cellules 1BR3 témoin, passage 15) après un traitement aux UV ( $20\text{ J/m}^2$ ). Les temps de réparation, c'est-à-dire les temps pendant lesquels les cellules sont laissées maintenues dans du milieu complet, à  $37^\circ\text{C}$  ; 5% de  $\text{CO}_2$ , sont indiqués au dessus des photographies. Les noyaux cellulaires sont colorés à l'aide du Dapi (bleu). Images représentant des cellules agrandies 1000 fois.

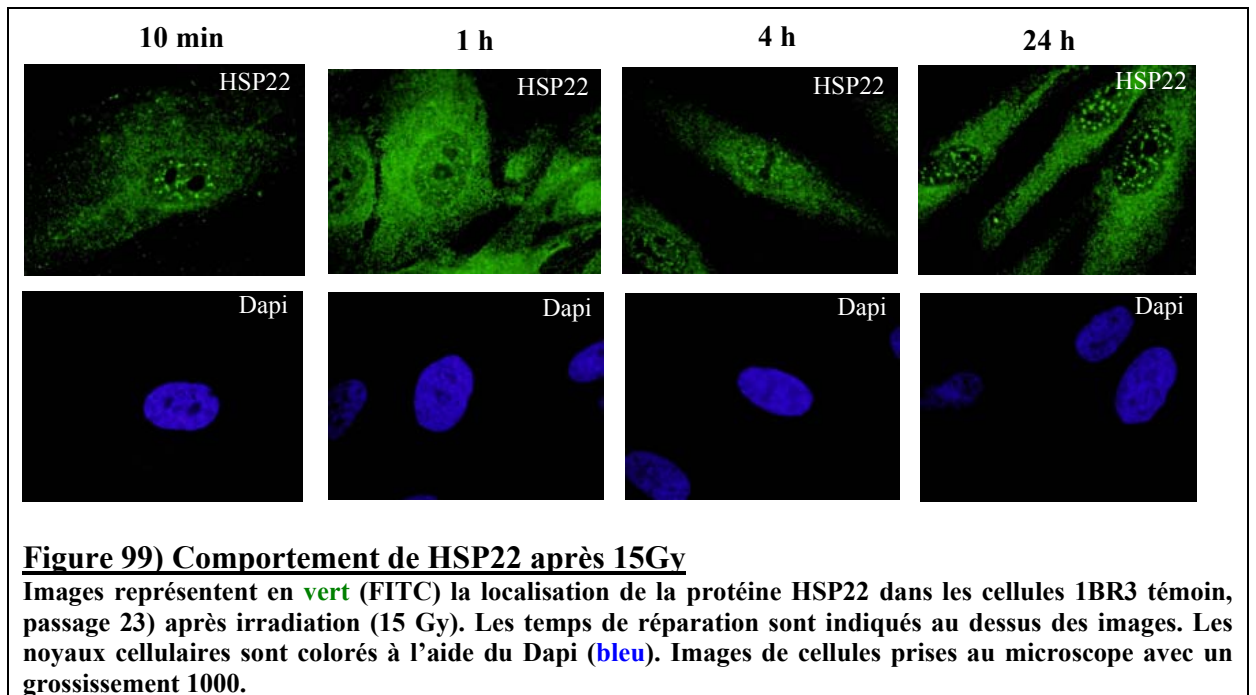


**Figure 97) Localisation de HSP22 après UV ( $20\text{J/m}^2$ )**

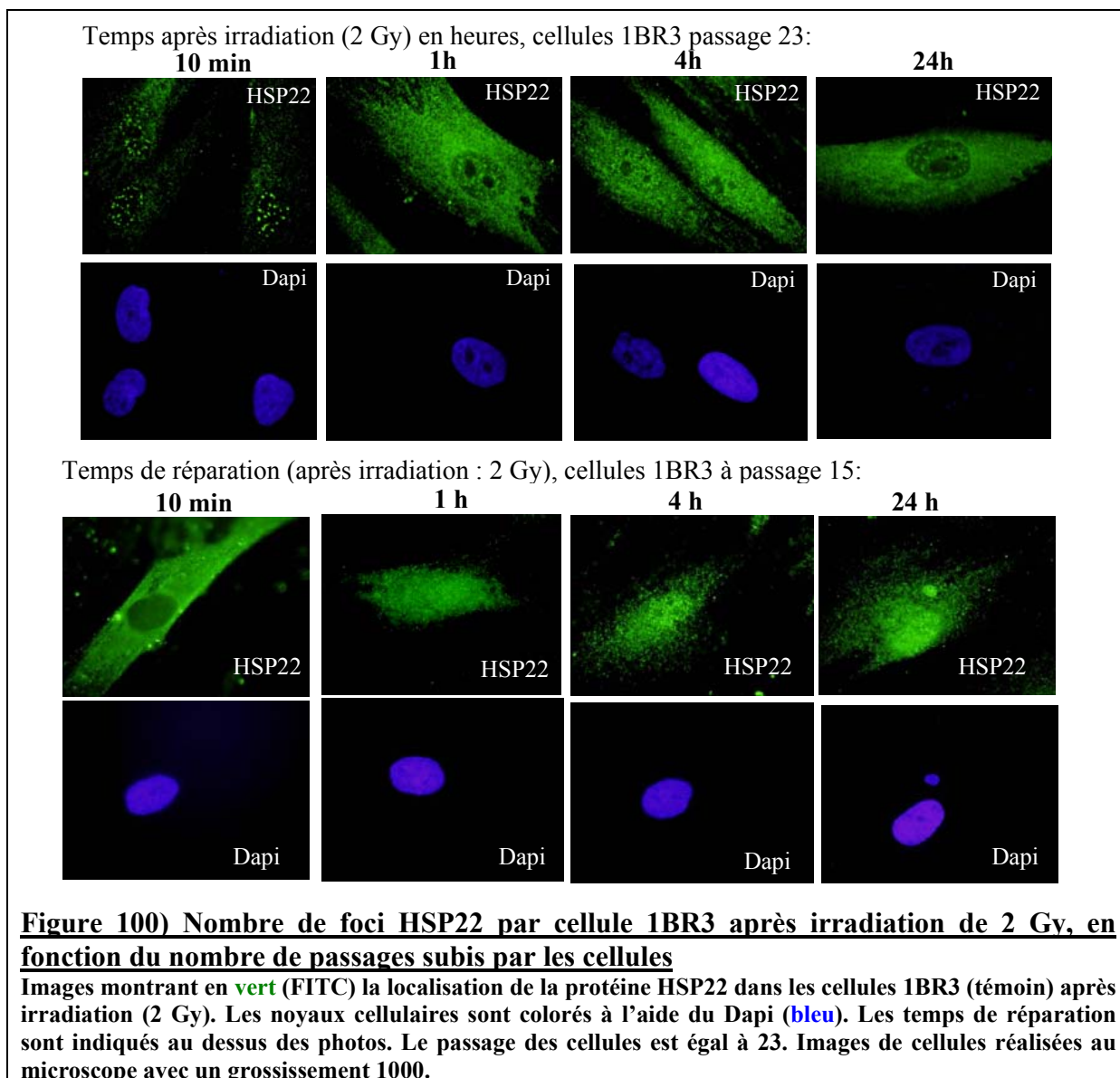
Représentation graphique de la localisation de la protéine HSP22 en fonction du temps de réparation dans les cellules 1BR3 (témoin ; rouge) après un traitement aux UV ( $20\text{ J/m}^2$ ).



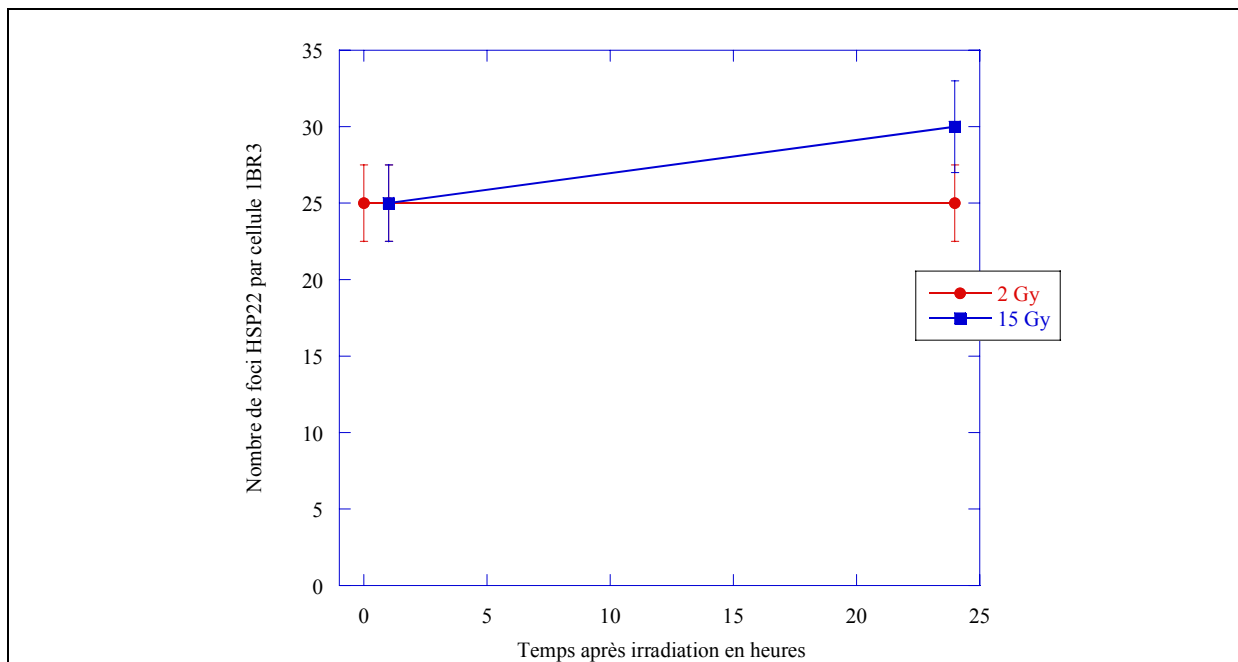
**Figure 98) Localisation de HSP22, 24heures après différents traitements ( $Pb(NO_3)_2$  (100 $\mu$ M) ou cis-platine (3 $\mu$ M ou 30 $\mu$ M))**  
 Diagramme représentant la localisation nucléaire de la protéine HSP22 en fonction des différents traitements, après 24 heures de réparation.



**Figure 99) Comportement de HSP22 après 15Gy**  
 Images représentent en vert (FITC) la localisation de la protéine HSP22 dans les cellules 1BR3 témoin, passage 23) après irradiation (15 Gy). Les temps de réparation sont indiqués au dessus des images. Les noyaux cellulaires sont colorés à l'aide du Dapi (bleu). Images de cellules prises au microscope avec un grossissement 1000.







**Figure 101) Nombre de foci HSP22 par cellule 1BR3 après irradiation de 2 ou 15 Gy (passage=23)**

Représentation graphique du nombre foci HSP22 en fonction du temps de réparation dans les cellules 1BR3 (témoin) après irradiation (2 ou 15 Gy) pour un même passage (p=23).

Temps après irradiation	2 Gy	15 Gy
0 h	10±1	Non déterminé
1 h	25±2,5	25±2,5
4 h	Non déterminé	Non déterminé
24 h	25±2,5	30±3

**Tableau 15) Nombre de foci HSP22 par cellule 1BR3 après irradiation de 2 ou 15 Gy.**

Tableau indiquant le nombre foci HSP22 obtenus en fonction du temps, dans les cellules 1BR3 (témoin) prises à *passage 23*, après irradiation (2 ou 15 Gy).

Les expériences réalisées concernant le comptage de foci dans les cellules 1BR3 avec différentes doses suggèrent que le nombre de foci HSP22 n'est pas dépendant de la dose délivrée aux cellules. Néanmoins, il faut noter deux choses :

La première : le temps de réparation influe sensiblement sur le nombre de foci HSP22

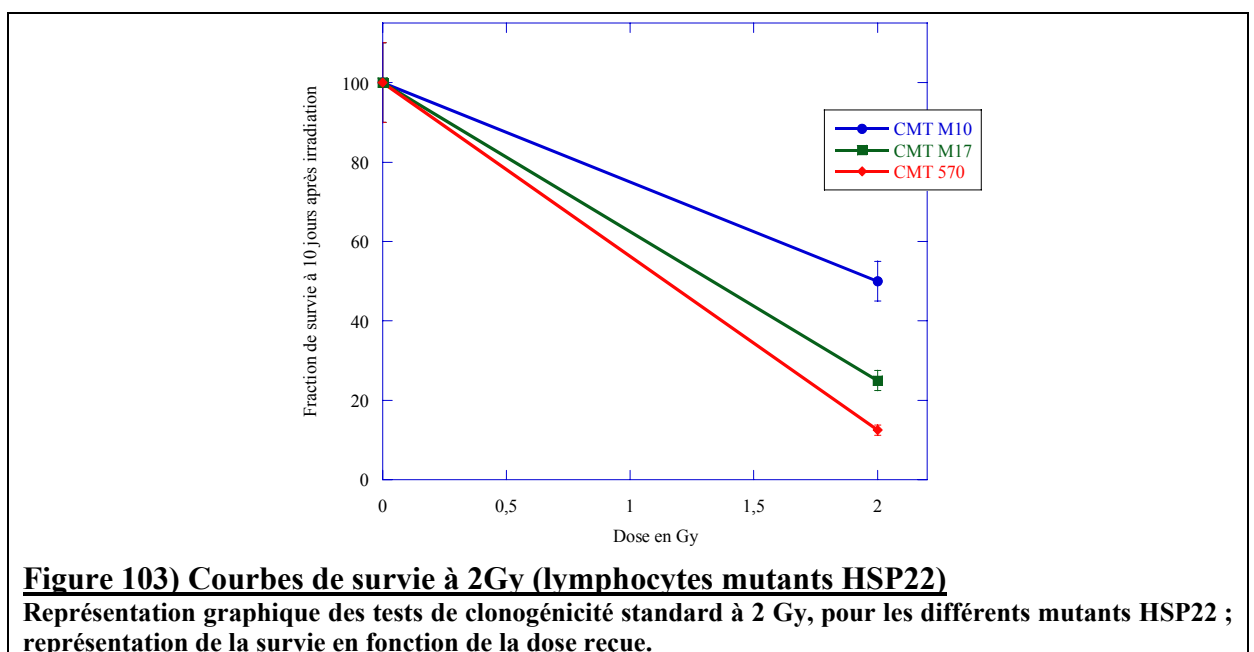
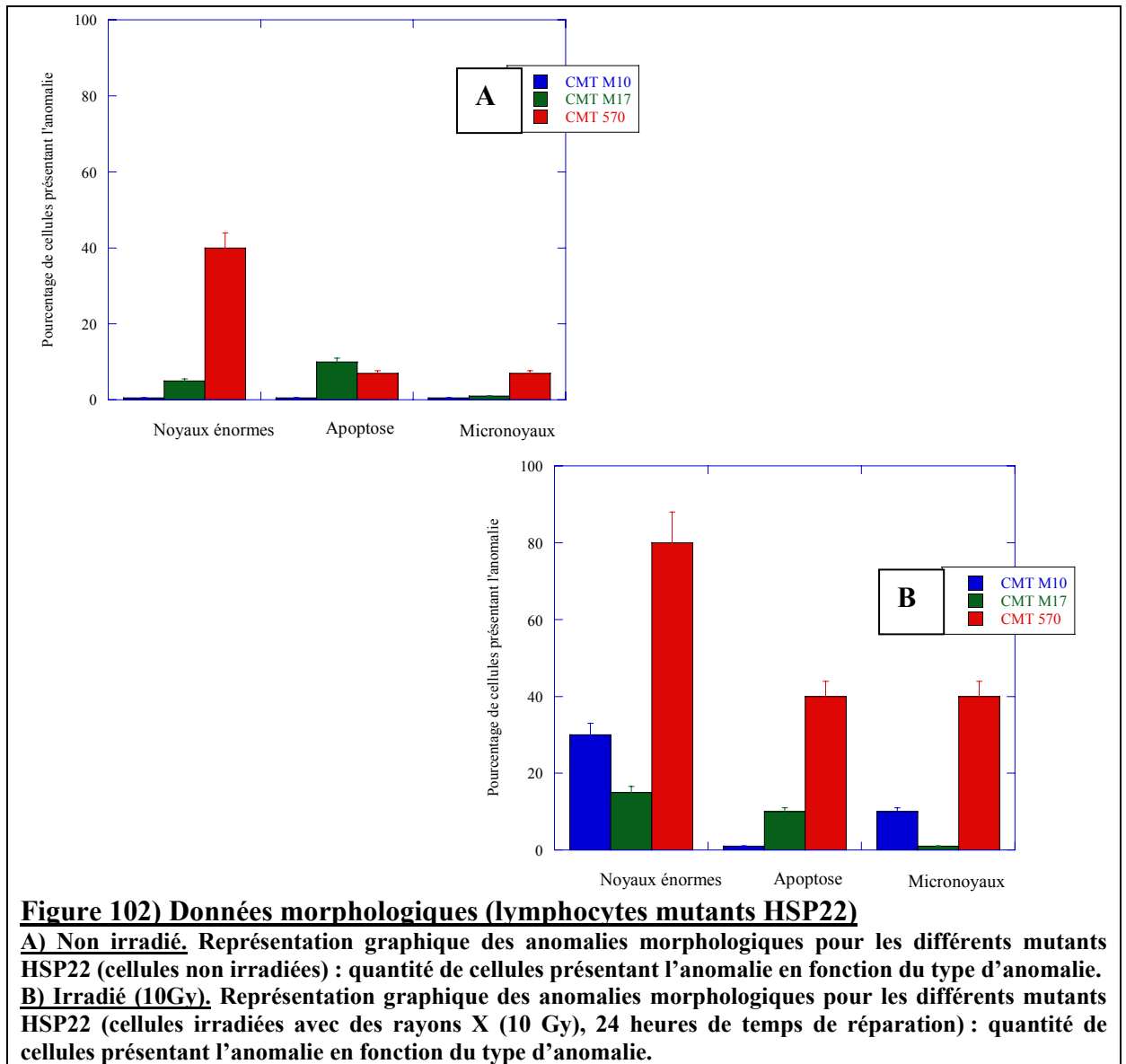
La deuxième : l'âge des cellules, c'est-à-dire le nombre de passages, paraît influencer, lui aussi, sur le nombre et la vitesse d'apparition des foci HSP22. En effet, ces derniers apparaissent plus précocement après irradiation et en nombre plus important si les cellules en sont à un passage élevé. Ceci est en accord avec certaines données de la littérature puisqu'il a été récemment montré que l'homologue drosophilien de HSP22 avait un impact sur le vieillissement chez les drosophiles : son absence réduit significativement la durée de vie de ces mouches (Morrow G *et al*, 2004). HSP22 pourrait éventuellement jouer un rôle similaire chez l'Homme.

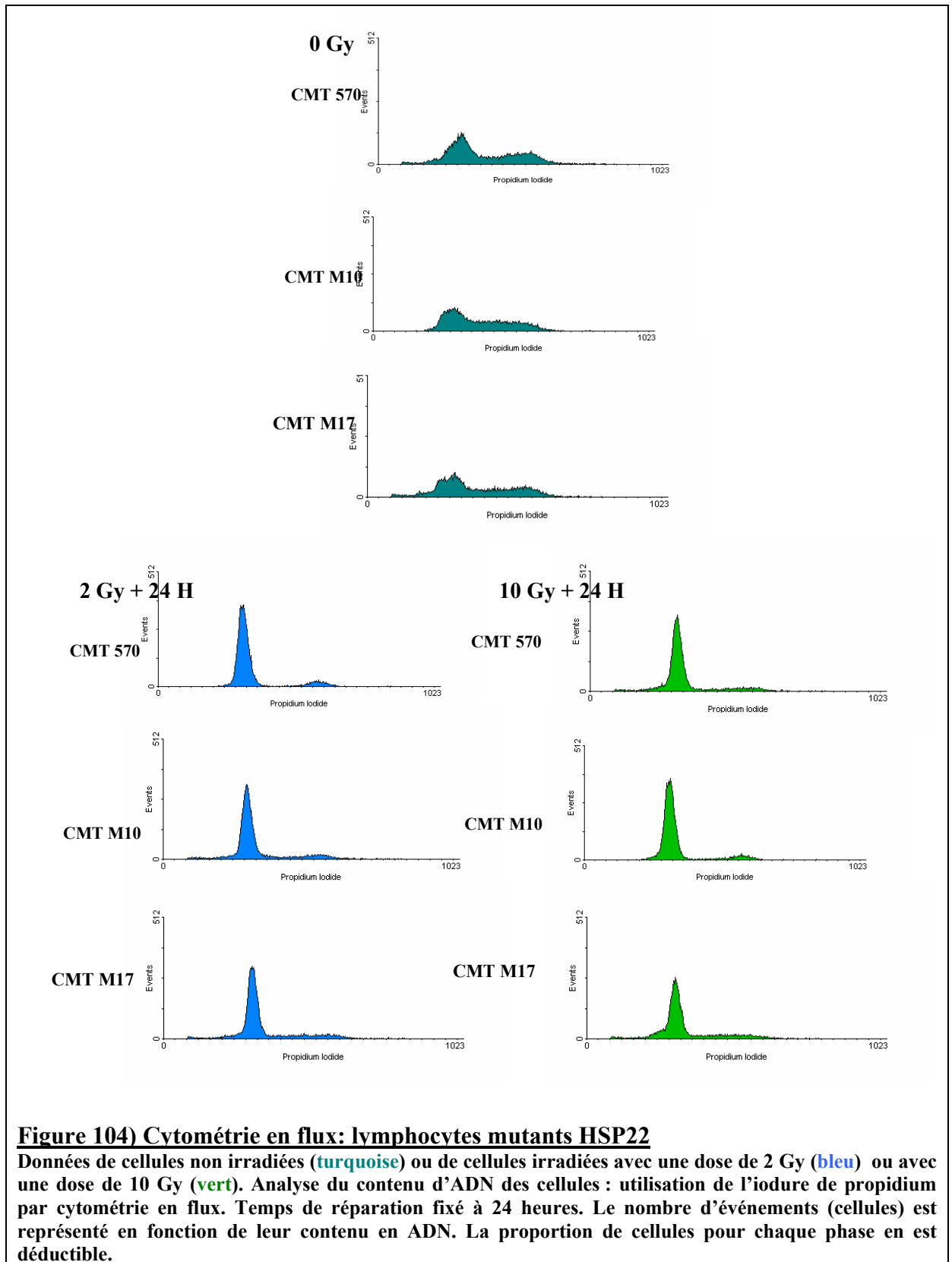
En considérant plus particulièrement le nombre de foci (figure 100), des différences significatives sont observées pour une même dose (2Gy) et un même type cellulaire (les fibroblastes témoins 1BR3) si le nombre de passages subi par les cellules diffère. Les fibroblastes de peau 1BR3 sont ici à un passage relativement élevé ( $p=23$ ), contrairement aux expériences précédentes ( $p=15$ ). L'observation de ces images montre que les foci sont présents directement après irradiation, contrairement à précédemment où ils n'apparaissent qu'à partir d'un temps de réparation équivalent à quatre heures.

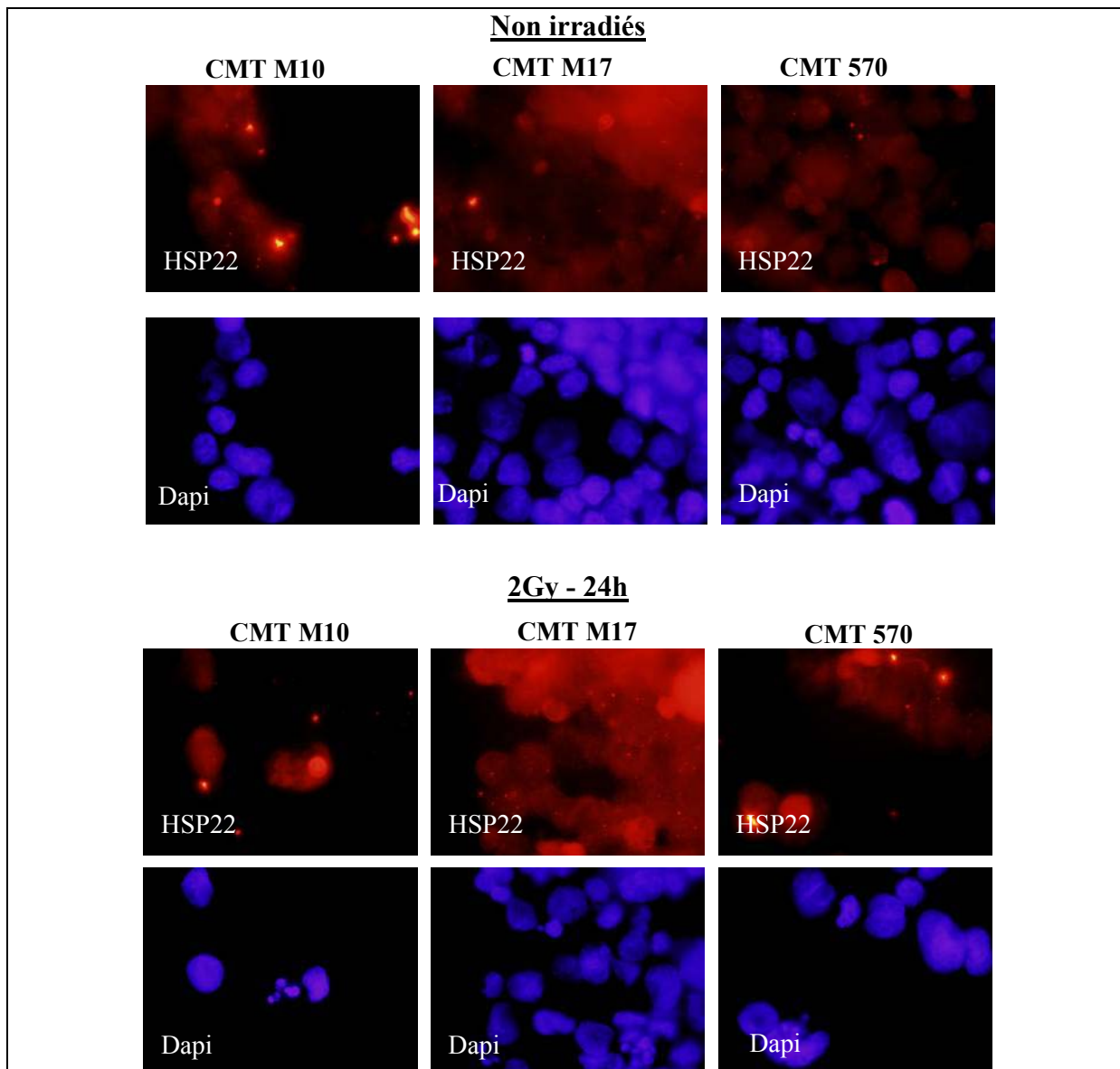
L'influence de la dose sur le foci HSP22 par cellule est indiquée figure 101, pour deux doses différentes 2 et 15 Gy. Les fibroblastes 1BR3 sont pris au même passage ( $p=23$ ). D'après ce graphique, le nombre de foci HSP22 apparaît plus lié à la l'âge des cellules qu'à la dose reçue puisque les résultats obtenus sont non significativement différents (les barres d'erreur se recourent).

### **III.3.2.1.3- Etude des mutants HSP22**

Cette étude de HSP22 a pu être complétée par l'analyse de plusieurs mutants provenant de patients atteints de dystrophies motrices, c'est-à-dire présentant des défauts de motricité d'origine nerveuse. Il a été montré que, très probablement, une mutation de la protéine HSP22 provoquait ces maladies (Irobi J *et al*, 2004). Ces mutants HSP22 ont été fournis par le Pr Vincent Timmerman de l'université d'Anvers (Belgique). Ces lignées mutantes sont d'origine lymphocytaire et rendues immortelles par l'utilisation du virus EBV (Epstein Barr virus). CMT M10 et CMT M17 portent la même mutation (K141N) responsable de la neuropathie motrice distale héréditaire de type II. Ces deux lignées proviennent d'individus différents. CMT 570 est une lignée comportant une autre mutation (R78M). Le patient dont provient cette lignée est atteint d'un autre type de dystrophie motrice, la maladie de Charcot-Marie-Tooth. Ces lignées mutantes ont, tout d'abord, été étudiées d'un point de vue morphologique sans irradiation (figure 102 A) puis avec irradiation (figure 102 B) (2 Gy). D'après le graphique de la figure 102 A, la lignée CMT 570 se distingue des autres par un accroissement considérable du nombre de noyaux énormes et de micronoyaux. Après une irradiation de 2 Gy (figure 102 B), là encore, la mutation CMT 570 présente le plus d'anomalies, toutes catégories confondues. Donc, d'après ces résultats, la mutation R78M entraîne un surcroît de problèmes morphologiques (gonflement des noyaux, apoptose accrue et augmentation du nombre de micronoyaux), par rapport à la mutation K141N(/E), en cas d'irradiation par rayons X. Ceci ne peut pas s'expliquer par l'endroit touché par la mutation puisque la mutation portée la lignée CMT 570 n'est pas située dans le domaine  $\alpha$ -cristallin mais dans un domaine moins important pour la protéine, contrairement à l'autre mutation K141N(/E) qui elle se situe dans le domaine  $\alpha$ -cristallin (voir annexe I-e et chapitres II-3).







**Figure 105) Localisation de HSP22 chez les lymphocytes mutants HSP22 après irradiation**

Données obtenues pour cellules sans stress (images au dessus) ou 24 heures après irradiation (2 Gy) avec une source conventionnelle (200 kV) (images au dessous). Les lignées correspondantes sont précisées au dessus des images. HSP22 est localisé en TRITC rouge, et les noyaux cellulaires sont colorés à l'aide du Dapi (bleu). Ces images représentent des cellules agrandies 1000 fois.

Après irradiation, la lignée CMT M10 montre plus de noyaux surdimensionnés et plus de micronoyaux que la lignée CMT M17, alors qu'elles présentent toutes les deux la même mutation. Néanmoins, les taux d'apoptose de la lignée CMT M17 restent plus élevés dans les deux cas de figure (avec et sans irradiation). A priori la lignée CMT 570 pourrait être plus radiosensible que les deux autres lignées. Par la suite, des tests de clonogénicité standard ont été réalisés sur ces lignées lymphocytaires pour déterminer leurs radiosensibilités respectives (figure 103). Les résultats ont été interprétés comme décrits dans le chapitre III-2.

Remarque : les courbes de survie sont toujours représentées par des droites pour les cellules de type lymphocytaire.

D'après ces résultats, il apparaît que c'est bien, effectivement, la lignée CMT 570 qui est la plus radiosensible. CMT M17 paraît avoir une radiosensibilité intermédiaire et CMT M10 présente un phénotype plutôt radiorésistant.

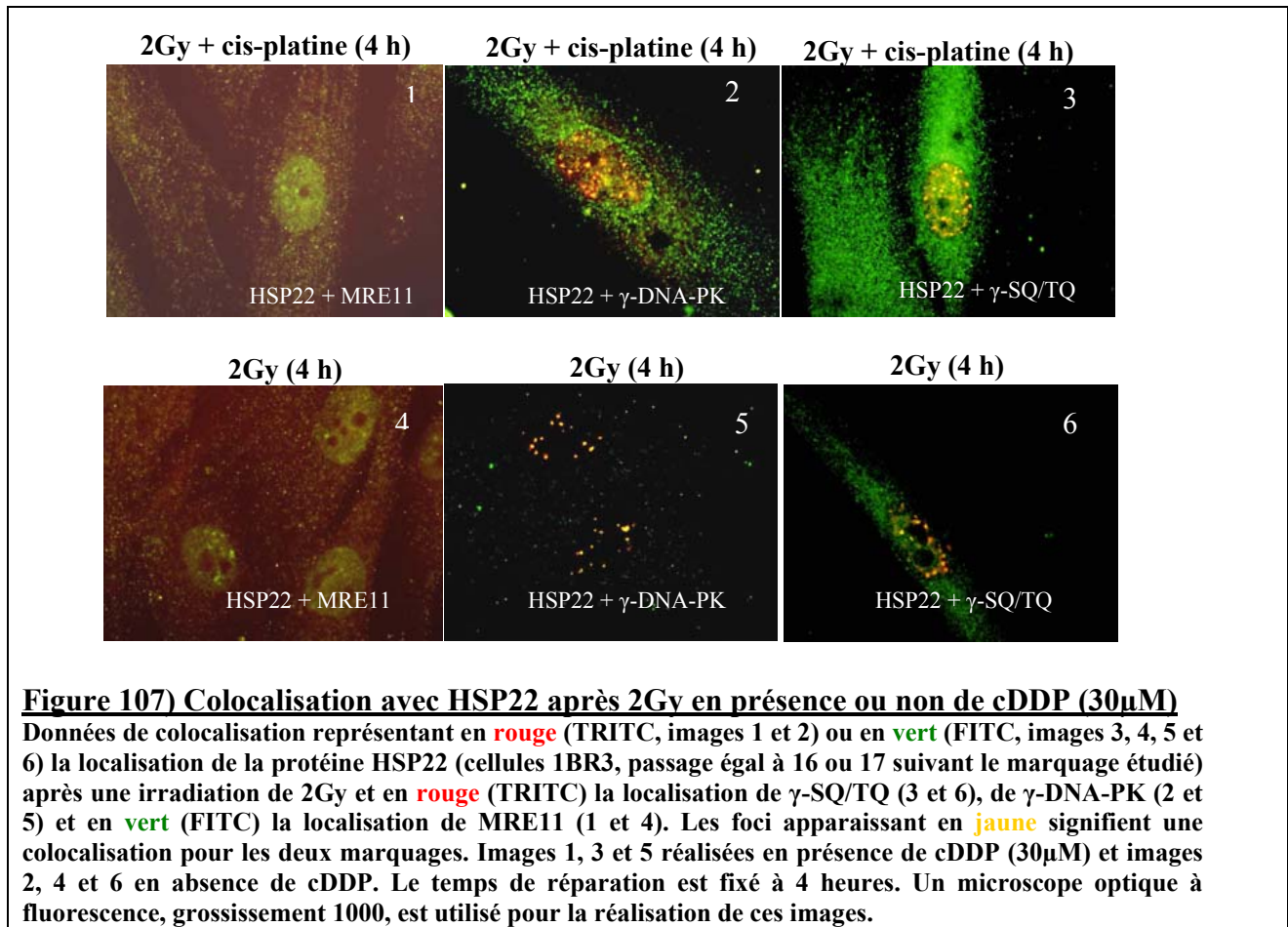
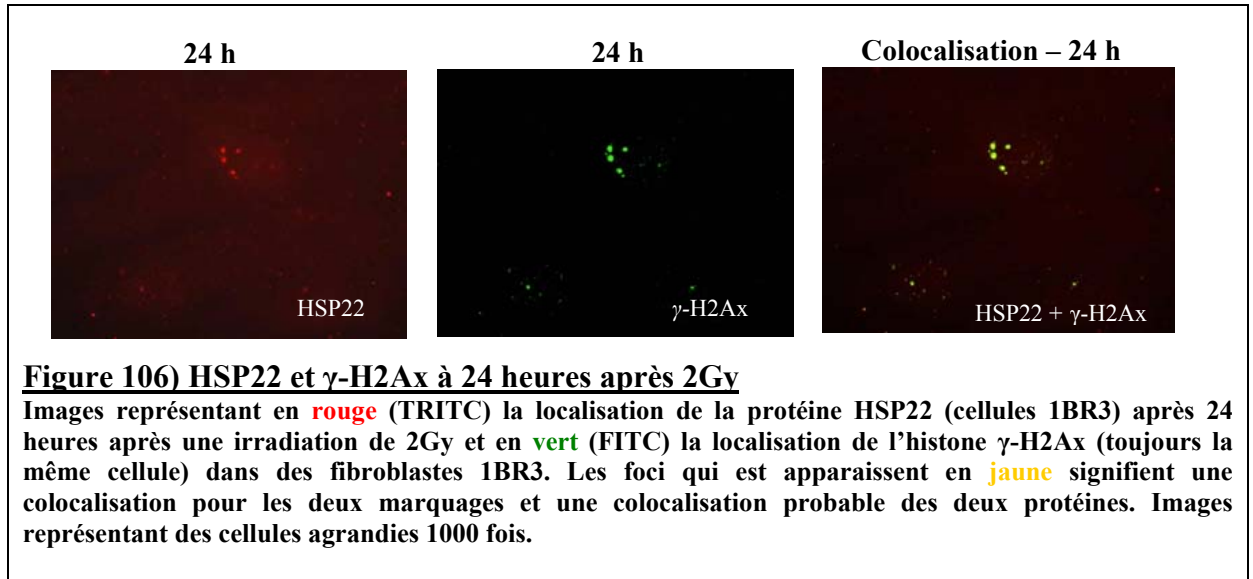
Des expériences d'analyse de cycle cellulaire furent ensuite réalisées sur ces mutants HSP22, sans irradiation et après irradiation (2 Gy et 10 Gy) (figure 104). Toutes ces cellules présentent à l'état non irradié une forte proportion de cellules correspondant au stade S de synthèse de l'ADN, ce qui sous entend que ce sont des cellules qui prolifèrent. D'après les résultats obtenus après irradiation, un arrêt bien marqué en phase  $G_0/G_1$  est notable. Cet arrêt dépend plutôt de l'irradiation que de la dose reçue puisque le pic (correspondant à la proportion de cellules dont le contenu en ADN se trouve dans le stade  $G_0/G_1$ ) n'apparaît pas plus (ni moins) marqué après une irradiation de 2 Gy que de 10 Gy. Un arrêt du cycle cellulaire en phase  $G_0/G_1$  après irradiation par rayonnement X est synonyme de p53 fonctionnelle (Siles E *et al*, 2006) ; ceci suggère que le statut de p53 est normal dans les lymphocytes mutants HSP22.

La localisation de HSP22 chez les lymphocytes mutants HSP22 est présentée figure 105. Ces images ne montrent pas de foci visibles. Néanmoins une intensification sensible du marquage pour HSP22 est observée après irradiation et notamment dans le noyau.

### **III.3.2.2- Colocalisation de HSP22 avec les protéines de réparation après irradiation par rayons X**

#### **III.3.2.2.1- Problème technique posé par la colocalisation de marquage en immunofluorescence**

Pour poursuivre cette étude, des colocalisations par immunofluorescence ont été réalisées. Leur interprétation se révèle délicate puisque les spectres d'émission des fluorochromes FITC et TRITC se recoupent et ceci crée parfois des artéfacts lors d'expériences de colocalisation par immunofluorescence (chapitre III.2). Ainsi, seules les données ayant été vérifiées par immunofluorescence simple sont montrées ici. La figure 106 montre le danger de l'expérience de co-immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-phospho-histone H2Ax. Au vu des résultats obtenus pour la colocalisation avec l'utilisation de cet anticorps au chapitre précédent, il est impossible de conclure fermement à une colocalisation pour les deux protéines (HSP22 et  $\gamma$ -H2Ax) après irradiation.



### III.3.2.2.2- Impact du cis-platine associé à l'irradiation sur la colocalisation

Le cis-platine (ou cDDP) a-t-il un impact quelconque lorsqu'il est associé à l'irradiation sur la localisation de HSP22 ? La figure 107 et le tableau 16 regroupent les résultats obtenus (images puis résumé sous forme de tableau). Certaines protéines de réparation sont ici testées en colocalisation avec HSP22 et notamment une nucléase impliquée dans la recombinaison homologe (MRE11) et une protéine kinase impliquée dans la suture (DNA-PK).

Remarque : les cellules sont d'un passage assez faible, il n'y a pas de foci HSP22 pour les temps de réparation correspondants à 10 minutes ni à 1 heure.

<b>Irradiation + cDDP (30µM)</b>	<b>2Gy + 10min</b>	<b>2Gy + 1H</b>	<b>2Gy + 4H</b>
<b>γ-DNA-PK / HSP22</b>	-	-	19±2
<b>γ-SQ/TQ / HSP22</b>	-	-	20± 2
<b>MRE11 / HSP22</b>	-	-	15±3
<b>Irradiation seule</b>	<b>2Gy + 10min</b>	<b>2Gy + 1H</b>	<b>2Gy + 4H</b>
<b>γ-DNA-PK/ HSP22</b>	-	-	21±2
<b>γ-SQ/TQ / HSP22</b>	-	-	20±2
<b>MRE11 / HSP22</b>	-	-	20±3

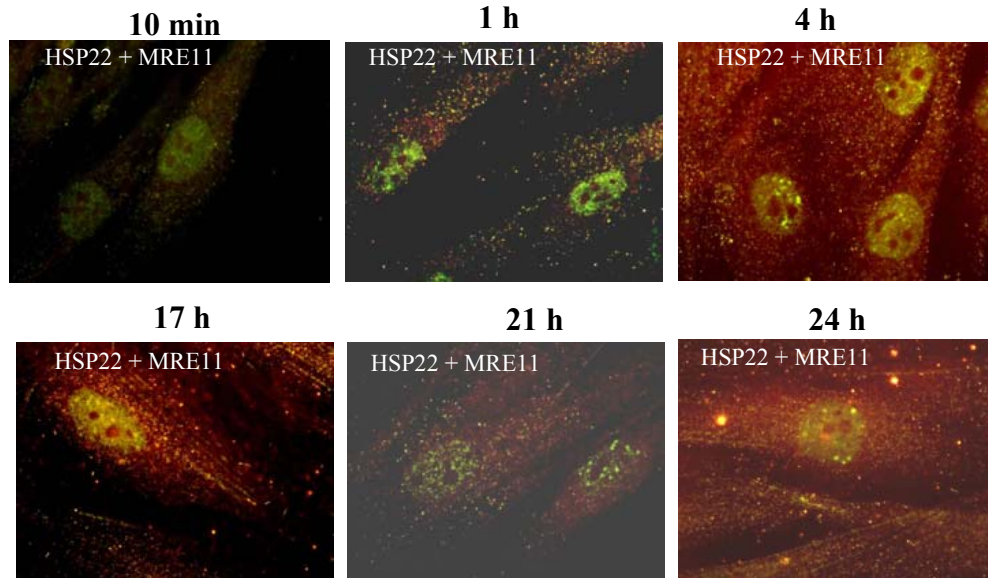
**Tableau 16) Colocalisation de HSP22 et d'enzymes de réparation de l'ADN (γDNA-PK et MRE11); preuve de la phosphorylation de HSP22 sur son site SQ (résultats obtenus par immunofluorescence). Nombre de foci HSP22 colocalisés dans les cellules 1BR3 (témoin) en fonction du temps de réparation après irradiation (2 Gy), avec ou sans cDDP (30µM).**

D'après les résultats obtenus, HSP22 colocalise avec γ-DNA-PK et avec MRE11 après irradiation (après un temps de réparation de 4 heures et plus). HSP22 est un partenaire protéique potentiel de ces deux protéines de réparation. En effet, les foci nucléaires, formés pour chaque protéine, colocalisent parfaitement et apparaissent colorés en jaune (vert + rouge).

Pour expliquer la colocalisation de HSP22 avec γ-SQ/TQ, il faut simplement noter que seul un site correspond sur HSP22 : la Ser<sup>190</sup>, ce qui signifie que la formation de foci HSP22 correspond bien à une phosphorylation de cette sérine précise. HSP22 est donc vraisemblablement phosphorylée, après irradiation par rayons X, sur son unique site SQ (voir figure 107, photo 6). Cette phosphorylation est donc soit réalisée par ATM, soit par DNA-PK (phosphorylation du site xxxSQxxx ; Abraham RT, 2004).

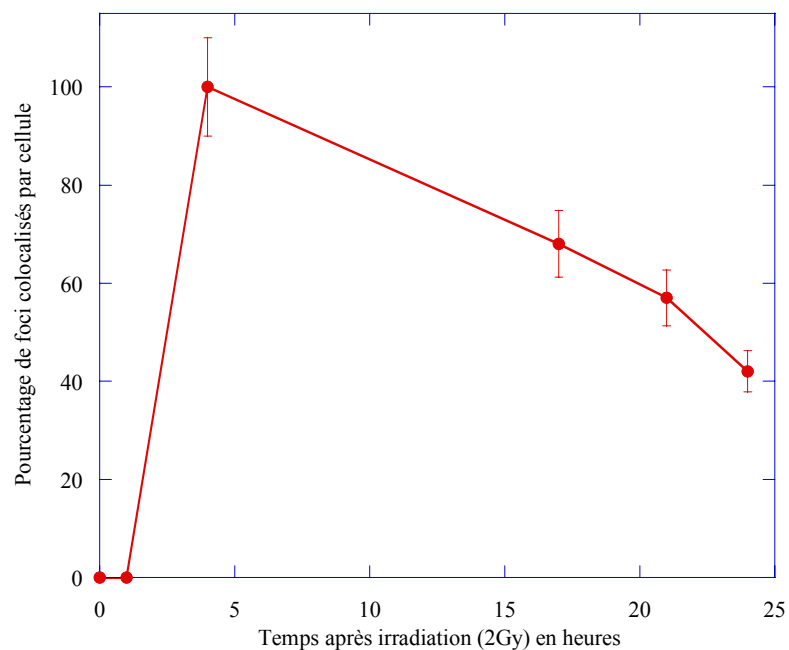
L'incubation avec du cis-platine (cDDP) n'augmente pas le nombre de foci HSP22 obtenus. Les figures 108 et 109 représentent une cinétique de colocalisation MRE11/HSP22 plus complète après irradiation seule (par rayonnement X (2 Gy)). Pour le graphique 109, le nombre de foci représenté a été déterminé par comptage directement sous microscope. Tous les foci observés (uniquement nucléaires) colocalisent.





**Figure 108) Colocalisation de MRE11 et de HSP22 dans des cellules 1BR3 après irradiation (2Gy)**

Images représentant en vert (FITC) la protéine MRE11 et en rouge (TRITC) la protéine HSP22 après irradiation (2 Gy) dans les cellules témoins 1BR3. Colocalisation pour HSP22 et MRE11 correspondant à la coloration jaune. Temps de réparation indiqués au dessus des images. Grossissement du microscope utilisé pour l'obtention de ces images : 1000.



**Figure 109) Colocalisation de MRE11 et de HSP22 dans des cellules 1BR3 après irradiation (2Gy)**

Représentation graphique du pourcentage de foci colocalisés pour HSP22 et MRE11 en fonction du temps de réparation dans les cellules 1BR3 (témoin) après irradiation (2 Gy).

Le nombre de foci finit par décroître avec l'allongement du temps de réparation, ce qui sous-entend que les conditions physiologiques reviennent lentement à la normale. MRE11 s'active normalement directement après formation des cassures double brin donc immédiatement irradiation (dans les 10 minutes ; Lavin MF, 2004). HSP22 et MRE11 agiraient donc simultanément et éventuellement dans la même voie de réparation. Ceci suggère une implication de HSP22 dans la réparation par recombinaison homologue en plus de la réparation par suture via DNA-PK (Lindahl T et Wood RD, 1999) qui phosphoryle probablement HSP22. HSP22 est potentiellement impliquée dans la réparation des cassures double brin de l'ADN, et des cassures double brin seulement (puisque elles-mêmes n'impliquent que les voies de réparation par suture et par recombinaison homologue).

### **III.3.2.3- Combinaison de l'effet du cis-platine et de l'irradiation X, impact sur la réponse HSP22**

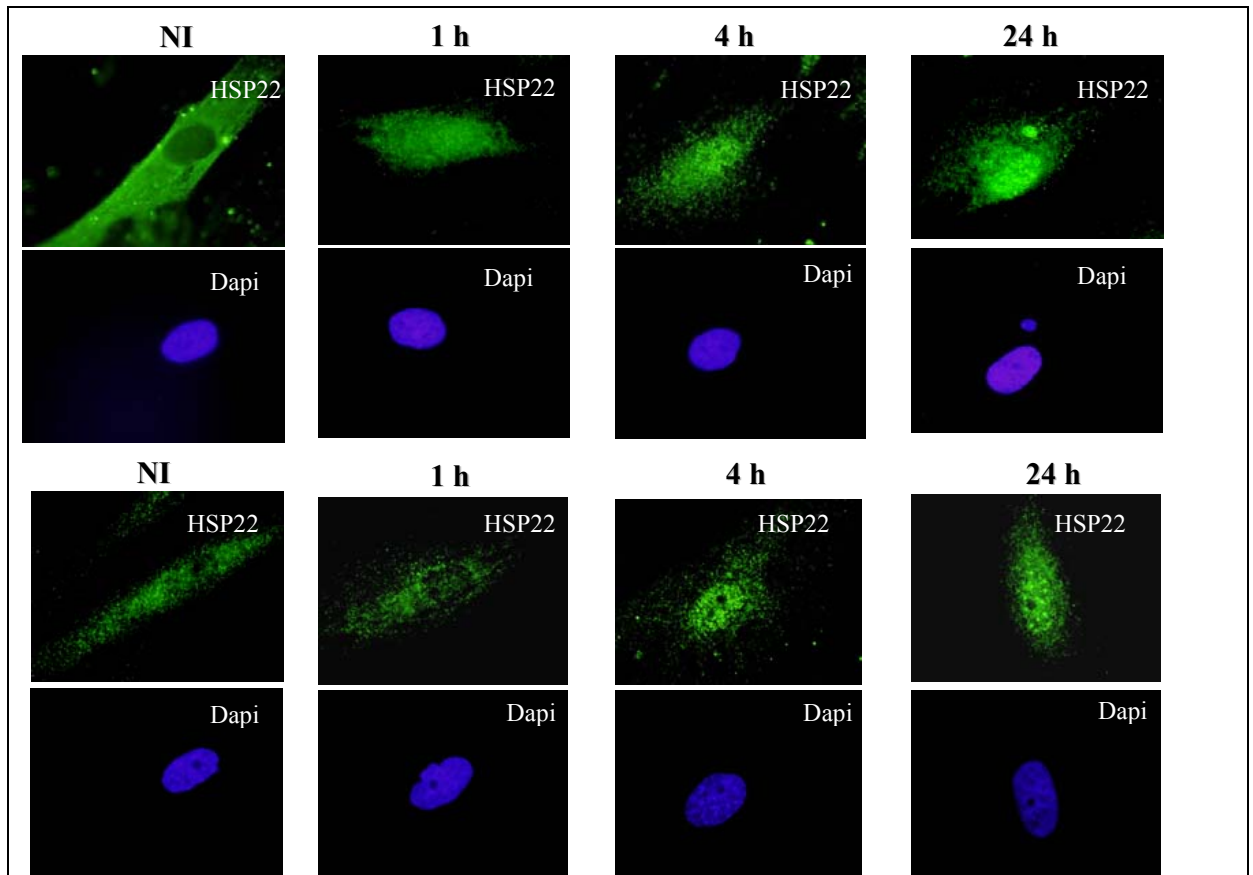
Dans le cadre des essais pré-cliniques du laboratoire concernant la PAT-Plat, la réponse HSP a commencé à être étudiée sur le modèle cellulaire. Les résultats présentés concernent les essais préliminaires réalisés sur des fibroblastes humains non transformés pour vérifier que le rapport guérison de la tumeur sur toxicité de la thérapie pour les tissus sains n'est pas en défaveur des tissus sains. Il reste non négligeable de tester une nouvelle thérapie sur tissu sain et sur animal sain, pour déterminer sa toxicité relative. D'autres résultats obtenus sur la lignée gliomale de rat F89 (modèle utilisé par le laboratoire (Biston MC *et al*, 2004)) sont présentés ici. Etant donné que ce sont des résultats préliminaires, aucune irradiation n'a été réalisée à l'aide du synchrotron, au seuil K du platine, c'est-à-dire en conditions de PAT-Plat. Les résultats obtenus en conditions PAT-Plat seront présentés au chapitre suivant.

#### **III.3.2.3.1- Dans les fibroblastes humains non transformés 1BR3**

Les premiers résultats obtenus avec le modèle des fibroblastes humains 1BR3 concernant la réponse HSP22 sont indiqués dans la figure 110. La figure 111 représente la fraction nucléaire de la protéine HSP22 en fonction du temps de réparation après irradiation (2 Gy) avec (30  $\mu$ M) ou sans cis-platine. Le tableau 17 montre le nombre de foci HSP22 observés par cellule après irradiation par rayonnement X (2 Gy) en présence ou non de cis-platine. D'après ces résultats, le nombre de foci augmente significativement en cas d'incubation avec le cis-platine. Ce résultat n'est pas biaisé par l'âge des cellules puisque les expériences ont été réalisées en parallèle avec des cellules prises au même passage.

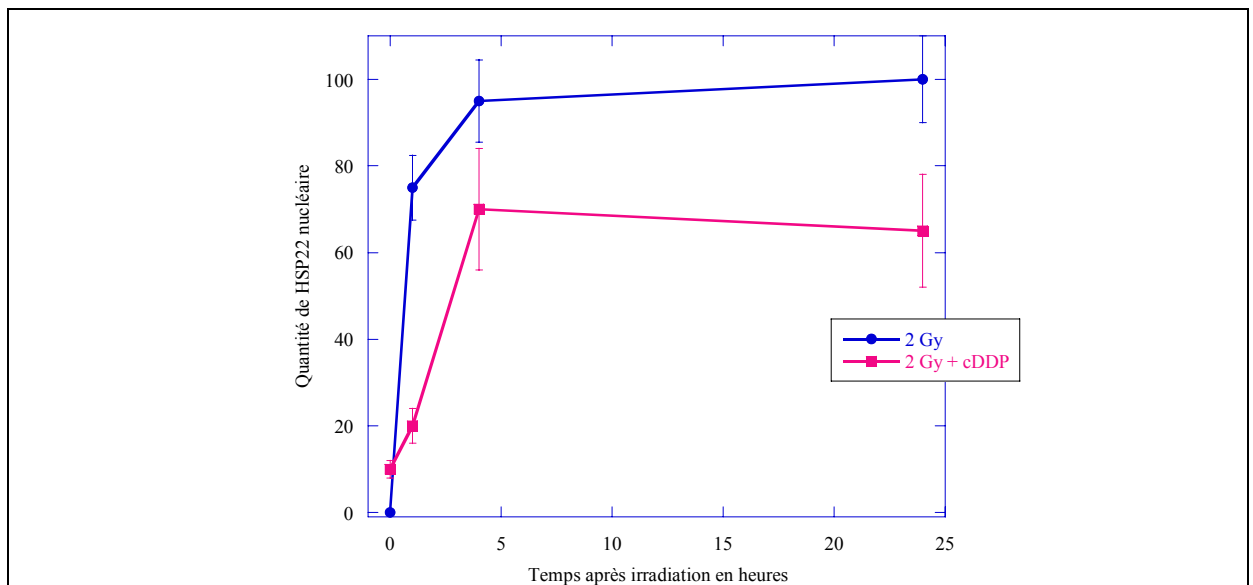
<b>Temps après irradiation</b>	<b>2 Gy</b>	<b>2 Gy + cDDP</b>
<b>0 h</b>	0 $\pm$ 1	3,5 $\pm$ 1,5
<b>1 h</b>	Non déterminé	Non déterminé
<b>4 h</b>	30 $\pm$ 3	35 $\pm$ 5
<b>24 h</b>	25 $\pm$ 2,5	30 $\pm$ 3

**Tableau 17) Nombre de foci HSP22 dans des cellules 1BR3 après rayons X (2Gy) avec ou sans cis-platine**  
**Tableau représentant le nombre moyen de foci de la protéine HSP22 par cellule 1BR3 en fonction du temps après irradiation (2Gy), avec ou sans traitement préalable au cDDP (30 $\mu$ M).**



**Figure 110) Comportement de HSP22 dans des cellules 1BR3 après rayons X (2Gy) sans (images du haut) ou avec cis-platine (images du bas)**

Images représentant en vert (FITC) la localisation de la protéine HSP22 cellules 1BR3 (témoin, passage : 16) après irradiation (2Gy), avec ou cDDP (30 $\mu$ M). Les noyaux cellulaires sont marqués à l'aide du Dapi (bleu). Temps de réparation précisés au dessus des images (NI : non irradié). Images représentant des cellules agrandies 1000 fois.



**Figure 111) Comportement de HSP22 dans des cellules 1BR3 après rayons X (2Gy) avec ou sans cis-platine**

Représentation graphique de la localisation nucléaire de la protéine HSP22 en fonction du temps dans les cellules 1BR3 (témoin) après irradiation (2Gy), avec ou sans cDDP (30 $\mu$ M).

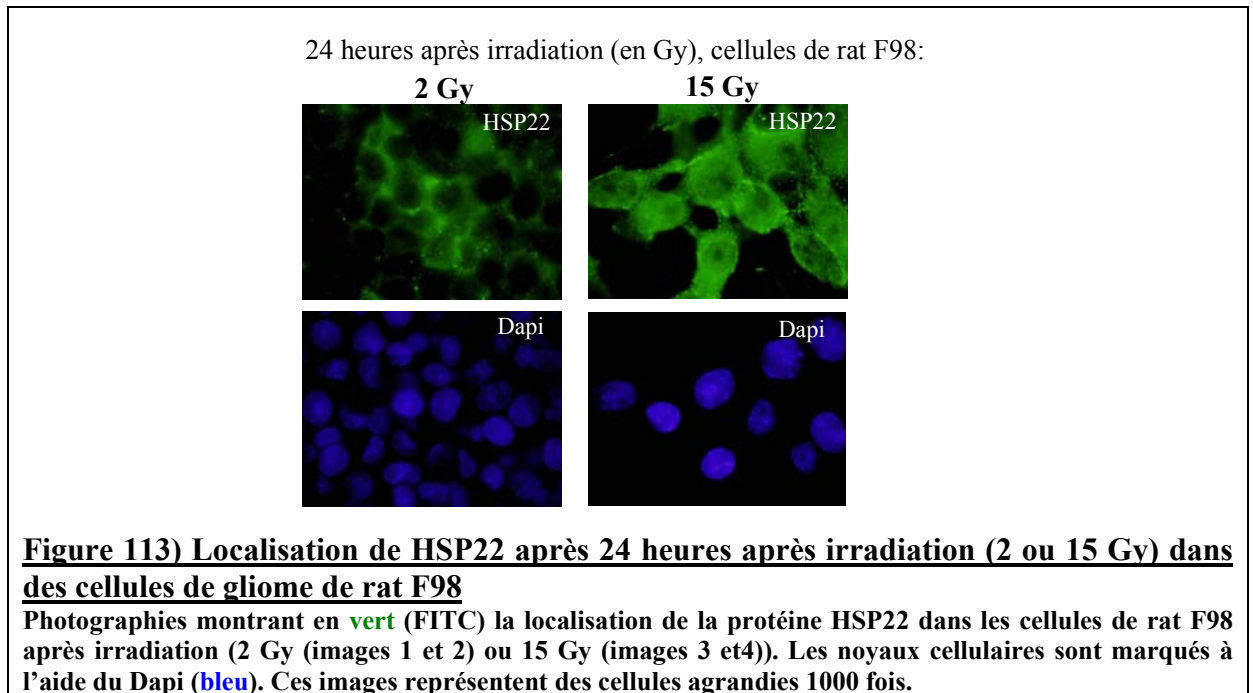
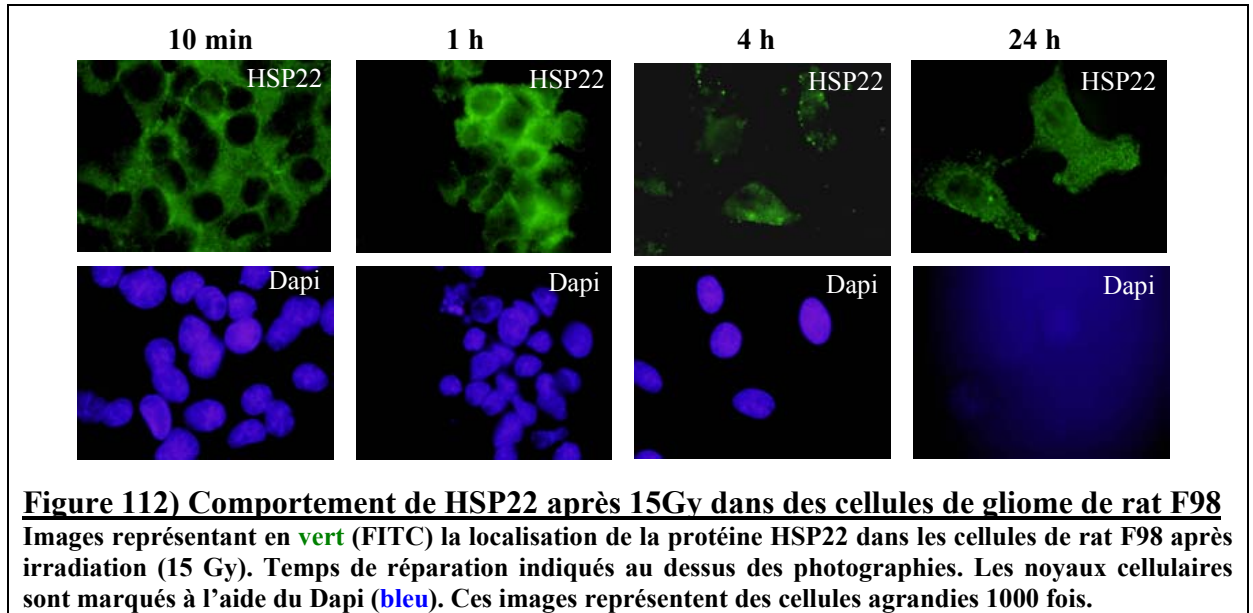
Ici, l'action combinée du cis-platine et de l'irradiation n'apparaît pas augmenter significativement le nombre de foci HSP22 (les écart-types se recoupent, sauf pour le 0h). La localisation nucléaire de HSP22 reste inchangée. L'action synergisante de l'irradiation par rayons X combinée à l'utilisation du cis-platine observée sur la réponse HSP70 n'est pas observable sur la réponse HSP22, même en conditions de non colocalisation de marquage.

### **III.3.2.3.2- Dans les gliomes de rat F89**

L'alignement des séquences de HSP22 humaine et de son homologue provenant du rat est présenté dans l'annexe I-f. Les deux homologues (chez l'homme et chez le rat) sont très proches (plus de 95% d'identité). Néanmoins, il n'y a pas d'identité au niveau du site SQ. La dose délivrée aux rats dans le modèle de PAT-Plat est fixée à 15 Gy (Biston MC *et al*, 2004). C'est pourquoi, cette même dose a été testée ici sur les cellules modèles (F98 : glioblastome). La localisation de HSP22 sur ces cellules glioblastomales de rat (modèle F98) réalisée après une irradiation de 15 Gy (figure 112) s'avère être plutôt cytoplasmique. De plus, il n'y a pas de focus apparent pour HSP22 avec ce modèle. Il faut ajouter que les cellules F98 résistent mal à l'irradiation à cette dose et ont tendance à se décoller. Pour une dose plus faible, équivalent à 2 Gy (figure 113), le phénomène de décollement des cellules n'est plus observé, mais même à un temps de réparation équivalent à 4heures, aucun focus n'est observé. Le marquage pour HSP22 apparaît plus intense pour la plus forte dose d'irradiation, sachant que l'intensité de la lumière utilisée pour ces images reste la même. HSP22 reste principalement localisée dans le cytoplasme. A cause de la persistance de sa localisation cytoplasmique et à l'absence de focus, ce modèle HSP22 a été abandonné pour l'étude en conditions de synchrotron PAT-Plat.

Au vu des résultats obtenus pour HSP70, il a été décidé de mener l'étude avec HSP70 seule. Les résultats concernant HSP70 et la « synchrotron PAT-Plat » sont présentés au chapitre suivant.

L'absence de focus HSP22 pourrait s'expliquer par l'immortalisation des cellules étudiées puisque les autres lignées tumorales testées précédemment, MO59J et AT1BR, ne présentaient pas non plus de focus. La présence de foci pourrait aussi être due à une particularité de l'homologue humain de HSP22. Ce résultat peut, de plus, être attendu parce que la séquence de la protéine HSP22 du rat ne porte pas de site SQ et donc pas de site de phosphorylation potentiel pour les homologues kinases ATM et DNA-PK. Par conséquent, il n'y a pas de formation de focus. En effet, il a été montré précédemment que le site phosphorylé en cas de formation de focus est le site SQ.



#### **III.3.2.4- Implication de HSP22 dans le vieillissement des cellules**

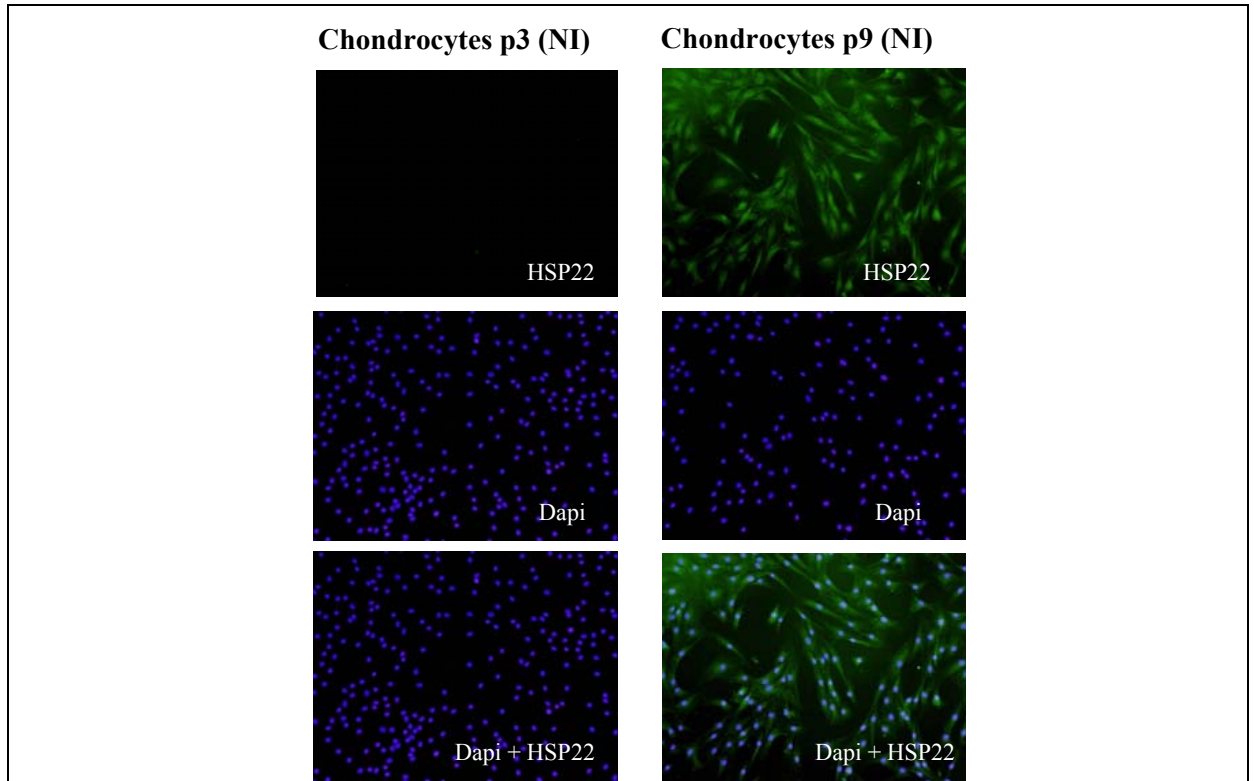
L'homologue mitochondrial drosophilien de la protéine humaine HSP22 est connu pour son implication dans le vieillissement (Morrow G *et al*, 2004). Sa surexpression permet une augmentation significative de la durée de vie de la mouche. L'homologue drosophilien présente un site SQ en fin de séquence. Les alignements entre les deux homologues présentent cependant peu d'identité (seulement 22% sur 77 résidus se chevauchant, d'après SIM (Expasy Biotools) correspondant au domaine  $\alpha$ -cristallin (chapitre II-3)).

Dans les résultats suivants, la localisation de HSP22 a été étudiée en fonction du nombre de passages subis par des cellules issues de culture primaire (c'est-à-dire non transformées). Le nombre de divisions subies par les cellules est appelé *passage* (voir chapitre III-1). Il faut noter que les chondrocytes (d'après la firme Promocell®, Allemagne, d'où proviennent les cellules) sont connus pour se trouver dans un état de sénescence dès un passage égal à 9-10. Pour les fibroblastes, cet état de sénescence est remarqué dès un passage égal à 20-22. La figure 114 montre des chondrocytes à différents passages. L'intensité du marquage correspondant à la protéine HSP22 est beaucoup plus marquée pour les cellules de passage élevé, et ce pour toutes les cellules, puisque, lorsque les photographies sont superposées, toutes les cellules sont marquées. L'observation des cellules à plus fort grossissement et en modifiant l'intensité de la lumière pour étudier la localisation de HSP22, montre l'existence de différences significatives entre les cellules prises à différents passages (figure 115).

Il existe un début de formation de foci nucléaires pour les chondrocytes à passage élevé. Pour les fibroblastes à passage élevé, ces foci apparaissent tout à fait visibles et discernables. Les foci nucléaires HSP22 seraient donc potentiellement caractéristiques d'un état de sénescence cellulaire dans les cellules non transformées.

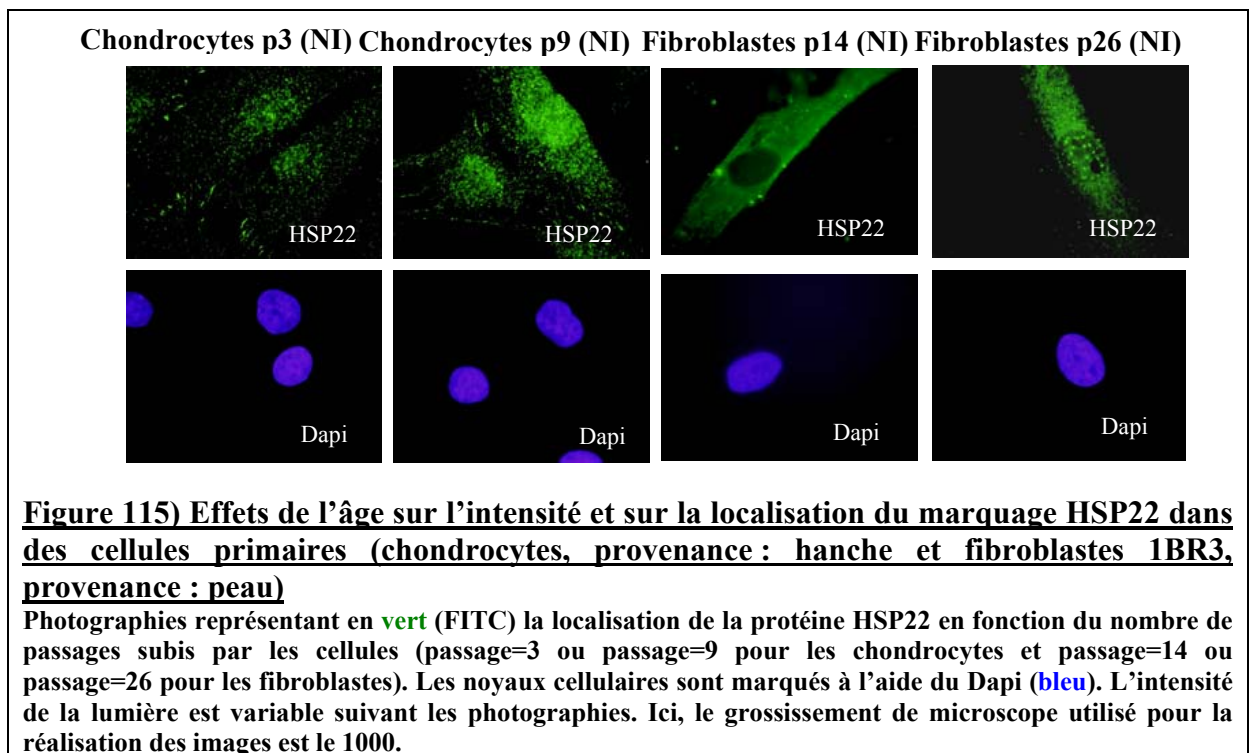
#### **III.3.2.5- Interaction de HSP22 avec HSP70 après rayons X**

L'observation de la colocalisation de HSP22 et HSP70 (figure 116) montre d'emblée une sorte de granulation nucléaire et une persistance du phénomène de navette nucléaire pour HSP70. C'est certainement artéfactuel et dû à la colocalisation avec l'anticorps dirigé contre HSP22. L'explication tiendrait au fait que les spectres d'émission des fluorochromes utilisés (c'est-à-dire FITC et TRITC) se recourent (voir partie III.2). Ce phénomène a été nommé « bleed through » (Feige JN *et al*, 2005). Dans ce cas de figure-ci, le même genre de problème intervient que lors de la colocalisation avec l'anticorps dirigé contre l'histone  $\gamma$ H2Ax. Le profil de cinétique d'immunofluorescence obtenu apparaît calqué sur l'anticorps le plus fort. Concernant l'interaction HSP22-HSP70, elle existe cependant puisqu'elle a été démontrée par immunoprécipitations (voir figure 117), dans le cytoplasme, après radiations ionisantes. Néanmoins, ce type d'expérience ne permet pas de discriminer s'il s'agit d'une interaction directe (contact direct entre les 2 protéines) ou indirecte (contact entre les deux protéines à travers une ou plusieurs autres protéines).



**Figure 114) Effets de l'âge sur l'intensité du marquage de HSP22 dans des cellules primaires (chondrocytes, provenance : hanche)**

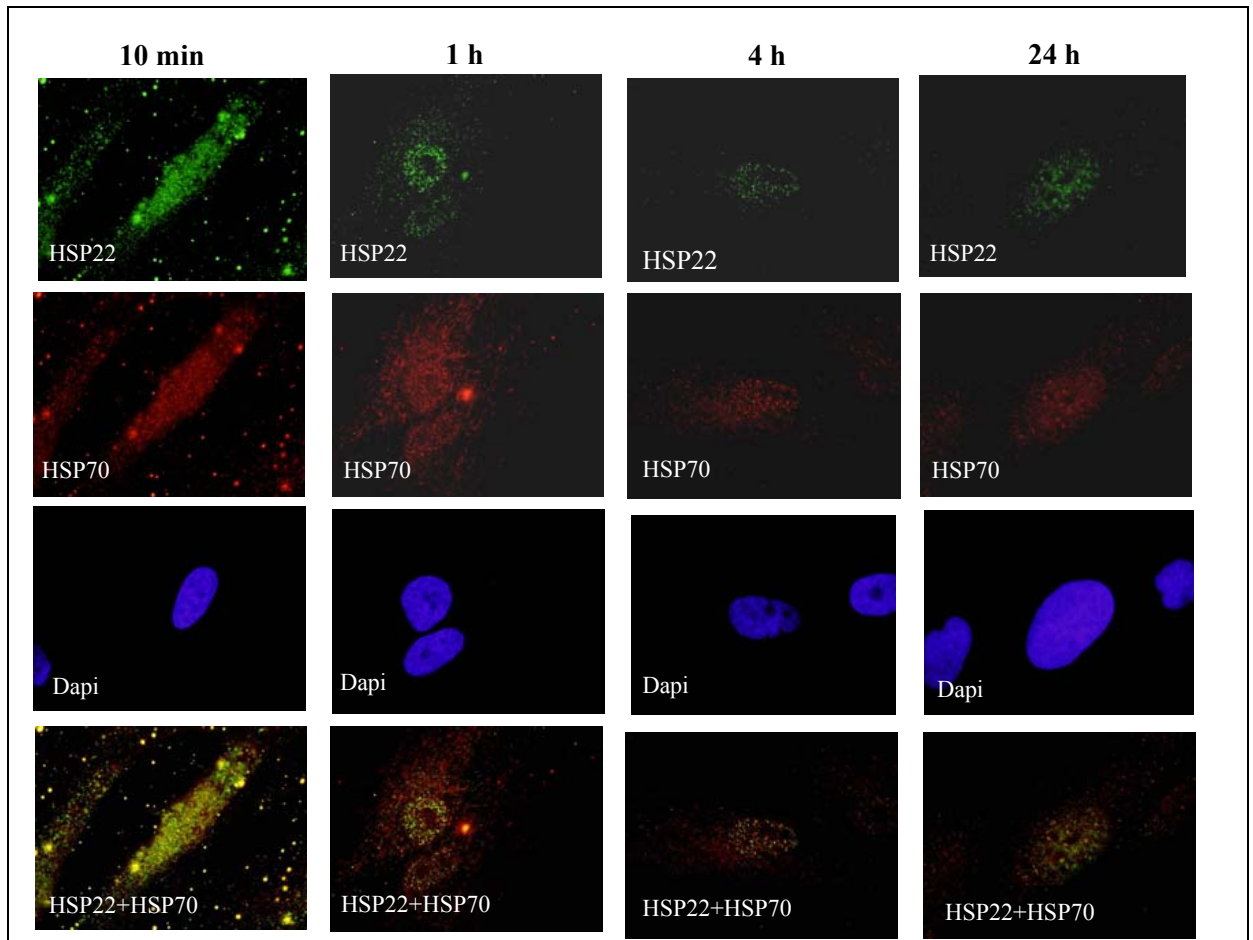
Images d'immunofluorescence précisant en vert (FITC) la localisation de la protéine HSP22 en fonction du nombre de passages subis par les cellules (passage=3 ou passage=9). Les noyaux cellulaires sont marqués à l'aide du Dapi (bleu). Dapi+HSP22 représente une superposition des photographies prises pour le Dapi et pour le marquage HSP22. L'intensité de la lumière est maintenue constante. Le grossissement de microscope utilisé pour la réalisation de ces images est le 100.



**Figure 115) Effets de l'âge sur l'intensité et sur la localisation du marquage HSP22 dans des cellules primaires (chondrocytes, provenance : hanche et fibroblastes 1BR3, provenance : peau)**

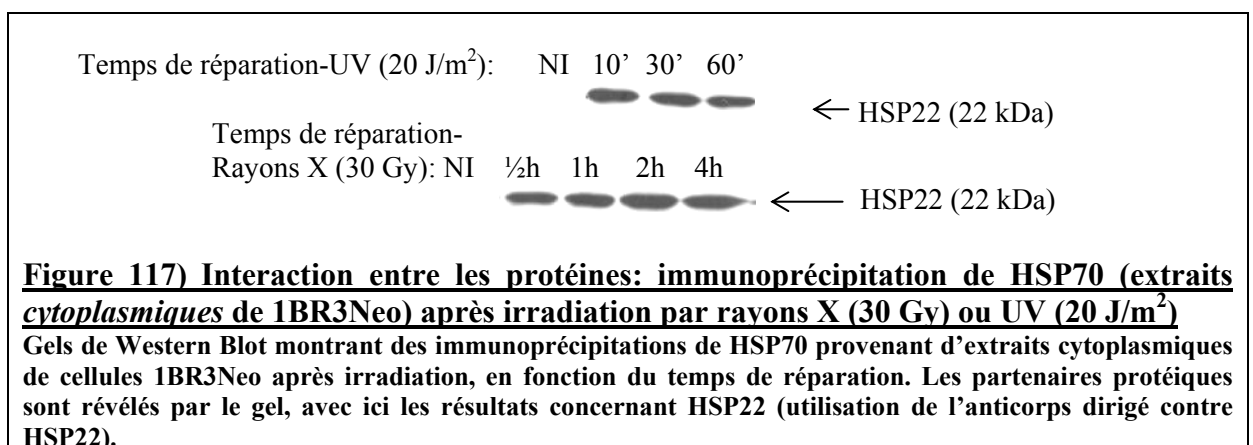
Photographies représentant en vert (FITC) la localisation de la protéine HSP22 en fonction du nombre de passages subis par les cellules (passage=3 ou passage=9 pour les chondrocytes et passage=14 ou passage=26 pour les fibroblastes). Les noyaux cellulaires sont marqués à l'aide du Dapi (bleu). L'intensité de la lumière est variable suivant les photographies. Ici, le grossissement de microscope utilisé pour la réalisation des images est le 1000.





**Figure 116) Colocalisation de HSP22 et HSP70 après rayons X (2Gy)**

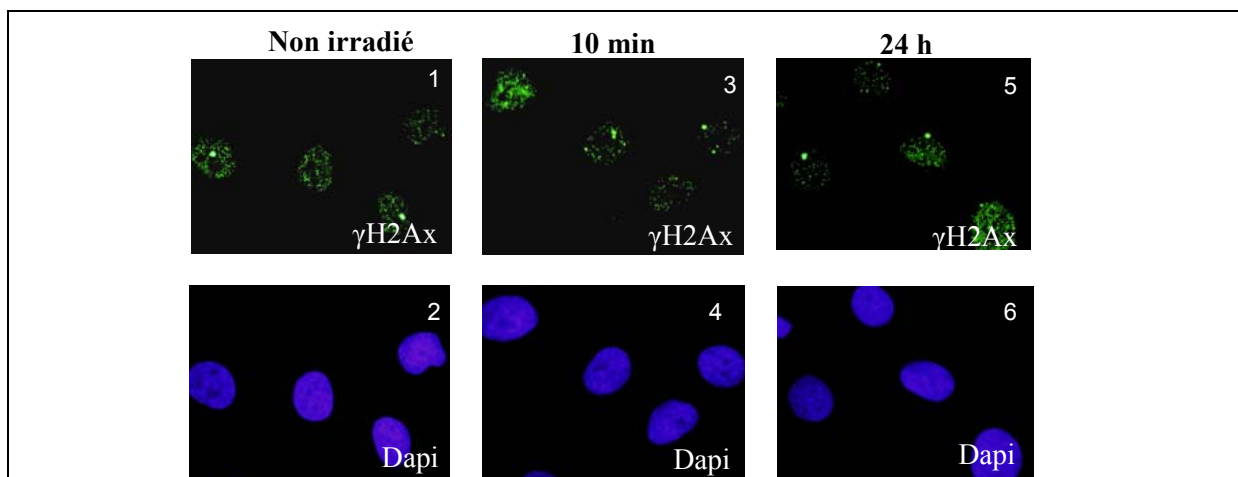
Photographies (obtenues après une irradiation de 2Gy) représentant en **vert** (FITC) la localisation de la protéine HSP22 (cellules 1BR3), en **rouge** (TRITC) la localisation de la protéine HSP70, en **bleu** (Dapi) les noyaux et en **jaune** (**vert+rouge**) la colocalisation des deux HSP. Les temps de réparation sont indiqués au-dessus des images. Ces images représentent des cellules agrandies 1000 fois.



**Figure 117) Interaction entre les protéines: immunoprécipitation de HSP70 (extraits cytoplasmiques de 1BR3Neo) après irradiation par rayons X (30 Gy) ou UV (20 J/m<sup>2</sup>)**

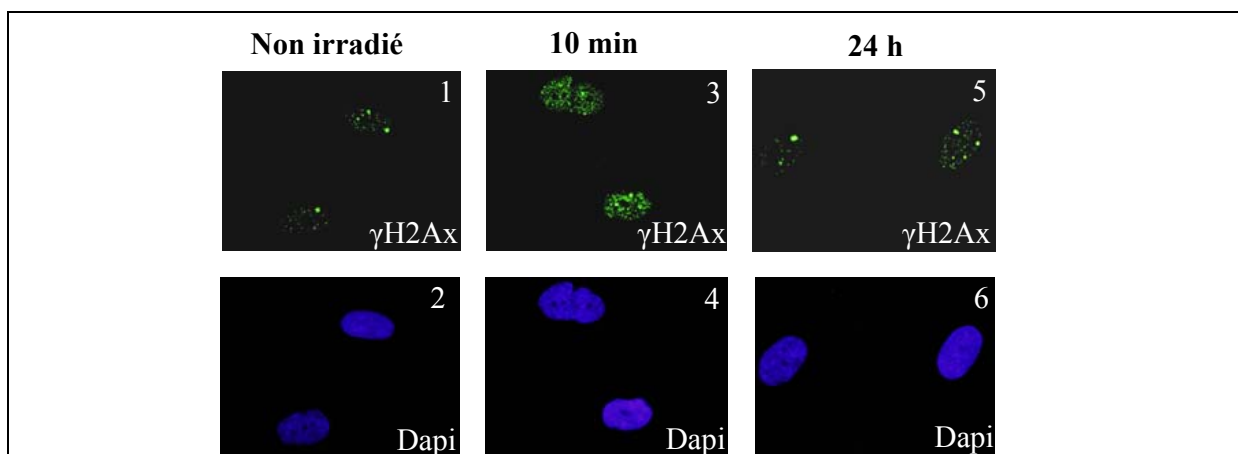
Gels de Western Blot montrant des immunoprécipitations de HSP70 provenant d'extraits cytoplasmiques de cellules 1BR3Neo après irradiation, en fonction du temps de réparation. Les partenaires protéiques sont révélés par le gel, avec ici les résultats concernant HSP22 (utilisation de l'anticorps dirigé contre HSP22).





**Figure 118) Images de chondrocytes après irradiation en mode DEI (expérience d'immunofluorescence)**

Utilisation de l'anticorps secondaire anti-souris-FITC pour cibler l'anticorps anti- $\gamma$ H2Ax (monoclonal, souris ; vert). Les foci ont été comptés sous le microscope (Olympus) sur au moins N=35 cellules représentatives par condition. Les noyaux sont localisés à l'aide du Dapi (bleu). Photographies 1 et 2: chondrocytes non irradiés. Photographies 3 et 4: chondrocytes directement après irradiation. Photographies 5 et 6: chondrocytes 24 heures après irradiation. Ces images représentent des cellules grossies 1000 fois.



**Figure 119) Images de fibroblastes de peau 1BR3 après irradiation en mode DEI**

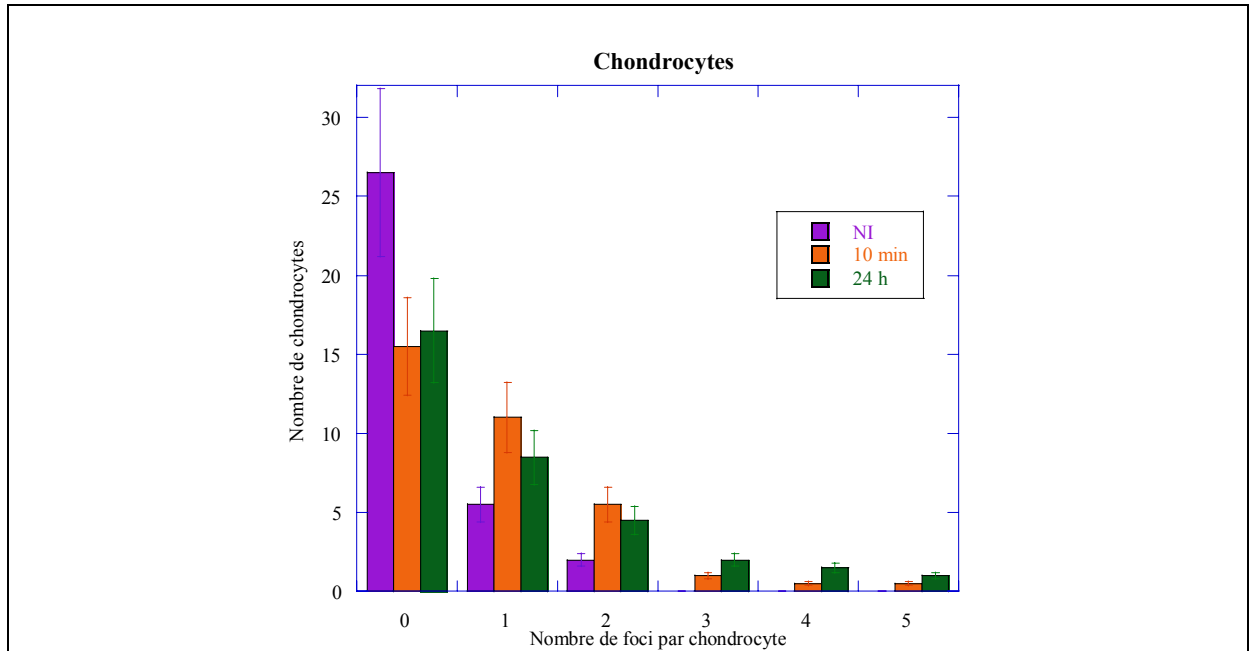
Utilisation de l'anticorps secondaire anti-souris-FITC pour cibler l'anticorps anti- $\gamma$ H2Ax (monoclonal, souris ; vert). Les foci ont été comptés sous le microscope (Olympus) sur au moins N=35 cellules représentatives par condition. Les noyaux sont localisés à l'aide du Dapi (bleu). Photographies 1 et 2: fibroblastes non irradiés. Photographies 3 et 4: fibroblastes directement après irradiation. Photographies 5 et 6: fibroblastes 24 heures après irradiation. Images de cellules observées au microscope optique à fluorescence, grossissement 1000.

**III.3.3- Résultats: synchrotron: impact radiobiologique de la méthode DEI****III.3.3.1- Marqueur phospho-H2Ax**

L'irradiation a été réalisée en mode DEI sur une base de 3 scans par irradiation, ce qui correspond à une dose totale de 8,694 mGy par irradiation (51,5 keV). Les expériences dupliquées utilisent à chaque fois les chondrocytes et les fibroblastes de peau. Ces deux types de cellules humaines provenant de cultures primaires et correspondant aux couches cellulaires étant traversées par les rayons X lors de l'imagerie du cartilage (fibroblastes de peau 1BR3 et chondrocytes) ont été soumises à une irradiation en mode DEI (figures 118 et 119). Dans les figures 120 et 121, le nombre de foci  $\gamma$ H2Ax par cellule est représenté en fonction du nombre de cellules. Trois cas sont considérés : les cellules non irradiées, utilisées en tant que contrôle et notées *NI*, les cellules directement après irradiation, notées *10min* et les cellules ayant bénéficié d'un temps de réparation de vingt-quatre heures sont notées *24h*. Les chondrocytes non irradiés présentent une même morphologie (figure 120), c'est-à-dire une absence de focus ; 10 minutes après irradiation (figure 120), le nombre de foci par cellule augmente sensiblement puis diminue ensuite (temps de réparation : 24 heures). Le nombre de foci par cellule diminue moins rapidement pour les fibroblastes (figure 121), puisque vingt-quatre heures après irradiation, ce nombre est légèrement supérieur à celui correspondant à dix minutes après irradiation. Il faut néanmoins noter que le nombre de foci par cellule reste très faible. De plus, les écart-types se chevauchant pour les points après irradiation (figures 120 et 121), la différence observée ne peut pas être considérée comme étant significative. Les deux lignées cellulaires semblent adopter le même type de comportement après irradiation. Dans le tableau 18, les moyennes du nombre de foci par cellule sont reportées. Elles sont calculées sur trente-quatre cellules représentatives. Les fibroblastes montrent un nombre moyen de foci par cellule supérieur aux chondrocytes, et ce même pour des cellules non irradiées. En proportion, l'augmentation de la valeur du nombre de foci par cellule suit la même évolution. Le fait qu'il y ait une augmentation du nombre de foci par cellule entre 10 minutes et 24 heures après irradiation n'apparaît pas significatif puisque les barres d'erreur se recoupent. La moyenne du nombre de foci par cellule non irradiée apparaît inférieure aux valeurs obtenues pour les cellules irradiées, et ce pour les deux types cellulaires testés ; même si cette différence observée n'est significative que pour les chondrocytes, elle représente néanmoins une tendance pour les cellules après irradiation. De même, après 24 heures de temps de réparation, la moyenne du nombre de foci par cellule augmente sensiblement. Cette augmentation peut être expliquée par le fait que ces cellules sont des cellules issues de culture primaires (c'est-à-dire des cellules non immortalisées). Cette proportion pourrait être due à la sénescence normale des cellules (Guarente L et Kenyon C, 2000). Ou bien, cette augmentation pourrait s'expliquer par un effet radiobiologique potentiel mais de très faible amplitude. Il faut cependant souligner que cet effet radiobiologique, s'il existe, ne constitue pas un risque potentiellement dangereux pour les cellules, du point de vue de la survie.

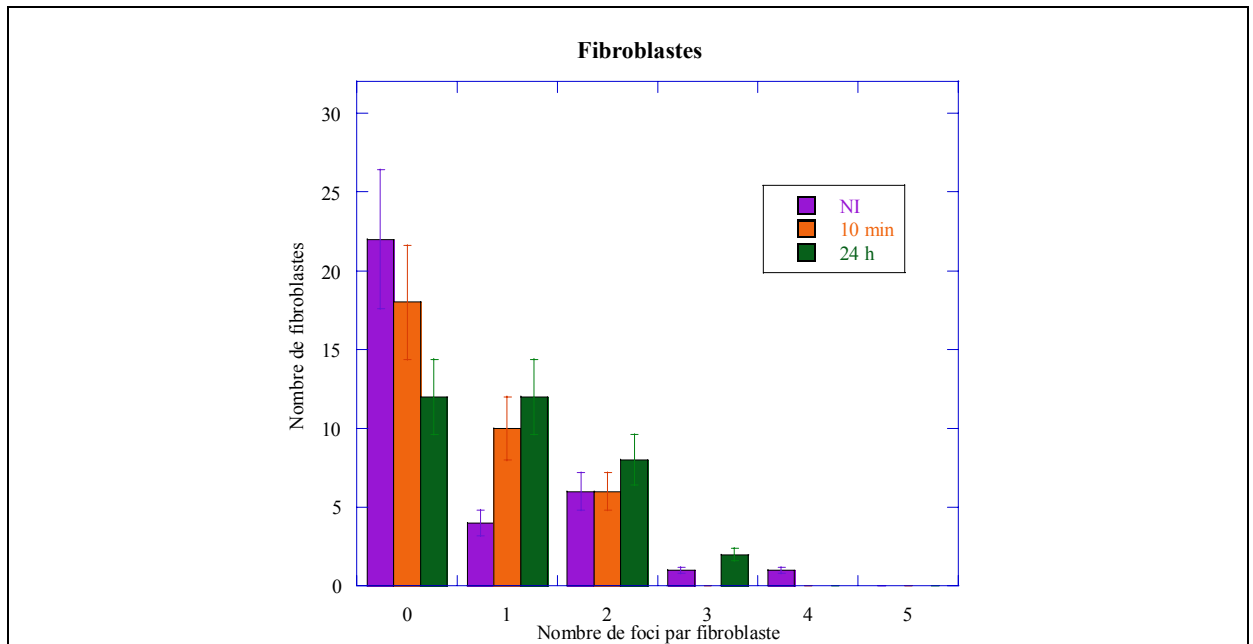
	<b>Chondrocytes</b>	<b>Fibroblastes</b>
<b>Non Irradié</b>	0,25 ± 0,11	0,84 ± 0,20
<b>10 minutes</b>	0,87 ± 0,20	1,32 ± 0,80
<b>24 heures</b>	1,02 ± 0,26	1,50 ± 0,80

**Tableau 18) Nombre moyen de foci  $\gamma$ H2Ax par cellule.** Représentation du nombre moyen de foci  $\gamma$ H2Ax pour les chondrocytes et pour les fibroblastes 1BR3 non transformés pour les temps suivants après irradiation avec le synchrotron en mode DEI : non irradié, directement après irradiation et 24 heures après irradiation.



**Figure 120) Histogramme représentant le nombre de foci  $\gamma$ H2Ax par chondrocyte après une irradiation en mode DEI (N=34 cellules par condition)**

Les foci ont été comptés à l'aide du microscope (N=34 cellules représentatives par condition). Les barres violettes représentent les chondrocytes non irradiés, les barres oranges représentent les chondrocytes directement après irradiation et enfin les barres vertes correspondent aux chondrocytes ayant bénéficié d'un temps de réparation de 24 heures après irradiation.



**Figure 121) Histogramme représentant le nombre de foci  $\gamma$ H2Ax par fibroblaste après une irradiation en mode DEI (N=34 cellules par condition)**

Les foci ont été comptés à l'aide du microscope (N=34 cellules représentatives par condition). Les barres violettes représentent les fibroblastes non irradiés, les barres oranges représentent les fibroblastes directement après irradiation et enfin les barres vertes correspondent aux fibroblastes ayant bénéficié d'un temps de réparation de 24 heures après irradiation.

De plus, selon les mesures réalisées par DT Goodhead, sachant que 1 Gy produit 40 cassures double brin par cellule, seule 0,36 cassure double brin serait produite par cellule à cette dose de 9 mGy (Goodhead DT, 1989).

$$9.10^{-3} \times 40 = 0,36$$

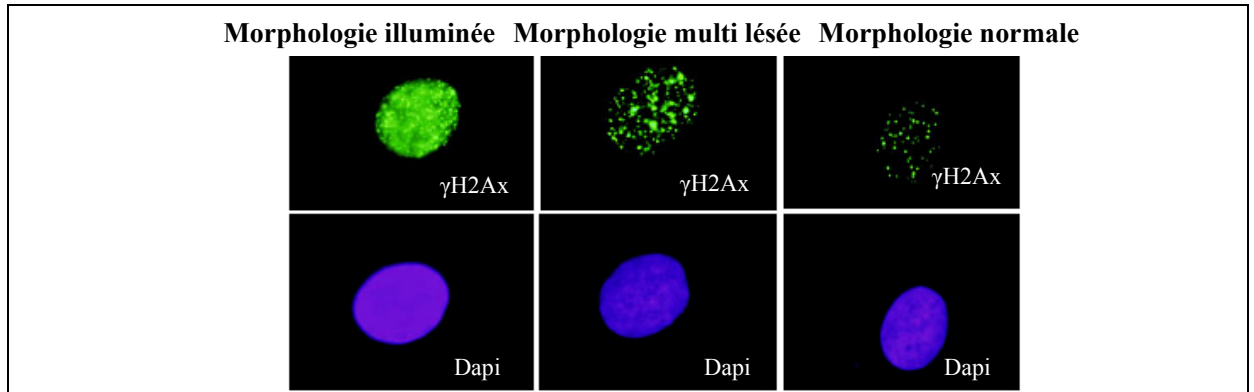
Ce taux apparaît clairement ici, s'il est normalisé par soustraction du bruit de fond correspondant au nombre de cassure double brin d'ADN pour les cellules non irradiées.

Il faut ajouter à ces données une autre considération : après 24 heures de temps de réparation, la plupart des cellules ne comporte aucun focus, alors que certaines d'entre elles présentent l'une des deux morphologies anormales : un marquage intense sans focus visible (ce qui correspond à une augmentation du nombre de cassures simple brin) noté *morphologie illuminée*, ou un faciès montrant un nombre de foci élevé (correspondant cette fois-ci à des cassures double brin) avec un fond de luminosité intermédiaire noté *morphologie multi lésée* (figures 122 et 123). La morphologie illuminée, mais sans focus distinct, peut correspondre à des cellules en synthèse ou à une grande quantité de cassures simple brin. Pour les temps de réparation de 24 heures, le pourcentage correspondant à la morphologie illuminée est de 2,6 pour cent cellules pour les chondrocytes et de 3,8% pour les fibroblastes, respectivement. La morphologie multi lésée présente un nombre de cassures double brin de l'ADN accru et un signal correspondant aux cassures simple brin intermédiaire par rapport aux morphologies normale et illuminée. Pour la morphologie multi lésée, le pourcentage est de 4,3% pour les chondrocytes et de 11,4% pour les fibroblastes (figure 124). Les deux morphologies anormales sont plus représentées dans les fibroblastes.

Ces données semblent en accord, en proportion (nombre de foci  $\gamma$ H2Ax observés) et concernant le type cellulaire (ce sont ici seulement des cellules non tumorales), avec certaines données trouvées dans la littérature. Des effets radiobiologiques ont été montrés sur des fibroblastes de poumon issus de culture primaire, pour les faibles doses (1,2 mGy et 5 mGy), c'est à dire qu'une persistance du nombre de cassures double brin est observée pour les temps longs de réparation (Rothkamm K et Lobrich M, 2003), ce qui semble aussi être la tendance observée ici. Néanmoins, ces cassures double brin de l'ADN se réparent rapidement dans des cellules proliférantes.

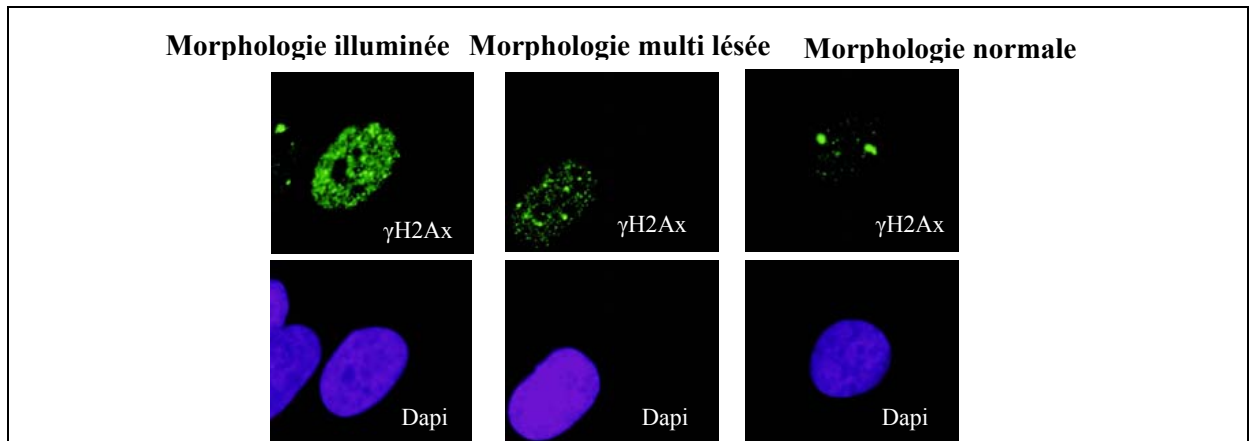
#### **III.3.3.2- Marqueur HSP70**

Il a été montré que la protéine humaine HSP70 était un bio marqueur efficace pour le stress (Delmas F *et al*, 1996 ; Ryan JA et Heightower LE, 1996 ; Radjev S et Sharp FR, 2000). C'est pourquoi, dans le but de trouver, ou non, des différences dues à un éventuel stress, ce marqueur a été étudié dans les chondrocytes après irradiation dans les conditions classiques de DEI. Après une heure de réparation après irradiation (figures 125 et 126), et donc ce qui est sensé constituer le maximum de la réponse HSP70 après rayons X (c'est-à-dire localisation nucléaire et surexpression d'après les résultats du chapitre précédent III.3.1), il n'y a aucune différence concernant la localisation de la protéine HSP70 inductible par le stress, entre les cellules irradiées et les cellules non traitées, et ce pour les deux lignées primaires testées (chondrocytes et fibroblastes). Ceci signifie que, d'après ces résultats, le stress provoqué par une analyse d'imagerie par irradiation en mode DEI apparaît non significatif par rapport à la réponse HSP70.



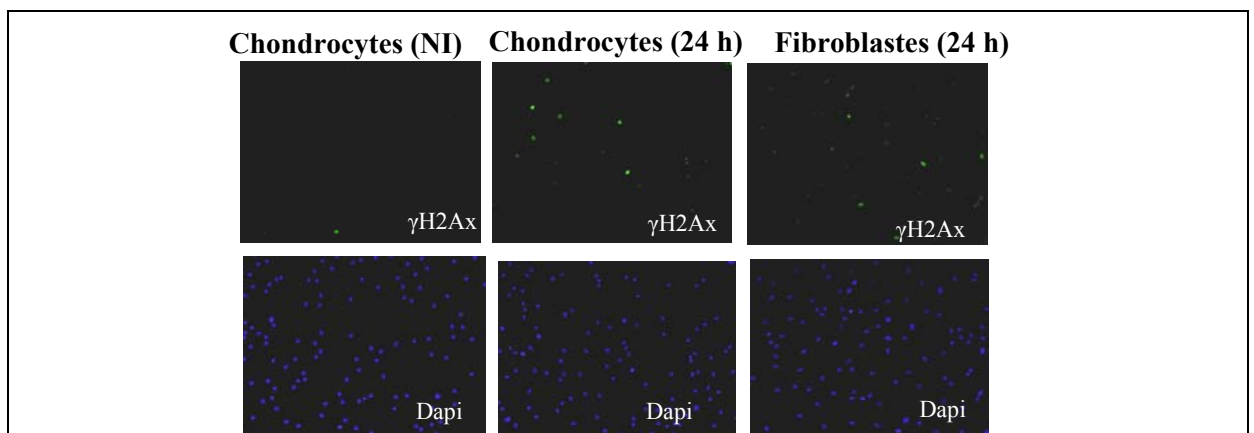
**Figure 122) Chondrocytes, morphologies anormales après irradiation en mode DEI (temps de réparation égal à 24 heures)**

Utilisation de l'anticorps secondaire anti-souris-FITC (vert) pour cibler l'anticorps anti- $\gamma$ H2Ax (monoclonal, souris). Utilisation du Dapi pour marquer les noyaux cellulaires (bleu). Ces différentes morphologies sont observées après 24 heures de réparation sur les chondrocytes irradiés (les cellules ont été gardées à 37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Le grossissement 1000 est utilisé pour réaliser ces images.



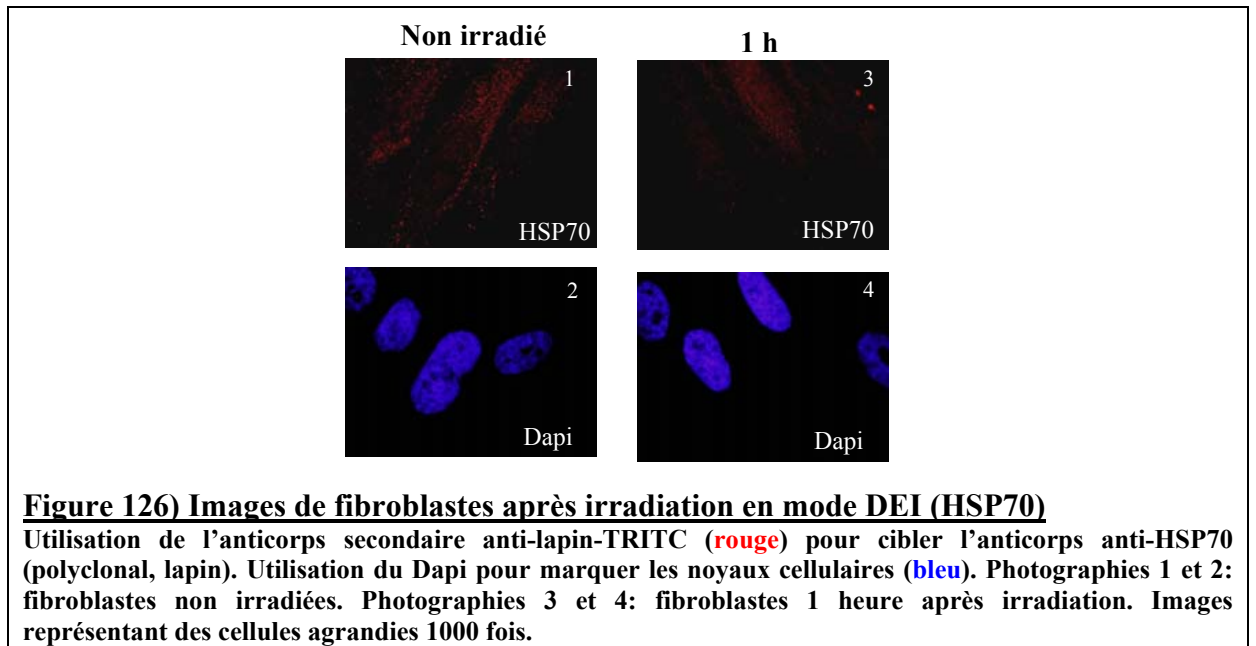
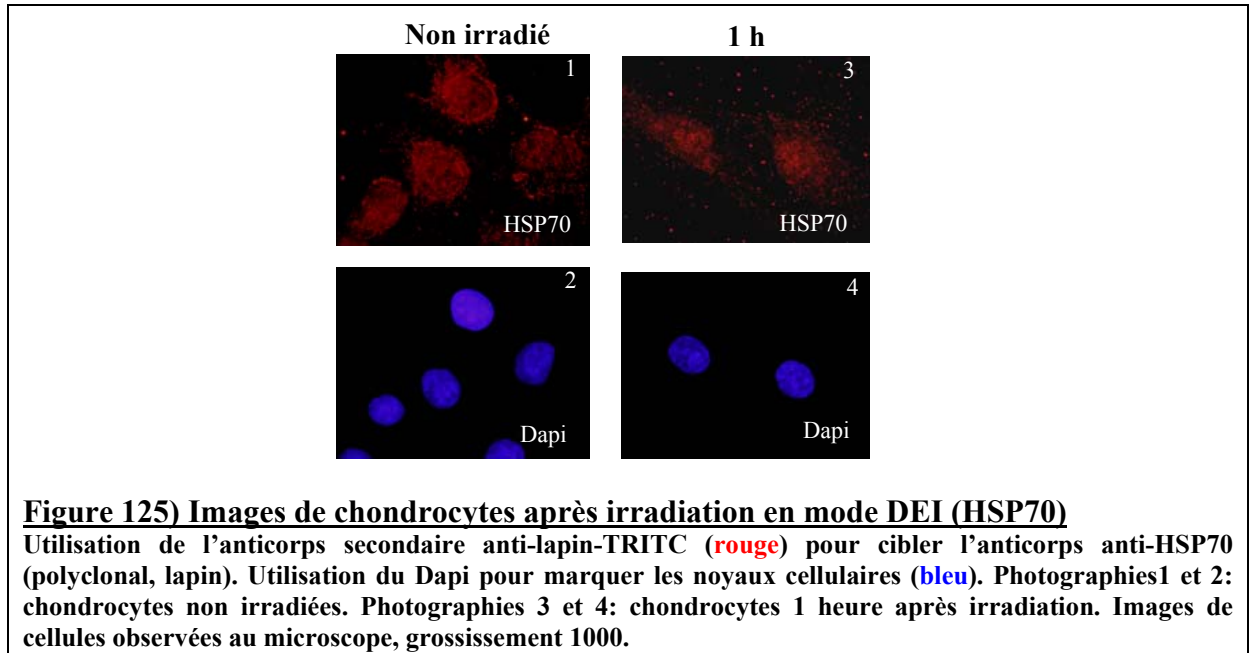
**Figure 123) Fibroblastes, morphologies anormales après irradiation en mode DEI (temps de réparation égal à 24 heures)**

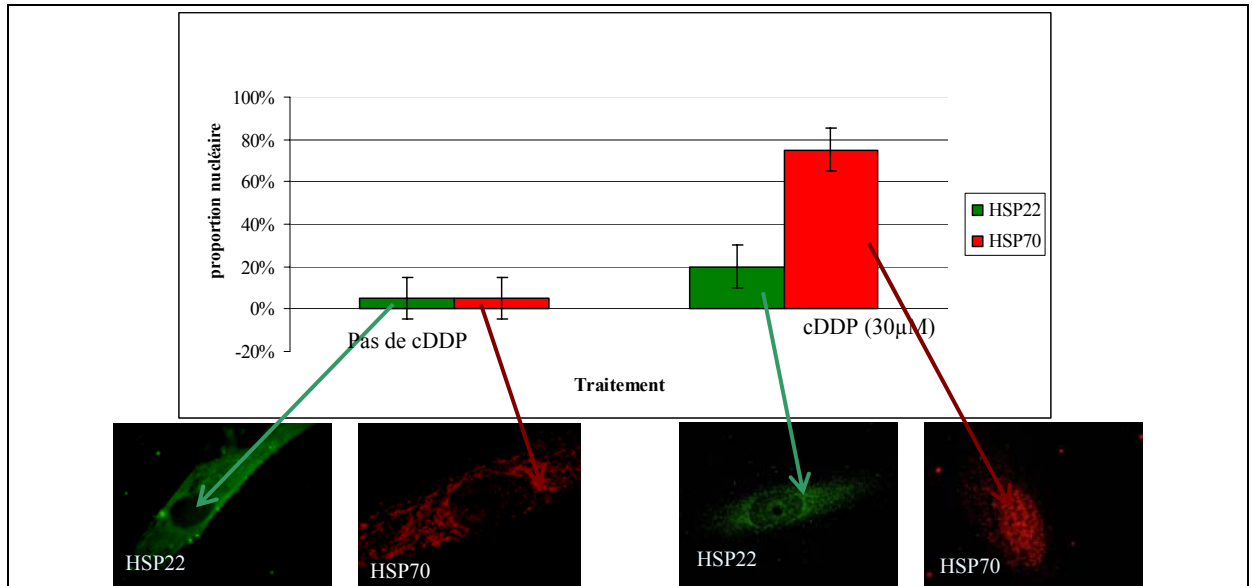
Utilisation de l'anticorps secondaire anti-souris-FITC (vert) pour cibler l'anticorps anti- $\gamma$ H2Ax (monoclonal, souris). Utilisation du Dapi pour marquer les noyaux cellulaires (bleu). Ces différentes morphologies sont observées après 24 heures de réparation sur les fibroblastes irradiés. Ces images représentent des cellules agrandies 1000 fois.



**Figure 124) Observation des cellules à plus faible grossissement**

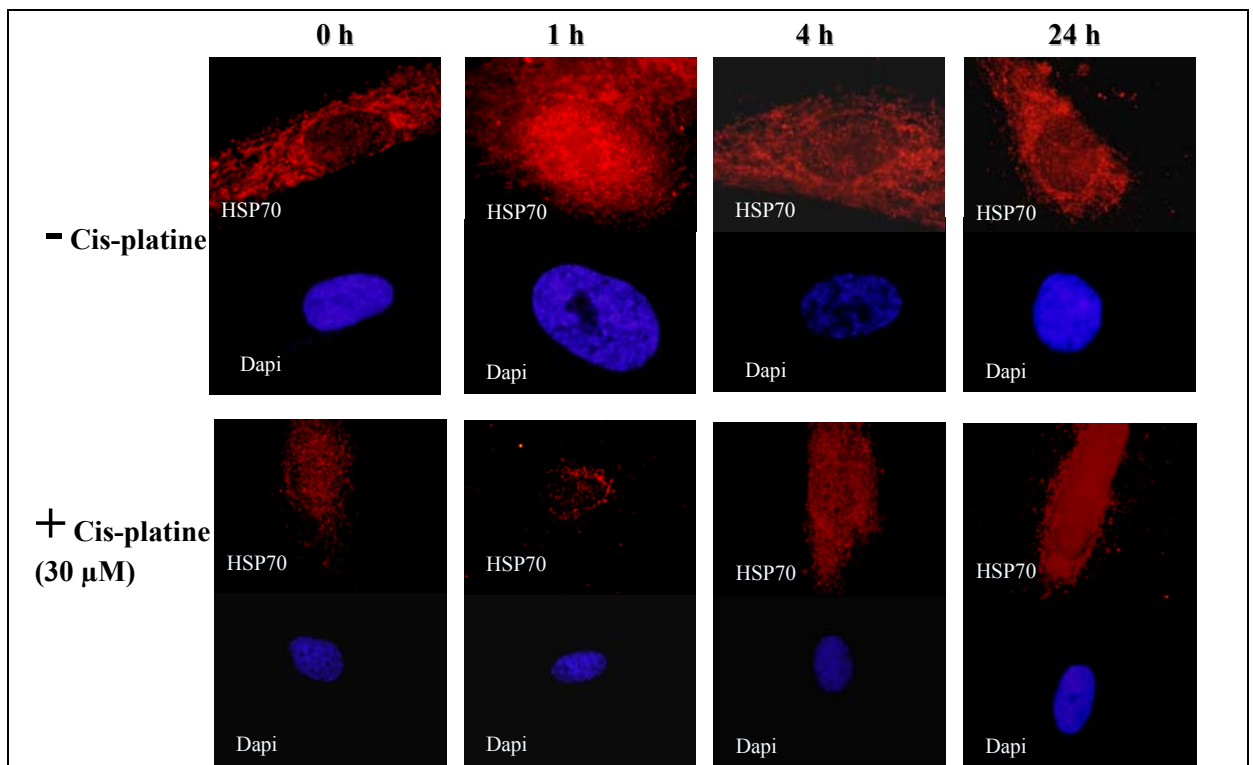
Utilisation de l'anticorps secondaire anti-souris-FITC pour cibler l'anticorps anti- $\gamma$ H2Ax (monoclonal, souris, vert). Utilisation du Dapi pour marquer les noyaux cellulaires (bleu). Images représentant des cellules agrandies 100 fois.





**Figure 127) Effet du cis-platine seul sur la localisation de HSP22 et de HSP70**

Représentation graphique de la localisation protéique en fonction du traitement. Seule la localisation nucléaire est représentée sur ce graphique. La lignée cellulaire utilisée est 1BR3. La concentration finale en solution de cis-platine (cDDP) est égale à 0 (à gauche) ou à 30 µM (à droite). HSP22 est localisée à l'aide du FITC (vert) et HSP70 est localisée à l'aide du TRITC (rouge). Microscope optique à fluorescence, grossissement 1000, utilisé ici pour la réalisation des images de cellules.



**Figure 128) Comparaison entre l'effet de l'irradiation X seule (2Gy) et de l'effet de la combinaison irradiation X (2Gy) + cis-platine (30µM) sur la localisation de HSP70**

La lignée cellulaire utilisée est 1BR3. La concentration finale en solution de cis-platine (cDDP) est égale à 0 (au dessus) ou à 30 µM (au dessous). HSP70 est localisée à l'aide du TRITC (rouge). Les noyaux cellulaires sont localisés à l'aide du Dapi (bleu). L'irradiation est réalisée à l'aide d'une source conventionnelle (200 kV) et la dose délivrée est égale à 2 Gy. Les temps de réparation correspondants sont indiqués au-dessus des photographies. Ces images représentent des cellules agrandies 1000 fois. L'intensité de la lumière reste la même pour chaque marqueur.

### **III.3.4- Résultats: synchrotron: HSP70 et la « synchrotron PAT-Plat »**

#### **III.3.4.1- Tests préliminaires : combinaison de l'effet du cis-platine et de l'irradiation X : impact sur la réponse HSP70**

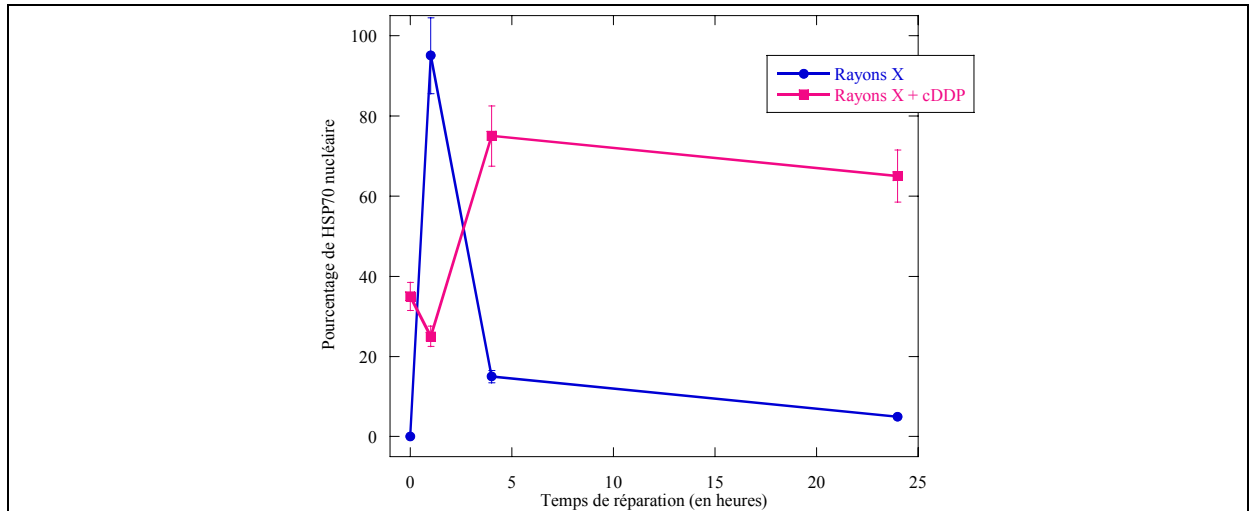
Des tests préliminaires ont été effectués sur HSP70 et HSP22 mais, au vu des résultats, seule la protéine HSP70 a été sélectionnée pour être testée en condition de PAT-Plat avec le modèle cellulaire de glioblastome de rat (F98) utilisé dans le laboratoire (Biston MC *et al*, 2004). Le graphique 129 présente la proportion de protéine nucléaire (HSP70 ou HSP22) en fonction du traitement (avec ou sans cis-platine) (résultats obtenus sur fibroblastes humains 1BR3). Ce graphique montre une tendance à une augmentation des taux nucléaires pour les deux protéines observées en présence de cis-platine mais l'augmentation de l'expression de HSP70 est significativement plus importante.

Les figures 128 et 129 montrent l'impact du traitement au cis-platine sur la localisation de la protéine HSP70 inductible par le stress (cellules 1BR3). La concentration de cis-platine utilisée dans les expériences *in vivo* (Biston MC *et al*, 2004) est de l'ordre de 30  $\mu$ M. Cette même concentration a été reprise ici. Le graphique 142 représente la quantité de HSP70 nucléaire en fonction du temps de réparation après irradiation (2Gy) avec ou sans cis-platine (30  $\mu$ M). Ces courbes montrent l'impact du traitement au cis-platine sur la localisation de HSP70 sur les fibroblastes contrôle 1BR3. La navette nucléaire est nettement visible sur ces courbes pour le témoin 1BR3 sans cDDP. Un effet significatif de la combinaison des deux traitements est notamment observable sur la navette nucléaire puisque la courbe correspondant à cette dernière ne suit pas la courbe obtenue pour l'irradiation seule. Ainsi, un retard notable est suivi d'une persistance du phénomène de navette nucléaire, puisqu'en effet, sans cDDP, le maximum d'expression nucléaire pour HSP70 est atteint 1 heure après irradiation.

#### **III.3.4.2- Combinaison de l'effet du cis-platine et de l'irradiation X au seuil K du platine avec le synchrotron : impact sur la réponse HSP70**

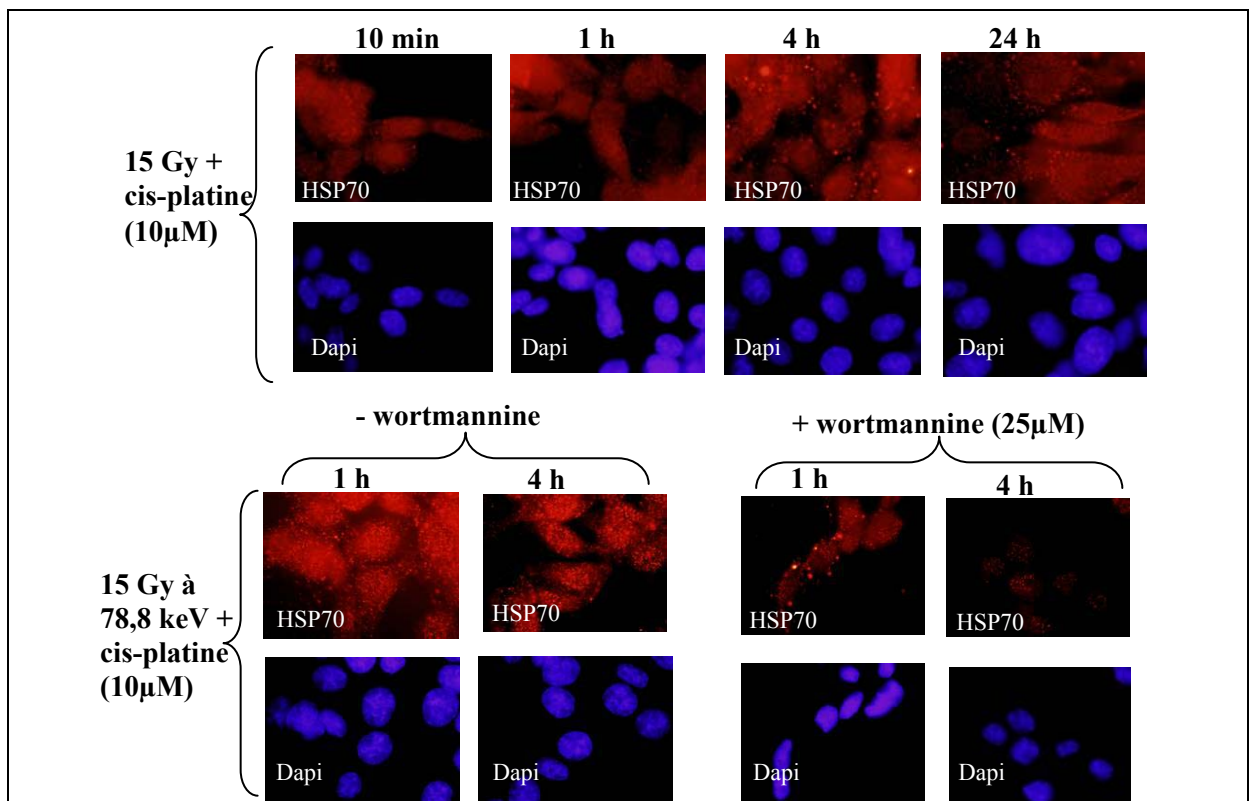
Les résultats présentés à la figure 130 sont réalisés sur les cellules de la lignée gliomale de rat F98. Ces cellules tumorales de rat, en ce qui concerne l'expression de la protéine HSP70 inductible par le stress, présentent une localisation plutôt plus nucléaire de la protéine pour un temps de réparation équivalant à 1 heure après une irradiation de 15 Gy avec la source conventionnelle (200 kV) et une concentration finale de 10 $\mu$ M de cis-platine. Le résultat observé pour un temps de réparation de 4 heures apparaît peu différent sur ces images. Puis, il semble y avoir une diminution faible du marquage pour le temps de réparation le plus long (24h), du moins concernant la localisation nucléaire. Les images du bas correspondent à une irradiation à l'énergie correspondant à la couche électronique K (K-edge (above)) du platine, c'est-à-dire à 78,8 keV, avec une dose de 15 Gy et une concentration finale de 10 $\mu$ M de cis-platine. L'observation de ces images montre que le marquage HSP70 apparaît plus intense et que la protéine HSP70 se trouve localisée surtout au niveau des noyaux des cellules. En comparant avec les résultats précédents (irradiation avec une source conventionnelle), il apparaît que l'irradiation au seuil K du platine produit une inflation de la réponse HSP70 et donc que les conditions PAT-Plat augmentent significativement la réponse HSP70 dans ce modèle cellulaire. Il y aurait une synergie des effets du cis-platine et du rayonnement synchrotron sur la réponse HSP70.





**Figure 129) Comparaison entre l'effet de l'irradiation X seule (2Gy) et de l'effet de la combinaison irradiation X (2Gy) + cis-platine (30µM) sur la localisation de HSP70**

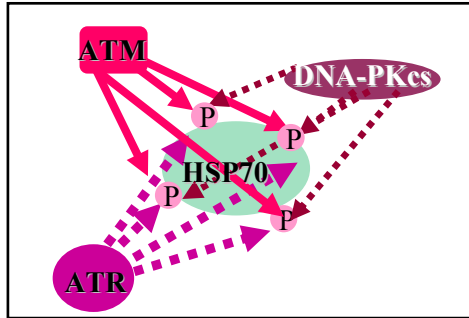
Représentation graphique de la localisation nucléaire de la protéine HSP70 après irradiation, avec ou sans cis-platine. La concentration finale en solution de cis-platine (cDDP) est égale à 0 ou à 30 µM et est indiquée sur le graphique. L'irradiation est réalisée à l'aide d'une source conventionnelle (200 kV) et la dose délivrée est égale à 2 Gy.



**Figure 130) Résultats obtenus pour le test HSP70-PAT-Plat sur des cellules de rat F98 : impact d'une drogue, la wortmannine**

Images obtenues après une irradiation de 2Gy à 200 kV (source conventionnelle) (au dessus) ou à 78,8 keV, à l'aide du synchrotron (ID17) (en dessous). Ces photographies représentent en rouge (TRITC) la localisation de la protéine HSP70, en bleu (Dapi) les noyaux (cellules F98). Les temps de réparation sont indiqués au-dessus des photos. La concentration finale de cDDP est fixée à 10 µM. Les photographies du dessous, à gauche, représentent des photographies de cellules incubées avec une concentration finale en solution de 25 µM de wortmannine. Les temps de réparation sont indiqués au dessus des images. Ces images représentent des cellules agrandies 1000 fois. L'intensité de la lumière reste la même pour chaque marqueur.

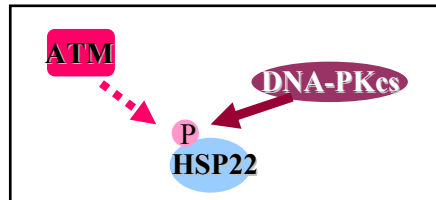
En considérant l'hypothèse que HSP70 aide à la réparation de l'ADN et que la PAT-Plat crée une augmentation du nombre d'adduits générant eux-mêmes un surcroît du nombre de cassures double brin lors de la réparation, il peut paraître logique que la réponse HSP70 apparaisse plus significative encore en conditions de synchrotron PAT-Plat. D'après les résultats précédents (III.3.1), l'expression nucléaire de HSP70 est apparue comme étant inhibée normalement par une concentration de 25 $\mu$ M de la drogue pharmaceutique wortmannine (étant donné qu'elle semble dépendante de la kinase ATM). Ici, en présence de wortmannine, une forte diminution de l'intensité du marquage est remarquée, allant jusqu'à une extinction quasiment totale du signal observé pour un temps de réparation équivalent à 4heures. Ceci suggère que, comme chez l'homme, l'expression de HSP70, dans les cellules de rat, est diminuée en présence de wortmannine. Elle serait donc probablement sous contrôle d'une ou plusieurs kinases apparentées à la famille des PI3kinases (l'homologue de ATM par exemple). La réponse HSP70 en conditions de PAT-Plat semble donc être inhibée en cas d'utilisation de la wortmannine.



**Figure 131) Modèle proposé pour la phosphorylation de HSP70 après stress**

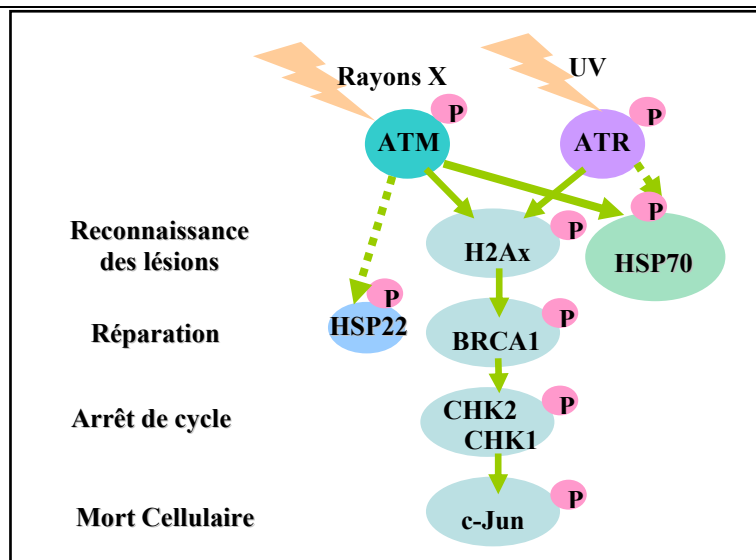
HSP70 serait phosphorylée avec une forte probabilité, après stress, par ATM sur ses sites SQ/TQ. HSP70 serait potentiellement phosphorylée par ATR après irradiation par rayonnement UV (sites SQ/TQ ; Foray N *et al*, 2003). HSP70 pourrait être phosphorylée, dans une moindre mesure, par DNA-PK sur ses sites SQ et TQ.

**Remarque :** les trois premiers sites SQ/TQ sont disposés à l'extérieur de la protéine, comme c'est indiqué dans la partie résultat IV-2 et le 4<sup>ème</sup> site TQ est supposé suivre la même orientation.



**Figure 132) Modèle proposé pour la phosphorylation de HSP22 après irradiation par rayonnement X**

HSP22 serait phosphorylée avec une forte probabilité, après irradiation par rayonnement X, par DNA-PK sur son site SQ. ATM pourrait aussi potentiellement phosphoryler ce même site.



**Figure 133) Proposition de positionnement pour HSP22 et HSP70 dans la réparation de l'ADN (modèle vertical)**

HSP70 serait activée dans les stades précoces de la réparation (au moment de la reconnaissance des lésions) et HSP22 serait, quant à elle, activée à un stade un peu plus tardif (au moment de la réparation de l'ADN par exemple).

### **III.4- Discussion et conclusions – radiobiologie : implication dans les voies de la réparation de l'ADN**

#### **III.4.1- Implication de la protéine humaine HSP70 dans la réparation de l'ADN**

La protéine HSP70 inductible par le stress (appellation regroupant apparemment plusieurs protéines : au moins HSP72 et HSP70-1 et sans doute HSP70-2) a été étudiée dans le cadre de la réparation de l'ADN. Les résultats présentés ont montré une surexpression de cette protéine, dans la lignée témoin, en présence de tous les stress testés (irradiation par rayonnement X, UV, présence de champ magnétique, incubation avec cis-platine ou avec peroxyde d'hydrogène). De plus, HSP70 possède la particularité de réaliser un déplacement du cytoplasme au noyau en cas de stress dans les cellules de rat et d'insecte (Velazquez et Lindquist, 1984 ; Welch et Suhan, 1986). Ce même déplacement a été observé dans les cellules humaines après rayons X, UV et champs magnétiques uniquement. HSP70 se redéplace ensuite du noyau au cytoplasme, et ce quelque soit la dose délivrée aux cellules. Ce phénomène a été nommé *navette nucléaire*. La protéine HSP70 présente une phosphorylation des sites SQ/TQ en cas de stress. La protéine HSP70-1 présente une phosphorylation en Ser<sup>254</sup> après irradiation par rayonnement X. Les expressions, de même que les phosphorylations et les déplacements de HSP70 (et notamment HSP70-1) sont bloqués par l'utilisation d'une drogue particulière, la wortmannine, à une concentration finale en solution dans le milieu de culture des cellules de 25 µM. La wortmannine est connue pour inhiber les enzymes apparentées à la famille des phosphatidylinositol-3-kinases (Sarkaria JN *et al*, 1998) et une concentration de 25 µM bloque totalement l'activité kinase de la protéine ATM. La caféine, quant à elle, permet d'inhiber plus spécifiquement ATM et ATR (Sarkaria JN *et al*, 1999). Il en résulte que c'est sous sa forme phosphorylée que HSP70 se déplace du cytoplasme au noyau et que la phosphorylation de cette protéine semble être effectuée par la kinase ATM, en cas d'irradiation (rayonnement X). Tomita M et ses collaborateurs avaient déjà montré en 2000 que la wortmannine (10 µM) était capable de supprimer ou de retarder l'induction de HSP70 (après différents stress dont choc thermique), sur des cellules de hamster (Tomita M *et al*, 2000). Ceci suggère que l'inhibition de la réponse HSP70 par la wortmannine semble effective aussi sur les cellules humaines.

Il faut noter que dans les lignées cellulaires tumorales mutées pour les protéines de réparation, des différences ont été observées dans la réponse HSP70, plus ou moins importantes suivant la protéine mutée. Ainsi dans la lignée mutée pour ATM, il n'apparaît ni déplacement de HSP70, ni de surexpression de HSP70 après stress. Ceci souligne encore l'importance de ATM pour la réponse HSP70 après stress.

L'étude des différents partenaires protéiques de HSP70 a permis de déterminer que HSP70 semblait interagir (directement ou indirectement) avec plusieurs protéines de réparation, *in vitro*, après stress, telles que ATM, ATR, DNA-PK, BRCA1, Rad51.

Il avait déjà été montré précédemment que HSF1 interagissait avec les DNA-PK, *in vitro*, après stress (Huang J *et al*, 1997), ce qui suggérait une action concomitante de la réponse HSP et de la réparation de l'ADN.

La réalisation de différents mutants a ensuite permis d'élaborer une hypothèse concernant le stade de la réparation de l'ADN auquel HSP70 serait activée. Il est ressorti de cette étude que la présence de HSP70 semble nécessaire à la phosphorylation de c-Jun, de CHK2, de BRCA1 et de l'histone H2Ax (et à la non phosphorylation de CHK1), ce qui suggère que HSP70 est activée au cours des stades précoces de la réparation de l'ADN. Lorsque HSP70-1 est surexprimée ectopiquement et de façon stabilisée, elle possède aussi une fonction anti-apoptotique, tout comme HSP72 (Guo F *et al*, 2005). De plus, le mutant sous exprimant HSP70 présente un phénotype radiosensible par rapport au témoin, ce qui sous

entend qu'il répare son ADN beaucoup moins bien que le témoin et que, a priori, le rôle joué par HSP70 dans la réparation de l'ADN s'avère être non négligeable. La figure 131 résume les différentes phosphorylations subies par HSP70 lors de la réparation de l'ADN.

#### **III.4.2- Implication de la protéine humaine HSP22 dans la réparation de l'ADN**

La protéine HSP22 semble, d'après les résultats obtenus, impliquée dans la réparation de l'ADN. Elle présente une phosphorylation de son site SQ et une surexpression en cas d'irradiation par rayonnement X. HSP22 réalise un déplacement depuis le cytoplasme jusqu'au noyau après irradiation par rayons X (et non après UV, ni après un traitement au cisplatine). Lorsqu'elle est dans le noyau, elle est généralement sous forme phosphorylée (sur la Ser<sup>190</sup> au minimum). HSP22 reste assez longtemps nucléaire après irradiation puisque pour un temps de réparation de 24h, elle apparaît toujours localisée dans le noyau. De plus, elle se retrouve colocalisée avec certaines protéines de la réparation (MRE11 et DNA-PK) lorsque ces dernières sont actives (Lavin MF, 2004), ce qui pourrait suggérer que HSP22 interagirait avec ces protéines et donc dans les voies de réparation correspondantes, soit, respectivement la recombinaison homologue (Paull TT et Gellert M, 1998) et la voie de réparation par suture (Lobrich M et Jeggo PA, 2005). Ces deux voies réparent les cassures double brin de l'ADN ; HSP22 aiderait donc à la réparation des cassures double brin.

L'étude des lignées cellulaires tumorales mutantes pour les protéines de réparation fait apparaître que DNA-PK et ATM semblent jouer un rôle important pour HSP22. Ce rôle consisterait en une phosphorylation de son site SQ. DNA-PK et ATM sont connues pour phosphoryler leurs substrats sur les sites SQ/TQ (Sarkaria JN, 1998 ; Foray N *et al*, 2003 ; Abraham RT, 2004). DNA-PK sous sa forme phosphorylée (donc activée) colocalise avec HSP22. ATM pourrait aussi phosphoryler HSP22 mais dans une moindre mesure ou de manière indirecte car moins immédiate après irradiation par rayonnement X puisque les foci HSP22 apparaissent plus tardivement (figure 132). Ceci sous entend que HSP22 semble agir plus tardivement que HSP70 dans la réparation de l'ADN.

L'étude des lymphocytes mutants en HSP22 a permis d'établir que les radiosensibilités semblaient être corrélées au site de mutation puisque lorsque HSP22 est mutée en K141N, les lignées cellulaires correspondantes apparaissent moins radiosensibles que la lignée portant la mutation R78M.

Le syndrome de dystrophie motrice, qui s'accompagne d'une de ces mutations faux sens, diffère lui aussi avec la localisation de la mutation. L'irradiation par rayons X des ces lignées fait apparaître un arrêt du cycle en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, quelque soit la dose d'irradiation reçue par les cellules. Ceci suggère que p53 n'est pas mutée dans ces lymphocytes mutants (Siles E *et al*, 1996). Ceci pourrait sous entendre, étant donné que la protéine CHK2 qui est responsable de l'arrêt de cycle en G<sub>1</sub> lorsqu'elle est phosphorylée, que CHK2 soit phosphorylée lorsque HSP22 est, elle-même, mutée (O'Connell MJ *et al*, 2000). Ce qui en d'autres termes pourrait signifier que HSP22 soit nécessaire au passage du check point G<sub>1</sub> (et à la non phosphorylation de CHK2), et donc, que HSP22 soit activée, a priori, plutôt au niveau de la réparation proprement dite (voir figure 133).

La surexpression de l'homologue drosophilien de HSP22 est connue pour augmenter la durée de vie de la mouche (Morrow G *et al*, 2004). La protéine HSP22 humaine semble aussi impliquée dans le phénomène de vieillissement cellulaire (Gire V, 2005), puisqu'elle apparaît sous forme de foci distincts pour des cellules issues de culture primaire à passage élevé et ce pour les deux types cellulaires testés (chondrocytes et fibroblastes, tous d'origine humaine), sans aucun stress. Le vieillissement cellulaire ou sénescence est un processus fortement contrôlé (Guarente L et Kenyon C, 2000 ; Place RF *et al*, 2005) et les résultats

observés ici pourraient sous entendre que HSP22 soit une des protéines impliquées dans ce contrôle.

Il est également envisageable, au vu des résultats obtenus (participation à la réponse à l'irradiation par rayonnement X et aux processus du vieillissement cellulaire), que HSP22, tout comme HSP27 avec laquelle elle interagit, soit impliquée dans la réponse au stress oxydatif (Benndorf R *et al*, 2001 ; Arrigo AP *et al*, 2005).

Remarque : les résultats concernant les colocalisations de marquage en immunofluorescence doivent être analysés avec précaution à cause de l'existence du phénomène de « bleed through » (Feige JN *et al*, 2005 et le site internet du microscope utilisé pour l'analyse de l'immunofluorescence : [www.olympusfluoview.com/theory/bleedthrough.html](http://www.olympusfluoview.com/theory/bleedthrough.html)). Ce phénomène consiste en le recoupement des spectres d'émission des deux fluorochromes les plus fréquemment employés en fusion sur les anticorps dans ce type d'expérience, c'est-à-dire la TRITC (thio rhodopsine iso thio cyanate) et la FITC (fluorescéine thio cyanate). Ceci se traduit par de nombreux artéfacts. Ainsi, des protéines qui ne colocalisent pas forcément risquent d'apparaître quand même colocalisées. Les résultats présentés pour la colocalisation de HSP70 et de HSP22 en sont un bon exemple. Il reste plus prudent de démontrer ces résultats par d'autres techniques comme les immunoprécipitations, les « pull down assays » et les immunofluorescences dites simples (c'est-à-dire utilisant un seul anticorps primaire). D'après les résultats obtenus, les protéines HSP22 et HSP70 seraient donc activées et requises pour aider les protéines des voies de réparation à réparer l'ADN endommagé. Etant donné que HSP22 et HSP70 sont des protéines chaperonnes et que par définition, elles accompagnent les autres protéines, il est possible d'envisager, en outre, un rôle d'adressage et de recrutement pour les deux protéines et éventuellement un rôle d'apport d'énergie sous forme d'ATP pour HSP70 dans les voies de réparation de l'ADN correspondantes. De plus, HSP22 et HSP70 ne semblent pas agir au même moment ni dans les mêmes voies de réparation. Ainsi, les protéines HSP semblent posséder une spécificité d'action dans les systèmes de réparation de l'ADN.

### **III.4.3- Impact radiobiologique de la méthode DEI**

Les résultats, obtenus en utilisant deux modèles de protéines  $\gamma$ H2Ax et HSP70, sont destinés à prouver la non invasivité de la technique d'imagerie DEI pour les patients/échantillons, d'un point de vue radiobiologique. Cette étude a montré une faible radiosensibilité des chondrocytes, même par rapport aux fibroblastes de peau et d'origine pulmonaire (Rothkamm K et Lobrich M, 2003). Une persistance dans le temps du nombre de foci  $\gamma$ H2Ax a été montrée pour les temps longs de réparation (vingt-quatre heures), et ce quelque soit la source de rayonnement X utilisée. Ce nombre reste néanmoins très faible pour des doses inférieures à 10 mGy, et, de plus, ces cassures double brin peuvent se réparer, jusqu'à ce que le taux de foci  $\gamma$ H2Ax revienne à la normale (taux basal sans irradiation).

L'impact de l'irradiation sur la morphologie cellulaire n'apparaît pas pertinent, puisque le taux des morphologies anormales, elles-mêmes potentiellement représentatives d'un phénomène de radiosensibilité aux faibles doses, est inférieur à 5%, sauf pour la morphologie multi lésée des fibroblastes. Les effets visibles peuvent être attribués à d'autres phénomènes comme le vieillissement cellulaire ou la synthèse d'ADN (au cours de la phase S du cycle cellulaire : un gonflement du noyau cellulaire apparaît). Ainsi, la radiosensibilité des fibroblastes se trouve être, au vu de ces résultats, sensiblement plus marquée que celle des chondrocytes, mais ceci pourrait être expliqué par un état de sénescence plus avancé des cellules, le nombre de passages subis par les fibroblastes étant supérieur.

Les applications futures de la technique de DEI sont d'imager les articulations de patients, et par ce moyen, de faire progresser l'analyse biomédicale du cartilage.

L'irradiation en mode DEI ne paraît pas, a priori et au vu de ces résultats, plus toxique qu'une irradiation à l'aide d'une source conventionnelle, pour ce type de dose ( $\approx 9$  mGy) et pour des fibroblastes non transformés (Rothkamm K et Lobrich M, 2003).

#### **III.4.4- HSP70 dans la « synchrotron PAT-Plat »**

La « synchrotron PAT-Plat » est une nouvelle méthode de thérapie combinant l'utilisation d'une drogue chimiothérapique, le cis-platine, et l'irradiation par rayonnement X monochromatique à l'énergie du seuil K de l'élément platine (Biston MC *et al*, 2004). La réponse HSP70 a été étudiée en condition de « synchrotron PAT-Plat » sur le modèle de lignée cellulaire gliomale de rat (F98), utilisé au laboratoire. La réponse HSP70 est apparue intensifiée en condition PAT-Plat sur ce modèle. Cependant, l'ajout d'une autre drogue, la wortmannine, a permis d'inhiber quasiment complètement la réponse HSP70, dans ces mêmes conditions. Ceci peut être expliqué par l'implication de HSP70 dans la réparation de l'ADN. En effet, puisqu'il y a un surcroît de dommages créés, HSP70 serait alors logiquement plus active et plus exprimée, ce qui expliquerait la forte réponse HSP70 observée, pour ce modèle cellulaire. La wortmannine semble capable, même dans les cellules de rats, de bloquer une forte réponse HSP70, ce qui suggère que l'activation et l'expression de HSP70 est contrôlée et dépendante d'une enzyme apparentée à la famille des PI3kinases. D'après les autres résultats et puisque la concentration utilisée inhibe ATM, il apparaît plausible que ce soit principalement ATM qui contrôle la réponse HSP70 en condition « synchrotron PAT-Plat » dans ce modèle cellulaire (figure 54). HSP70 est susceptible, dans ce cas précis, d'aider à la réparation des dommages de l'ADN par le système de réparation par recombinaison homologue. Chez d'autres cellules de rongeurs, la wortmannine a démontré sa capacité à retarder ou bloquer la réponse HSP70, et ceci même pour une concentration finale de wortmannine en solution beaucoup plus faible (10 $\mu$ M) (Tomita M *et al*, 2000). HSP70 semble donc être impliquée dans les mécanismes de la « synchrotron PAT-Plat » et plutôt dans les stades précoces, puisque dès une heure après irradiation en condition de « synchrotron PAT-Plat », la réponse HSP70 atteint un maximum.

## **IV- Conclusions et perspectives**

### **Avant propos**

Cette thèse comportait au départ un objectif double :

- 1- L'étude structurale des protéines humaines inductibles par le stress HSP70 et HSP22.
- 2- L'étude de ces protéines humaines HSP70 et HSP22 dans les mécanismes de la réparation de l'ADN.

A cause du temps imparti pour parachever cette thèse, le premier but a seulement été initié et des prédictions de structures de ces protéines ont été obtenues. Le second objectif a pu être mené à bien. D'autres expériences impliquant les HSP et se rapportant aux expériences en cours sur la ligne biomédicale ID17 du synchrotron ESRF furent réalisées. Ainsi, la réponse HSP70 fut investiguée dans le cadre de l'étude de la radiosensibilisation d'une nouvelle méthode d'imagerie à visée histologique : la DEI (Chapman D *et al*, 1997) et en conditions de « synchrotron PAT-Plat », une thérapie visant à traiter les glioblastomes (Biston MC *et al*, 2004), sur les modèles cellulaires correspondants.

### **IV.1- Conclusions**

Les protéines chaperonnes humaines HSP70-1 et HSP22 furent étudiées dans cette thèse à cause de leurs nombreuses fonctions et implications dans les mécanismes cellulaires mais aussi à cause de la présence de sites de phosphorylation substrats potentiels de kinases de la réparation dans leurs séquences en acides aminés (Abraham RT, 2004). Dans le but de mieux les connaître, des procédés d'expression de ces protéines en vue de la cristallisation pour l'étude structurale ont été initiés. Des prédictions de structures concernant HSP70-1 (partie C-terminale) et HSP22 furent réalisées à l'aide d'outils bioinformatiques, montrant une organisation majoritairement en feuillets  $\beta$  pour HSP22 (surtout au niveau du domaine  $\alpha$ -cristallin, Ehrnsperger M *et al*, 1997) et pour le domaine de liaison du substrat pour HSP70-1 (Zhu X *et al*, 1996). Le domaine  $\alpha$ -cristallin de la famille des sHSP, dont HSP22 fait partie, présente la particularité de posséder une structure tridimensionnelle fortement conservée à travers l'évolution ; par contre, sa séquence en acides aminés est peu conservée, alors que c'est généralement le cas chez les HSP.

Cette thèse décrit des travaux visant à déterminer l'implication, dans les voies de réparation de l'ADN après stress, de protéines humaines de choc thermique HSP70 et HSP22. HSP70 présente une délocalisation (nommée « navette nucléaire ») entre le cytoplasme et le noyau (Velazquez et Lindquist, 1984 ; Welch et Suhan, 1986 ; respectivement dans des cellules d'insectes et de rats), dans les cellules humaines, suivie d'un retour dans le cytoplasme, après certains stress seulement (rayonnement X et UV, champ magnétique). Cette protéine présente une surexpression après tous les stress testés (rayonnement X et UV, champ magnétique, peroxyde d'hydrogène, cis-platine). HSP70-1 est phosphorylée en Ser<sup>254</sup> lors de ce déplacement. Cette phosphorylation est effectuée par la kinase ATM lors d'une irradiation par rayonnement X. HSP70 (HSP72) est elle aussi phosphorylée par ATM lors de ce déplacement sur d'autres sites SQ/TQ. ATR et DNA-PK sont aussi susceptibles de réaliser cette phosphorylation ; ces résultats ont été montrés par l'utilisation de différentes lignées cellulaires mutées dans les protéines de réparation. HSP70 a montré son implication dans les stades précoces de la réparation de l'ADN après stress, grâce à l'étude des mutants HSP70 réalisés. La déplétion de HSP70 s'est traduite par un phénotype radiosensible.



Comme HSP70, HSP22 apparaît surexprimée dans le noyau après irradiation par rayonnement X mais non après irradiation par rayonnement UV. HSP22 s'est révélée comme étant le substrat de phosphorylation de DNA-PK et ATM, et, comme étant impliquée dans les voies de réparation des cassures double brin de l'ADN après irradiation par rayonnement X (Paull TT et Gellert M, 1998 ; Lobrich M et Jeggo PA, 2005). HSP22 a la particularité de s'organiser en foci après rayonnement X mais aussi dans les cellules âgées, ce qui sous entend une implication de HSP22 dans les phénomènes de vieillissement cellulaire, comme ceci a déjà été montré chez la drosophile (Morrow G *et al*, 2004). Des lymphocytes mutants en HSP22 provenant de patients atteints de dystrophies motrices furent analysés. Suivant la localisation de la mutation sur le gène HSP22, ces lymphocytes ne présentent pas la même radiosensibilité.

Concernant les applications du rayonnement synchrotron, la méthode d'imagerie à visée histologique aussi nommée Diffraction Enhanced Imaging (DEI ; Chapman D *et al*, 1997) a été testée d'un point de vue radiobiologique sur des cultures humaines primaires de fibroblastes et de chondrocytes, à l'aide des marqueurs HSP70 et  $\gamma$ H2Ax. Ces cellules furent utilisées pour modéliser la réaction du cartilage qui est le modèle tissulaire étudié au laboratoire. Ce type d'imagerie n'est pas apparu plus néfaste pour les tissus sains qu'une irradiation de même dose, utilisant une source conventionnelle (Rothkamm K et Lobrich M, 2003).

L'étude de HSP70 dans le cadre d'une nouvelle méthode de thérapie dédiée au traitement du cancer : la « Synchrotron PAT-Plat » (Corde S *et al*, 2003 ; Biston MC *et al*, 2004) montre une augmentation de la réponse HSP70, dans les cellules de glioblastome de rat F98 utilisées comme modèle.

## **IV.2- Perspectives**

### **IV.2.1- Optimisation des conditions de cristallisation et de préparation à la cristallisation des deux chaperonnes humaines**

Les constructions obtenues (pRSET-HSP70-1 et pRSET-HSP22) pourraient être testées en fonction de l'expression protéique et de la solubilité. Si les taux de protéines produites sont suffisants pour des essais de cristallisation, ces essais pourraient être pratiqués. Dans le cas présent, les bactéries pouvaient être utilisées comme hôtes de production des protéines parce que les HSP sont bien conservées à travers l'évolution (séquence en acides aminés et/ou structure tridimensionnelle) et que, par conséquent, les similarités entre les protéines HSP bactériennes et humaines sont grandes. Néanmoins, généralement, les protéines humaines produites dans des bactéries sont insolubles, toxiques pour les bactéries et ne se plient pas dans leur conformation native. C'est pourquoi, de plus en plus de productions de protéines humaines en vue d'étude structurale par cristallographie par rayons X sont pratiquées dans d'autres types cellulaires que des bactéries et notamment dans les cellules de levure et d'insectes (Choe J *et al*, 2005). De plus, à cause des nombreuses modifications post-traductionnelles spécifiques des protéines de mammifères, les protéines humaines produites par ce type d'hôte ne sont pas fonctionnelles. Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) et mieux des cellules humaines de type HeLa ou 1BR3Neo, par exemple, pourraient servir de producteur de protéines humaines, à l'aide d'un vecteur de type pcDNA agrémenté d'une étiquette fusion de 6-histidines pour faciliter l'étape de purification ; bien qu'il reste difficile de produire des quantités suffisantes de protéines à l'aide des cellules de mammifères. Les cellules de mammifères auraient l'avantage de ne pas produire des protéines qui seraient toxiques pour elles. L'utilisation de cellules de mammifères permettrait aux protéines

produites de se plier dans leur conformation native. De plus les modifications post-traductionnelles, nécessaires au bon fonctionnement des protéines, pourraient s'effectuer plus facilement étant donné que toutes les enzymes responsables de ces modifications sont naturellement présentes dans les cellules de mammifères (Sun J *et al*, 2006).

Du fait de leurs nombreuses fonctions et implications dans les mécanismes cellulaires, les structures tridimensionnelles des protéines de choc thermique, comme HSP70 et HSP22 par exemple, pourraient être utilisées typiquement dans une optique de *drug design*\* (voir annexe II-f).

#### **IV.2.2- Suite de l'étude des protéines HSP dans la réparation de l'ADN**

De part leurs fonctions (repliement des protéines néosynthétisées, adressage, empêchement d'agrégation des protéines mal pliées (...)) et leur implication dans les voies de signalisation cellulaire, les HSP gagneraient à être étudiées dans le cadre de la réparation de l'ADN et notamment en vue d'éventuelles applications médicales. A terme, toutes les HSP, ou du moins un représentant de chaque grande sous-famille pourrait être testé dans les voies de la réparation de l'ADN après stress (par exemple après radiations ionisantes).

Pour parfaire l'étude sur HSP22, des mutants de surexpression stabilisée et de sous expression à l'aide de siRNA spécifiques aideraient à positionner plus précisément HSP22 dans le modèle vertical de la réparation de l'ADN.

La même démarche que celle effectuée pour HSP70 (voir chapitre III.3.1) pourrait être utilisée pour HSP40, co-chaperonne de HSP70 (Flaherty KM *et al*, 1990). HSP40 pourrait théoriquement être impliquée dans les voies de la réparation de l'ADN. HSP110, très similaire à HSP70 et relativement peu étudiée, pourrait également faire l'objet d'une étude analogue (Oh HJ *et al*, 1997).

## **IV.1- Conclusions**

This thesis describes the work performed on human heat shock proteins HSP70 and HSP22 in the context of DNA repair. HSP70 exhibits a displacement between cytoplasm and nucleus (named “nucleoshuttling”) after stress (UV, X-rays, magnetic field) (Velazquez and Lindquist, 1984; Welch and Suhan, 1986; respectively in insects and rodent cells), in human cells, the shuttling occurring in two phases: cytoplasm to nucleus followed by nucleus to cytoplasm. Furthermore, HSP70 shows an over expression after all cellular stresses tested (UV, X-rays, magnetic field, hydrogen peroxide and cis-platin). HSP70-1 is phosphorylated on Ser<sup>254</sup> by DNA repair kinase ATM, during the nucleoshuttling after X-ray irradiation. HSP70 is also phosphorylated by ATM during nucleoshuttling on other SQ/TQ sites. The study of DNA-repair mutated cell lines has shown that other DNA repair kinases such as ATR and DNA-PK are also involved in HSP70 phosphorylation. A study of HSP70 mutants suggests that HSP70 is implicated in early stage DNA repair.

HSP22 is an ATM and DNA-PK phosphorylation substrate; HSP22 is connected closely to repair of DNA double strand breaks after X-ray irradiation (Paull TT and Gellert M, 1998; Lobrich M and Jeggo PA, 2005). HSP22 forms nuclear foci following X-ray irradiation and in aged cells, suggesting a possible involvement of HSP22 in the aging process, as has already been shown for the HSP22 homologs in *Drosophila* (Morrow G *et al*, 2004).

Protein expression tests, in order to carry out crystallization trials and to obtain three-dimensional structures of HSPs, have been initiated. Structural predictions have been performed for HSP70-1 (C-terminal part) and HSP22 by using bioinformatics tools, suggesting a  $\beta$  sheet folded organization for HSP22 (especially for  $\alpha$ -crystallin domain, Ehrnsperger M *et al*, 1997) and for the HSP70-1 substrate binding domain (Zhu X *et al*, 1996).

Diffraction Enhanced Imaging (DEI; Chapman D *et al*, 1997) has been tested in a radiobiological context on human primary culture cells (fibroblasts and chondrocytes) by using HSP70 and  $\gamma$ H2Ax markers. It appears that this novel imaging technique is no more harmful for healthy tissue than irradiation with the same dose using a conventional source (Rothkamm K and Lobrich M, 2003).

HSP70 has been studied in a novel therapy devoted to curing cancer, the “Synchrotron PAT-Plat” method (Corde S *et al*, 2003; Biston MC *et al*, 2004), indicating an increased HSP70 response in rat glioblastoma cellular model.

## **IV.2- Prospective**

### **IV.2.1- Optimization of crystallization conditions and preparation to crystallization of the two human chaperon proteins**

The constructs obtained (pRSET-HSP70-1 and pRSET-HSP22) could be tested for protein production and solubility. If the protein level produced reaches that required for crystallisation trials, these leads should be, of course, followed up. In this case, bacterial expression systems could also be tested for protein production. Because HSPs are highly conserved thorough evolution (amino acid sequence and/or three-dimensional structure), Human HSPs and their Bactrian homologs are very similar. Nevertheless, human proteins produced in bacteria are often insoluble, toxic for the bacteria and are rarely folded in their native conformation. This is why, for structural studies using X-ray crystallography, more and more human proteins are produced in other cellular types, for instance in yeast or in insects

cells (Choe J *et al*, 2005). However, due to the many specific post-translational modifications occurring in mammalian proteins, human proteins synthesized by these types of hosts of production are often not functional. Chinese Hamster Ovary cells (CHO) or even human cells (for example HeLa or 1BR3Neo) could be used as protein production hosts with, for instance, pcDNA vector modified by addition of a 6-histidines purification tag, though mammalian cells are not easy to grow in the very large levels needed for protein production.. This kind of host would have the advantage of not producing self-toxic proteins. The use of mammalian cells should also permit newly synthesized human proteins to fold in their native conformation. Furthermore, post-translational modifications could be made more easily since specific enzymes required for these modifications are normally present in mammalian cells (Sun J *et al*, 2006).

Because of their numerous functions and involvements in cellular mechanisms, the three dimensional models of HSPs, such as for instance HSP70 and HSP22, could be used in a rational drug design\* study (see appendix II-f).

#### **IV.2.2- Continuation of HSP study in DNA repair**

Because of their diverse functions (protein refolding and addressing, preventing damaged proteins from aggregation) and their involvement in many cellular signalling pathways, HSPs should continue to be studied in relation to DNA repair, this could lead to potential medical applications. For instance, a member of each HSP subfamily could be tested in DNA repair after stress by ionizing radiation.

To complete the HSP22 study, stabilized over expression mutants and underexpression mutants (by using siRNA) could be created and would help to place HSP22 more precisely within the DNA repair vertical model.

The approach used for the HSP70 study (see chapter III.3.1) could be reproduced with the HSP70 co-chaperone HSP40 (Flaherty KM *et al*, 1990) and also with HSP110 (Oh HJ *et al*, 1997) because of its high similarity with HSP70.

## **Références**

### **1- Articles scientifiques**

*Classement par thème.*

#### **1.1- Radiobiologie et cancérologie**

1. Abraham RT. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair* 2004; 3:883.
2. Ali ST, Coggins JR, Jacobs HT. The study of cell-death proteins in the outer mitochondrial membrane by chemical cross-linking. *Biochemical journal* 1997; 325:321.
3. Alphonse G, Bionda C, Aloy MT, Ardail D, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C. Overcoming resistance to gamma-rays in squamous carcinoma cells by poly-drug elevation of ceramide levels. *Oncogene* 2004; 23:2703.
4. Angel P, Allegretto EA, Okino ST, Hattori K, Boyle WJ, Hunter T, Karin M. Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* 1988; 332:166.
5. Aravind L, Makarova K, Koonin EV. Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Research* 2000; 28:3417.
6. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeih G, Pantellias GE, Okayasu R, Cheong N, Russell NS, Begg AC, Arlett CF. Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient. *Cancer Research* 1995; 55:1232.
7. Ball LG, Xiao W. Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; 26:897.
8. Bannister AJ, Gottlieb TM, Kouzarides T, Jackson SP. c-Jun is phosphorylated by the DNA-dependent protein kinase in vitro; definition of the minimal kinase recognition motif. *Nucleic Acids Research* 1993; 21:1289.
9. Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw-Boris A, Kastan MB, Wang JY. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* 1997; 387:516-519.
10. Benson FE, Stasiak A, West SC. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO Journal* 1994; 13:5764.
11. Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochemical journal* 2004; 382:527.
12. Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 1987; 238:1386.
13. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1995; 92:7162.
14. Bossy-Wetzell E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO Journal* 1998; 17:37.
15. Bourteele S, Hausser A, Doppler H, Horn-Muller J, Ropke C, Schwarzmann G, Pfizenmaier K, Muller G. Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells. *Journal of biological chemistry* 2000; 273:31245.
16. Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in Cellular Biology* 2001; 11:S27.
17. Chavaudra N, Bourhis J, Foray N. Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiotherapy and Oncology* 2004; 73:373.

18. Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999; 286:1162.
19. D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nature Review. Cancer.* 2003; 3:23.
20. Dikomey E, Borgmann K, Brammer I, Kasten-Pisula U. Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology* 2003; 193:125.
21. Donaldson SS. Lessons from our children. *International journal of radiation biology* 1993; 26:739.
22. Dong Z, Zhong Q, Chen PL. The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *Journal of biological chemistry* 1999; 274:19513.
23. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine* 1971; 285:1182.
24. Foray N, Monroco C, Marples B, Hendry JH, Fertil B, Goodhead D T, Arlett C F, Malaise EP. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts is consistent with a continuous spectrum of repair probability. *International journal of radiation biology* 1998; 74:551.
25. Foray N, Marot D, Randrianarison V, Venezia ND, Picard D, Perricaudet M, Favaudon V, Jeggo P. Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22:4020.
26. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *The EMBO journal* 2003; 22:2860.
27. Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *International Journal of radiation biology* 1997; 72:271.
28. Foster E, Downs J. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS journal* 2005; 272:3231.
29. Frankenber-Schwager M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiotherapy and Oncology* 1989; 14:307.
30. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature Review. Cancer.* 2001; 1:22.
31. Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Research* 2000; 60:3299.
32. Gatei M, Zhou BB, Hobson K, Scott S, Young D, Khanna KK. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *Journal of biological chemistry* 2001; 276:17276.
33. Gatz SA, Wiesmuller L. p53 in recombination and repair. *Cell Death and Differentiation* 2006.
34. Gire V. Senescence: a telomeric limit to immortality or a cellular response to physiologic stresses? *Medecine Sciences (Paris)* 2005.
35. Goodhead DT. The initial physical damage produced by ionizing radiations. *International journal of radiation biology* 1989; 56:623.
36. Guarente L, Kenyon C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 2000; 408:255.
37. Gullino JM. Angiogenesis and oncogenesis. *Journal of National Cancer Institute* 1978; 61:639.
38. Guo F, Rocha K, Bali P, Pranpat M, Fiskus W, Boyapalle S, Kumaraswamy S, Balasis M, Greedy B, Armitage ES, Lawrence N, Bhalla K. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Research* 2005; 65:10536.
39. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411:366.
40. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1991; 88:6961.
41. Hopwood LE, Tolmach LJ. Deficient DNA synthesis and mitotic death in x-irradiated HeLa cells. *Radiation Research* 1971; 46:70.

42. Jacobs-Helber S M, Wichrema A, Birrer MJ, Sawyer ST. AP1 Regulation of Proliferation and Initiation of Apoptosis in Erythropoietin-Dependent Erythroid Cells. *Molecular and cellular biology* 1998; 18:3699–3707.
43. Kassem HS, SV, Cowan R, Clarke N, Margison GP. A potential role of heat shock proteins and nicotinamide N-methyl transferase in predicting response to radiation in bladder cancer. *International journal of cancer* 2002; 101:454.
44. Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nature Genetics* 1998; 20:398.
45. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell death and differentiation* 2001; 8:1052.
46. Kim JM, Bae HR, Park BS, Lee JM, Ahn HB, Rho JH, Yoo KW, Park WC, Rho SH, Yoon HS, Yoo YH. Early mitochondrial hyperpolarization and intracellular alkalinization in lactacystin-induced apoptosis of retinal pigment epithelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 305:474.
47. Kim H, Kim YN, Kim H, Kim CW. Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction. *Oncogene* 2005; 24:1252.
48. Lavin MF. The Mre11 complex and ATM: a two-way functional interaction in recognising and signaling DNA double strand breaks. *DNA repair* 2004; 3:1515.
49. Lee SB, Kim SH, Bell DW, Wahrer DC, Schiripo TA, Jorczak MM, Sgroi DC, Garber JE, Li FP, Nichols KE, Varley JM, Godwin AK, Shannon KM, Harlow E, Haber DA. Destabilization of CHK2 by a missense mutation associated with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Research* 2002; 61:8062.
50. Lees-Miller SP, Anderson CW. The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 alpha at two NH2-terminal threonine residues. *Journal of biological chemistry* 1989; 264.:17275.
51. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA repair* 2004; 3:817.
52. Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science* 1999; 86:1897.
53. Liu Q, Guntuku S, Cui X.-S, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint.". *Genes and Development* 2000; 14:1448.
54. Liu SH, Ma JT, Yueh AY, Lees-Miller SP, Anderson CW, Ng SY. The carboxyl-terminal transactivation domain of human serum response factor contains DNA-activated protein kinase phosphorylation sites. *Journal of biological chemistry* 1993; 268:21147.
55. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86:147.
56. Lobrich M, Jeggo PA. Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA repair* 2005; 4:749.
57. Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *journal of Neuropathology and experimental Neurology* 1994; 53:11.
58. Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA. Genes involved in senescence and immortalization. *Current Opinion in Cell Biology* 2000; 12:705.
59. McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *the journal of cell biology* 1997; 136:215.
60. Morrison C, Smith GC, Stingl L, Jackson SP, Wagner EF, Wang ZQ,. Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis. *Nature Genetics* 1997; 17:479.
61. Murphy MP. Nitric oxide and cell death. *Biochimica and Biophysica Acta* 1999; 1411:401.
62. Nikjoo H, O'Neill P, Goodhead DT, Terrissol M. Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *International journal of radiation biology* 1997; 71:467.
63. O'Connell MJ, Walworth NC, Carr AM. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends in cell biology* 2000; 10:296.

64. Orre LM, Stenerlow B, Dhar S, Larsson R, Lewensohn R, Lehtio J. p53 is involved in clearance of ionizing radiation-induced RAD51 foci in a human colon cancer cell line. *Biochemical and Biophysical research communications* 2006; 342:1211.
65. Pages V, Fuchs RP. How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* 2002; 21:8957.
66. Palumbo G, Varriale L, Paba V, Sasso A, Crescenzi E, Gialanella G, Grossi G, Pugliese MG, Scamporrino P. Effect of space radiation on expression of apoptosis-related genes in endometrial cells: a preliminary study. *Physica Medica* 2001; XVII:supplement 1.
67. Park EJ, Chen DW, Park JH, Oettinger MA, Kwon J. DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Research* 2003; 31:6819.
68. Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Molecular cell* 1998; 1:969.
69. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2004; 59:928-42.
70. Place RF, Noonan EJ, Giardina C. HDACs and the senescent phenotype of WI-38 cells. *BMC cell biology (electronic resource)* 2005.
71. Rashmi R, Kumar S, Karunakaran D. Ectopic expression of Hsp70 confers resistance and silencing its expression sensitizes human colon cancer cells to curcumin-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 2004; 25:179.
72. Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology* 2003; 23:5706.
73. Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Research* 1999; 59:4375.
74. Sarkaria JN, Tibbetts RS, Busby EC, Kennedy AP, Hill DE, Abraham RT. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Research* 1998; 58:4375.
75. Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes and Development* 2000; 14:289.
76. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; 91:325.
77. Simonelli V, Narciso L, Dogliotti E, Fortini P. Base excision repair intermediates are mutagenic in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 2005; 33:4404.
78. Soldatenkov VA, Dritschilo A. Apoptosis of Ewing's sarcoma cells is accompanied by accumulation of ubiquitinated proteins. *Cancer Research* 1997; 57:3881.
79. Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewska J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature Cell Biology* 2005; 7:195.
80. Spiridonov NA, Wong L, Zervas PM, Starost MF, Pack SD, Paweletz CP, Johnson GR. Identification and characterization of SSK1, a serine/threonine protein kinase essential for male fertility. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25:4250.
81. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 1999; 99:577.
82. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Abersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441.
83. Suzuki M, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. Interstitial chromatin alteration causes persistent p53 activation involved in the radiation-induced senescence-like growth arrest. *Biochemical and Biophysical research communications* 2006; 340:145-50.



84. Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, Abraham RT. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes and Development* 2000; 14:2989.
85. Tsujimoto Y. Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death and Differentiation* 1997; 4:429.
86. Ueda K, Kosako H, Fukui Y, Hattori S. Proteomic identification of Bcl2-associated athanogene 2 as a novel MAPK-activated protein kinase 2 substrate. *Journal of biological chemistry* 2004; 279:41815.
87. Valentiner U, Brooks SA, Schumacher U. In vivo xenograft models of breast cancer metastasis. *Methods in molecular medicine* 2006; 120:479.
88. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia* 2002; 31:214.
89. van Veelen LR, Cervelli T, van de Rakt MW, Theil AF, Essers J, Kanaar R. Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins. *Mutation Research* 2005; 574:22.
90. Wright WE, Shay JW. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Current Opinion in Genetics and Development* 2001; 11:98.
91. Xu B, O'Donnell AH, Kim ST, Kastan MB. Phosphorylation of serine 1387 in BRCA1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Research* 2002; 62:4588.
92. Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 2003; 24:1571-80.
93. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nature Genetics* 2002; 30:285.
94. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochemical and Biophysical research communications* 2005; 331:851.
95. Zakarija A, Soff G. Update on angiogenesis inhibitors. *Current Opinion in Oncology* 2005; 17:578.
96. Zhao H, Piwnica-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and cellular biology* 2001; 21:4129.
97. Zhang Y, Zhou J, Lim CU. The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Research* 2006; 16:45.
98. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408:433.

## **2- Les protéines de choc thermique**

1. Allan RK, Mok D, Ward BK, Ratajczak T. Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90: evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:7161-71.
2. Altomare K, Greco V, Bellizzi D, Berardelli M, Dato S, DeRango F, Garasto S, Rose G, Feraco E, Mari V, Passarino G, Franceschi C, De Benedictis G. The allele (A)(-110) in the promoter region of the HSP70-1 gene is unfavorable to longevity in women. *Biogerontology* 2003; 4:215.
3. Arrigo AP, Suhan JP, Welch WJ. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Molecular and cellular biology* 1988; 8:5059.
4. Arrigo AP, Paul C, Ducasse C, Manero F, Kretz-Remy C, Virost S, Javouhey E, Mounier N, Diaz-Latoud C. Small stress proteins: novel negative modulators of apoptosis induced independently of reactive oxygen species. *Progress in molecular and subcellular biology* 2002; 185-204:28.
5. Arrigo AP, Virost S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxidants and redox signaling* 2005; 7:414-22.
6. Auger I, Roudier J. Interaction between HSP73 and HLA-DRB1\*0401: implications for the development of rheumatoid arthritis. *Immunologic Research* 2005; 31:261.
7. Augusteyn RC. alpha-crystallin: a review of its structure and function. *Clinical and experimental optometry* 2004; 87(6):356-66:87(6):356.

8. Balog A, Gal J, Gyulai Z, Zsilak S, Mandi Y. Tumour necrosis factor-alpha and heat-shock protein 70-2 gene polymorphisms in a family with rheumatoid arthritis. *Acta Microbiologica Immunologica Hungaria* 2004; 51:263.
9. Balog A, Gyulai Z, Boros LG, Farkas G, Takacs T, Lonovics J, Mandi Y. Polymorphism of the TNF-alpha, HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2005; 30:46.
10. Beere HM, Wolf B, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology* 2000; 2:469.
11. Benndorf R, Sun X, Gilmore RR, Biederman KJ, Molloy MP, Goodmurphy CW, Cheng H, Andrews PC, Welsh MJ. HSP22, a new member of the small heat shock protein superfamily, interacts with mimic of phosphorylated HSP27 ((3D)HSP27). *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:26753.
12. Berger EM, Woodward M. Small heat shock proteins in *Drosophila* may confer thermal tolerance. *Experimental Cell Research* 1983; 147:437.
13. Blake MJ, Gershon D, Fargnoli J, Holbrook NJ. Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats. *Journal of biological chemistry* 1990; 265:15275.
14. Brady JP, Garland D, Douglas-Tabor Y, Robison WG Jr, Groome A, Wawrousek EF. Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proceedings of National Academy of Science U S A.* 1997; 94:884.
15. Brady JP, Garland D, Green DE, Tamm ER, Giblin FJ, Wawrousek EF. AlphaB-crystallin in lens development and muscle integrity: a gene knockout approach. *Investigating Ophthalmology and Visual Science* 2001; 42:2924.
16. Brondani Da Rocha A, Regner A, Grivicich I, Pretto Schunemann D, Diel C, Kovaleski G, Brunetto De Farias C, Mondadori E, Almeida L, Braga Filho A, Schwartzmann G. Radioresistance is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines. *International Journal of Oncology* 2004; 25:777.
17. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biology* 2000; 2:645.
18. Buchner J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends in Biochemical Science* 1999; 24:136.
19. Burel C, Mezger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S, Morange M. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia.* 1992; 48:629.
20. Cantuti-Castelvetri I, Klucken J, Ingelsson M, Ramasamy K, McLean PJ, Frosch MP, Hyman BT, Standaert DG. Alpha-synuclein and chaperones in dementia with Lewy bodies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2005; 64:1058.
21. Carper SW, Rocheleau T, Cimino D, Storm FK. Heat shock protein 27 stimulates recovery of RNA and protein synthesis following a heat shock. *Journal of Cellular Biochemistry* 1997; 66:153.
22. Carra S, Sivilotti M, Chavez Zobel AT, Lambert H, Landry J. HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells. *Human Molecular Genetics* 2005; 15::1659.
23. Chavaudra N, Bourhis J, Foray N. Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiotherapy and oncology* 2004; 73:373.
24. Chen Y, Ross BM, Currie RW. Heat shock treatment protects against angiotensin II-induced hypertension and inflammation in aorta. *Cell Stress and Chaperones* 2004; 9:99.
25. Chiosis G, Caldas Lopes E, Solit D. Heat shock protein-90 inhibitors: a chronicle from geldanamycin to today's agents. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2006; 7:534-41.
26. Chouchane L, Danguir J, Beji C, Bouassida K, Camoin L, Sfar H, Gabbouj S, Strosberg AD. Genetic variation in the stress protein hsp70-2 gene is highly associated with obesity. *International Journal of Obesity Related Metabolism Disorders* 2001; 25:462.
27. Chowdary TK, Ramam B, Ramakrishna T, Rao CM. Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity. *Biochemical Journal* 2004; 381:379.

28. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress and Chaperones* 2005; 10:86.
29. Ciocca DR, Asch R, Adams DJ, McGuire WL. Evidence for modulation of a 24K protein in human endometrium during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993; 57:496.
30. Clarimon J, Bertranpetit J, Boada M, Tarraga L, Comas D. HSP70-2 (HSPA1B) is associated with noncognitive symptoms in late-onset Alzheimer's disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 2003; 16:146.
31. Corey LL, Weirich CS, Benjamin IJ, Kingston RE. Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. *Genes and Development* 2003; 17:1392.
32. Creagh EM, Sheehan D, Cotter TG. Heat shock proteins--modulators of apoptosis in tumour cells. *Leukemia* 2000; 14:1161.
33. Csermely P, Soti C, Kalmar E, Papp E, Pato B, Vermes A, SA. Molecular chaperones, evolution and medicine. *Journal of Molecular Structure* 2003; 666-667:373.
34. Cuesta R, Laroia G, Schneider RJ. Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes and Development* 2000; 14:1460.
35. Cui CW, Yang S, Liu YP, Liu YF. Interaction between p53 and HSP70 in human hepatocellular carcinoma tissues. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2003; 19:195.
36. Daugaard M, Jaattela M, Rohde M. Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* 2005; 4:877.
37. Debes A, Oerding M, Willers R, Gobel U, Wessalowski R. Sensitization of human Ewing's tumor cells to chemotherapy and heat treatment by the bioflavonoid quercetin. *Anticancer research* 2003; 23:3359.
38. Delmas F, Trocheris V, Miro C, Murat JC, Villaescusa I. Expression of stress proteins in cultured human cells as a sensitive indicator of metal toxicity. *Analytic and Bioanalytic chemistry* 1996; 354:615.
39. Delneste Y. Scavenger receptors and heat-shock protein-mediated antigen cross-presentation. *Biochemical society transactions* 2004; 32:633.
40. Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress and Chaperones* 2006; 11:116-28.
41. Dierick I, Irobi J, De Jonghe P, Timmerman V. Small heat shock proteins in inherited peripheral neuropathies. *Annals of medicine* 2005; 37:413.
42. Dressel R, Johnson J, Gunther E. Heterogeneous patterns of constitutive and heat shock induced expression of HLA-linked HSP70-1 and HSP70-2 heat shock genes in human melanoma cell lines. *Melanoma research* 1998; 8:482.
43. Eddy EM. HSP70-2 heat-shock protein of mouse spermatogenic cells. *the journal of experimental zoology* 1998; 282:261.
44. Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, Buchner J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO Journal* 1997; 16:221.
45. Elia G, De Marco A, Rossi A, Santoro MG. Inhibition of HSP70 expression by calcium ionophore A23187 in human cells. An effect independent of the acquisition of DNA-binding activity by the heat shock transcription factor. *Journal of biological chemistry* 1996; 271:16111.
46. Ellis RJ, van der Vies SM, Hemmingsen SM. The molecular chaperone concept. *Biochemical Society Symposium* 1989; 55:145.
47. Evgrafov OV, Mersyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I, Leung CL, Schagina O, Verpoorten N, Van Impe K, Fedotov V, Dadali E, Auer-Grumbach M, Windpassinger C, Wagner K, Mitrovic Z, Hilton-Jones D, Talbot K, Martin JJ, Vasserman N, Tverskaya S, Polyakov A, Liem RK, Gettemans J, Robberecht W, De Jonghe P, Timmerman V. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nature Genetics* 2004; 36:602.
48. Faure O, Graff-Dubois S, Bretaudeau L, Derre L, Gross DA, Alves PM, Cornet S, Duffour MT, Chouaib S, Miconnet I, Gregoire M, Jotereau F, Lemonnier FA, Abastado JP, Kosmatopoulos K.

- Inducible Hsp70 as target of anticancer immunotherapy: Identification of HLA-A\*0201-restricted epitopes. *International Journal of Cancer* 2004; 108:863.
49. Febbraio MA, Mesa JL, Chung J, Steensberg A, Keller C, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH, Pedersen BK. Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress and Chaperones* 2004; 9:390.
  50. Feige JN, Sage D, Wahli W, Desvergne B, Gelman L. PixFRET, an ImageJ plug-in for FRET calculation that can accommodate variations in spectral bleed-throughs. *Microscope Research and Technique* 2005; 68:51.
  51. Feige U, Polla BS. Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* 1994; 50:979.
  52. Feige U, van Eden W. Infection, autoimmunity and autoimmune disease. *EXS* 1996; 77:359.
  53. Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 1990; 346:623.
  54. Fontaine JM, Sun X, Benndorf R, Welsh MJ. Interactions of HSP22 (HSPB8) with HSP20, alphaB-crystallin, and HSPB3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 337:1006.
  55. Fung HC, Chen C, Wu YR, Hsu WC, Ro LS, Lin JC, Chang KH, Wang HK, Lin SJ, Chan H, Lin YY, Wei SL, Hsu Y, Hwang JC, Tung LC, Lee-Chen GJ. Heat shock protein 70 and tumor necrosis factor alpha in Taiwanese patients with dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2005; 20:1.
  56. Ganea E, Harding JJ. Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase by carbamylation and protection by alpha-crystallin, a chaperone-like protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 222:626.
  57. Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, Hammann A, Assem M, Arrigo AP, Chauffert B. Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *European Journal of Biochemistry* 1996; 237:653.
  58. Gehrman M, Schonberger J, Zilch T, Rossbacher L, Thonigs G, Eilles C, Multhoff G. Retinoid- and sodium-butyrate--induced decrease in heat shock protein 70 membrane-positive tumor cells is associated with reduced sensitivity to natural killer cell lysis, growth delay, and altered growth morphology. *Cell Stress and Chaperones* 2005:136.
  59. Georgopoulos CP, Hohn B. Identification of a host protein necessary for bacteriophage morphogenesis (the groE gene product). *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1979; 75:131.
  60. Gong WJ, Golic K. Loss of hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics* 2006; 172:275.
  61. Granja C, Moliterno RA, Ferreira MS, Fonseca JA, Kalil J, Coelho V. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. *Human Immunology* 2004; 65:124.
  62. Grenert JP, Johnson B, Toft DO. The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:17525.
  63. Gunther E, Walter L. Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia* 1994; 50:987.
  64. Guo F, Rocha K, Bali P, Pranpat M, Fiskus W, Boyapalle S, Kumaraswamy S, Balasis M, Greedy B, Armitage ES, Lawrence N, Bhalla K. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Research* 2005; 65:10536.
  65. Gyrð-Hansen M, Nylandsted J, Jaattela M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell cycle* 2004; 3:1484.
  66. Han SG, Castranova V, Vallyathan V. Heat shock protein 70 as an indicator of early lung injury caused by exposure to arsenic. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 277:153.
  67. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381:571.
  68. Hauser H, Shen L, Gu QL, Krueger S, Chen SY. Secretory heat-shock protein as a dendritic cell-targeting molecule: a new strategy to enhance the potency of genetic vaccines. *Gene therapy* 2004; 11:924.

69. Hattori H, Liu YC, Tohnai I, Ueda M, Kaneda T, Kobayashi T, Tanabe K, Ohtsuka K. Intracellular localization and partial amino acid sequence of a stress-inducible 40-kDa protein in HeLa cells. *Cell Structure and Function* 1992; 17:77.
70. Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, Hendrix RW, Ellis RJ. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 1988; 333:330.
71. Hickey E, Brandon S, Potter R, Stein G, Stein J, Weber LA. Sequence and organization of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein. *Nucleic Acids Research* 1986; 14:4127.
72. Hickey E, Brandon S, Smale G, Lloyd D, Weber LA. Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. *Molecular and cellular biology* 1989; 9:2615.
73. Hohfeld J, Minami Y, Hartl FU. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 1995; 83:589.
74. Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of National Academy of Science U S A.* 1992; 89:10449.
75. Huang J, Nueda A, Yoo S, Dynan WS. Heat shock transcription factor 1 binds selectively in vitro to Ku protein and the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Journal of biological chemistry* 1997; 272:26009.
76. Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 1985; 82:6455.
77. Hunt CR, Dix DJ, Sharma GG, Pandita RK, Gupta A, Funk M, Pandita TK. Genomic instability and enhanced radiosensitivity in Hsp70.1- and Hsp70.3-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology* 2004; 24:899.
78. Hunter-Lavin C, Davies E, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JH. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 324:511.
79. Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Research* 1997; 80:383.
80. Irobi J, De Johnge P, Timmerman V. Molecular genetics of distal hereditary motor neuropathies. *Human Molecular Genetics* 2004 A; 13:R195.
81. Irobi J, Van Impe K, Seeman P, Jordanova A, Dierick I, Verpoorten N, Michalik A, De Vriendt E, Jacobs A, Van Gerwen V, Vennekens K, Mazanec R, Tournev I, Hilton-Jones D, Talbot K, Kremensky I, Van Den Bosch L, Robberecht W, Van Vandekerckhove J, Broeckhoven C, Gettemans J, De Jonghe P, Timmerman V. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nature Genetics* 2004 B; 36:597.
82. Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Nohara D, Kato K. Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha B-crystallin. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 276:5346.
83. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental cell research* 1999; 248:30.
84. Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:1517.
85. Jalbout M, Bouaouina N, Gargouri J, Corbex M, Ben Ahmed S, Chouchane L. Polymorphism of the stress protein HSP70-2 gene is associated with the susceptibility to the nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Letters* 2003; 10:75.
86. Javid B, MacAry PA, Oehlmann W, Singh M, Lehner PJ. Peptides complexed with the protein HSP70 generate efficient human cytolytic T-lymphocyte responses. *Biochemical society transactions* 2004; 32:622.
87. Jenkins SC, March R, Campbell RD, Milner CM. A novel variant of the MHC-linked hsp70, hsp70-hom, is associated with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2000; 56:38.
88. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of National Cancer Institute* 2000; 92:1564.
89. Kamradt MC, Chen F, Sam S, Cryns VL. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:38731.

90. Kassem HS, Sangar V, Cowan R, Clarke N, Margison GP. A potential role of heat shock proteins and nicotinamide N-methyl transferase in predicting response to radiation in bladder cancer. *International Journal of Cancer* 2002; 101:454.
91. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 1958; 181:662.
92. Kennaway CK, Benesch JP, Gohlke U, Wang L, Robinson CV, Orlova EV, Saibil HS, Keep NH. Negative stain EM reconstruction of M.Tuberculosis Acr1(HSP 16.3) fitted with Wheat sHSP dimer. *Soumis en* 2006.
93. Kennaway CK, Benesch JP, Gohlke U, Wang L, Robinson CV, Orlova EV, Saibil HR, Keep NH. Dodecameric structure of the small heat shock protein Acr1 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280:33419.
94. Kim MV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. The problem of protein kinase activity of small heat shock protein Hsp22 (H11 or HspB8). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004 A; 325:649.
95. Kim MV, Seit-Nebi AS, Marston SB, Gusev NB. Some properties of human small heat shock protein Hsp22 (H11 or HspB8). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004 B; 315:796.
96. Kim R, Kim K, Yokota H, Kim SH. Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proceedings of National Academy of Science U S A.* 1998; 95.:9129.
97. Klein SD, Brune B. Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release. *Biochemical Journal* 2002; 362:635.
98. Koteiche HA, McHaourab HS. Mechanism of chaperone function in small heat-shock proteins. Phosphorylation-induced activation of two-mode binding in alphaB-crystallin. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:10361.
99. Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 1996; 18:567.
100. Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Sharma RK. Interaction between heat shock protein 70 kDa and calcineurin in cardiovascular systems (Review). *International journal of molecular medicine* 2006; 17:419.
101. Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *Journal of Cell Biology* 1989; 109:7.
102. Latchman DS. HSP27 and cell survival in neurones. *International Journal of Hyperthermia* 2005; 21:393.
103. Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:24210.
104. Lee GJ, Roseman A, Saibil HR, Vierling E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO Journal* 1997; 16:659.
105. Lee JH, Choi Y, Kang HS, Choi BT. An aqueous extract of *Platycodi radix* inhibits LPS-induced NF-kappaB nuclear translocation in human cultured airway epithelial cells. *International Journal of molecular medicine* 2004; 13:843.
106. Lee S, Tsai FT. Molecular chaperones in protein quality control. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2005; 38:259.
107. Lee SJ, CS, Lee KH, Chung HY, Kim TH, Cho CK, Lee YS. Role of inducible heat shock protein 70 in radiation-induced cell death. *Cell Stress and Chaperones* 2001; 6:273.
108. Lehner T, Wang Y, Whittall T, McGowan E, Kelly CG, Singh M. Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochemical society transactions* 2004; 32:629.
109. Levinson W, Oppermann H, Jackson J. Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. *Biochimica and Biophysica Acta* 1980; 606:170.
110. Liang P, MacRae TH. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *journal of cell science* 1997; 110:1431.

111. Marchesi VT, Ngo N. In vitro assembly of multiprotein complexes containing alpha, beta, and gamma tubulin, heat shock protein HSP70, and elongation factor 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 1993; 90:3028.
112. Maroni P, Bendinelli P, Tiberio L, Rovetta F, Piccoletti R, Schiaffonati L. In vivo heat-shock response in the brain: signalling pathway and transcription factor activation. *Brain Research. Molecular Brain Research* 2003; 119:90.
113. Matsumoto M, Fujimoto H. Cloning of a hsp70-related gene expressed in mouse spermatids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990; 166:43.
114. Mehlen P, Arrigo AP. The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization. *European Journal of Biochemistry* 1994; 221:327.
115. Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz 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. *Journal of Immunology* 1995; 154:363.
116. Melville MW, Tan SL, Wambach M, Song J, Morimoto RI, Katze MG. The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity. *Journal of biological chemistry* 1999; 274:3797.
117. Moehler M, Zeidler M, Schede J, Rommelaere J, Galle PR, Cornelis JJ, Heike M. Oncolytic parvovirus H1 induces release of heat-shock protein HSP72 in susceptible human tumor cells but may not affect primary immune cells. *Cancer Gene Therapy* 2003; 10:477.
118. Morrow G, Battistini S, Zhang P, Tanguay RM. Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in Drosophila. *Journal of Biological Chemistry* 2004 A; 279:43382.
119. Morrow G, Samson M, Michaud S, Tanguay RM. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends Drosophila life span and increases resistance to oxidative stress. *The FASEB Journal* 2004 B; 18:598.
120. Nakagami H, Morishita R, Nishikawa T, Shimizu H, Iguchi S, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Lack of association between the hepatocyte growth factor receptor, c-met, and the anti-apoptotic action of bag-1 in endothelial cells. *Hypertension research* 2004; 27:359.
121. Navarro D, Cabrera JJ, Falcon O, Jimenez P, Ruiz A, Chirino R, Lopez A, Rivero JF, Diaz-Chico JC, Diaz-Chico BN. Monoclonal antibody characterization of progesterone receptors, estrogen receptors and the stress-responsive protein of 27 kDa (SRP27) in human uterine leiomyoma. *Journal of Steroid Biochemistry* 1989; 34:491.
122. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*. 2000; 97:7871.
123. Oh HJ, Chen X, Subject JR. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:31636.
124. Osipiuk J, Walsh MA, Freeman BC, Morimoto RI, Joachimiak A. Structure of a new crystal form of human Hsp70 ATPase domain. *Acta Crystallographica D-section Biological Crystallography* 1999; 55:1105.
125. Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D, Kharbanda S. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 2000 A; 19:1975.
126. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO Journal* 2000 B; 19:4310.
127. Papp E, Nardai G, Soti C, Csermely P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors* 2003; 17:249-57.
128. Parsell DA, Taulien J, Lindquist S. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, session B, Biological Sciences* 1993; 339:279.
129. Pearl LH, Prodromou C. Structure and in vivo function of Hsp90. *Current Opinion in Structural Biology* 2000; 10:46.

130. Petrucelli L, Dickson D, Kehoe K, Taylor J, Snyder H, Grover A, De Lucia M, McGowan E, Lewis J, Prihar G, Kim J, Dillmann WH, Browne SE, Hall A, Voellmy R, Tsuboi Y, Dawson TM, Wolozin B, Hardy J, Hutton M. CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Human Molecular Genetics* 2004; 13:703.
131. Plumier JC, David JC, Robertson HA, Currie RW. Cortical application of potassium chloride induces the low-molecular weight heat shock protein (Hsp27) in astrocytes. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* 1997; 17:781.
132. Porto I, Leone AM, Crea F, Andreotti F. Inflammation, genetics, and ischemic heart disease: focus on the major histocompatibility complex (MHC) genes. *Cytokine* 2005; 29:187.
133. Pratt WB. Control of steroid receptor function and cytoplasmic-nuclear transport by heat shock proteins. *BioEssays*. 1992; 14:841.
134. Qian YQ, Patel D, Hartl FU, McColl DJ. Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *Journal of Molecular Biology* 1996; 260:224-35.
135. Radons J, Multhoff G. Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exercise Immunology Review* 2005; 11:17.
136. Rajdev S, Sharp FR. Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicologic Pathology* 2000; 28:105.
137. Ran R, Lu A, Zhang L, Tang Y, Zhu H, Xu H, Feng Y, Han C, Zhou G, Rigby AC, Sharp FR. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes and Development* 2004; 18:1466.
138. Rashmi R, Kumar S, Karunagaran D. Ectopic expression of Hsp70 confers resistance and silencing its expression sensitizes human colon cancer cells to curcumin-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 2004; 25:179.
139. Renkawek K, Stege G, Bosman GJ. Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins hsp27 and alpha B-crystallin in Parkinson's disease. *Neuroreport* 1999; 10:2273.
140. Richter K, Buchner J. Hsp90: chaperoning signal transduction. *Journal of Cellular Physiology* 2001; 188:281.
141. Ritossa FM. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of drosophila. *Experimental cell research* 1964; 35:601.
142. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes and Development* 2005; 19:570.
143. Ruchalski KL, Mao H, Li Z, Wang Z, Gillers S, Wang Y, Mosser DD, Gabai V, Schwartz JH, Borkan SC. Distinct Hsp70 domains mediate apoptosis inducing factor release and nuclear accumulation. *Journal of Biological Chemistry* 2006.
144. Ryan JA, Hightower LE. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. *EXS* 1996; 77:411.
145. Saleh A, Srinivasula S, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biology* 2000; 2:476.
146. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO Journal* 1999; 18:2040.
147. Samali A, Robertson J, Peterson E, Manero F, van Zeijl L, Paul C, Cotgreave IA, Arrigo AP, Orrenius S. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress and Chaperones*. 2001; 6:49.
148. Santoro N, Johansson N, Thiele DJ. Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Molecular and cellular biology* 1998; 18:6340.
149. Satyal SH, Chen D, Fox SG, Kramer JM, Morimoto RI. Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes and Development* 1998; 12:1962.
150. Scheibel T, Buchner J. The Hsp90 complex--a super-chaperone machine as a novel drug target. *Biochemical Pharmacology* 1998; 56:675.
151. Schroder O, Schulte K, Ostermann P, Roher HD, Ekkernkamp A, Laun RA. Heat shock protein 70 genotypes HSPA1B and HSPA1L influence cytokine concentrations and interfere with outcome after major injury. *Critical Care Medicine* 2003; 31:73.



152. Schroeder S, Reck M, Hoefft A, Stuber F. Analysis of two human leukocyte antigen-linked polymorphic heat shock protein 70 genes in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine* 1999; 27:1265.
153. Shomura Y, Dragovic Z, Chang HC, Tzvetkov N, Young JC, Brodsky JL, Guerriero V, Hartl FU, Bracher A. Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Molecular cell* 2005; 17:367.
154. Soldatenkov VA, Dritschilo A. Apoptosis of Ewing's sarcoma cells is accompanied by accumulation of ubiquitinated proteins. *Cancer Research* 1997; 57:3881.
155. Soti C, Racz A, Csermely P. A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:7066-75.
156. Srinivasan AN, Bhat SP. Complete structure and expression of the rat alpha B-crystallin gene. *DNA and Cell Biology* 1994; 13:651.
157. Sriram M, Osipiuk J, Freeman B, Morimoto R, Joachimiak A. Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain. *Structure* 1997; 5(3):403-14:403.
158. Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 1997; 89:239.
159. Stevenson MA, Calderwood SK. Members of the 70-kilodalton heat shock protein family contain a highly conserved calmodulin-binding domain. *Molecular and Cellular Biology* 1990; 10:1234.
160. Sun X, Fontaine JM, Rest JS, Shelden EA, Welsh MJ, Benndorf R. Interaction of human HSP22 (HSPB8) with other small heat shock proteins. *Journal of biological chemistry* 2004; 279:2394.
161. Surewicz WK, Olesen PR. On the thermal stability of alpha-crystallin: a new insight from infrared spectroscopy. *Biochemistry* 1995; 34:9655.
162. Tandara AA, Kloeters O, Kim I, Mogford JE, Mustoe TA. Age Effect on HSP70: Decreased Resistance to Ischemic and Oxidative Stress in HDF. *the Journal of surgical research* 2005.
163. Tanguay RM, Wu Y, Khandjian EW. Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Developmental Genetics* 1993; 14:112.
164. Tavarua M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress and Chaperones* 1996; 1:23.
165. Temple SE, Cheong KY, Ardlie KG, Sayer D, Waterer GW. The septic shock associated HSPA1B1267 polymorphism influences production of HSPA1A and HSPA1B. *Intensive Care Medicine* 2004; 30:1761.
166. Tomita M, Suzuki N, Matsumoto Y, Hirano K, Umeda N, Sakai K. Sensitization by wortmannin of heat- or X-ray induced cell death in cultured Chinese hamster V79 cells. *Journal of Radiation Research (Tokyo)* 2000; 41:93.
167. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of Cell Science* 2002; 115:2603-11.
168. Ungewickell E. The 70-kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelion from coated vesicles. *EMBO Journal* 1985; 4:3385.
169. Vargas-Alarcon G, Londono JD, Hernandez-Pacheco G, Gamboa R, Castillo E, Pacheco-Tena C, Cardiel MH, Granados J, Burgos-Vargas R. Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthropathies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2002; 61:48.
170. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *International Journal of Cancer* 1998; 79:468.
171. Velazquez JM, Lindquist S. hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* 1984; 36:655.
172. Wampler JL, Kwang-Pyo K, Ziad J, Bhunia AK. Heat Shock Protein 60 Acts as a Receptor for the Listeria Adhesion Protein in Caco-2 Cells. *Infection and Immunity* 2004; 72:931.
173. Wang H, Kurochkin A, Pang Y, Hu W, Flynn GC, Zuiderweg ER. NMR solution structure of the 21 kDa chaperone protein DnaK substrate binding domain: a preview of chaperone-protein interaction. *Biochemistry* 1998; 37:7929.

174. Wano C, Kita K, Takahashi S, Sugaya S, Hino M, Hosoya H, Suzuki N. Protective role of HSP27 against UVC-induced cell death in human cells. *Experimental cell research* 2004; 298:584.
175. Weber LA. Relationship of heat shock proteins and induced thermal resistance. *Cell Proliferation* 1992; 25:101.
176. Wegele H, Wandinger SK, Schmid AB, Reinstein J, Buchner J. Substrate transfer from the chaperone hsp70 to hsp90. *Journal of Molecular Biology* 2005; 356:802.
177. Welch WJ, Suhan JP. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *the journal of Cell Biology* 1986; 103:2035.
178. Westerheide SD, Kawahara TL, Orton K, Morimoto RI. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *Journal of biological chemistry* 2006.
179. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 1994; 91:8324.
180. Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 1999; 286:1888.
181. Winter J, Jakob U. Beyond transcription--new mechanisms for the regulation of molecular chaperones. *Critical Review in Biochemical and Molecular Biology* 2004; 39:297.
182. Wirth D, Gustin P, Drion PV, Dessy-Doize C, Christians ES. Les protéines de choc thermique (heat shock proteins). I : Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Les Annales de Médecine Vétérinaire* 2002; 146:2001.
183. Wu YR, Wang CK, Chen CM, Hsu Y, Lin SJ, Lin YY, Fung HC, Chang KH, Lee-Chen GJ. Analysis of heat-shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease. *Human Genetics* 2004; 114:236.
184. Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, Nicholson DW. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO Journal* 1999; 18:2049.
185. Yokota SI, Minota S, Fujii N. Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors. *International Immunology* 2006.
186. Young DB. Chaperonins and the immune response. *Seminars in Cell Biology* 1990; 1:27.
187. Zhang H, Hu H, Jiang X, He H, Cui L, He W. Membrane HSP70: the molecule triggering gamma delta T cells in the early stage of tumorigenesis. *Immunological investigations* 2005; 34:453.
188. Zouari Bouassida K, Chouchane L, Jellouli K, Cherif S, Haddad S, Gabbouj S, Danguir J. Polymorphism of stress protein HSP70-2 gene in Tunisians: susceptibility implications in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes & Metabolism* 2004; 30:175.

### **1.3- Cristallographie des protéines**

1. Arzt S, Beteva A, Cipriani F, Delageniere S, Felisaz F, Forstner G, Gordon E, Launer L, Lavault B, Leonard G, Mairs T, McCarthy A, McCarthy J, McSweeney S, Meyer J, Mitchell E, Monaco S, Nurizzo D, Ravelli R, Rey V, Shepard W, Spruce D, Svensson O, Theveneau P. Automation of macromolecular crystallography beamlines. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2005; 89:124.
2. Beadle G, Tatum E. Nobel Prizes for Medicine or Physiology: One gene - one protein. 1958.
3. Bertrand JA, Auger G, Fanchon E, Martin L, Blanot D, van Heijenoort J, Dideberg O. Crystal structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase from *Escherichia coli*. *EMBO Journal* 1997; 16:3416.
4. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 2005; 309:581.
5. Feng XJ, Wang JH, Shan AS, Teng D, Yang YL, Yao Y, Yang GP, Shao YC, Liu S, Zhang F. Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* 2005.
6. Garman E, Nave C. Radiation damage to crystalline biological molecules: current view. *Journal of Synchrotron Radiation* 2002; 9:327.

7. Garman E, Owen RL. Cryo-cooling and radiation damage in macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D* 2006; 62:32.
8. Green DW, Ingram VM, Perutz MF. The structure of haemoglobin IV. Sign determination by the isomorphous replacement method. *Proceedings of the Royal Society (London)* 1954; A225:287.
9. Gutman PD, Fuchs P, Ouyang L, Minton KW. Identification, sequencing, and targeted mutagenesis of a DNA polymerase gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology* 1993; 175:3581.
10. Harker D. The determination of the phases of the structure factors of noncentrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta Crystallographica* 1956; 9:1.
11. Hendrickson WA, Smith JL, Sheriff S. Direct phase determination based on anomalous scattering. *Methods in Enzymology* 1985; 115:41.
12. Karle J. Some developments in anomalous dispersion for the structural investigation of macromolecular systems in biology. *International Journal of Quantum Chemistry* 1980; 7:357.
13. Karle J. Some additional features of one-wavelength anomalous dispersion. *Acta Crystallographica* 1991; 47:537.
14. Kim R, Kim KK, Yokota H, Kim SH. Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proceedings of National Academy of Science U S A.* 1998; 95:9129.
15. Lauble H, Kennedy MC, Emptage MH, Beinert H, Stout CD. The reaction of fluorocitrate with aconitase and the crystal structure of the enzyme-inhibitor complex. *Proceedings of National Academy of Science U S A.* 1996; 93:13699.
16. Leiros HK, Timmins J, Ravelli RB, McSweeney SM. Is radiation damage dependent on the dose rate used during macromolecular crystallography data collection? *Acta Crystallographica Section D* 2006; 62:125.
17. Leiros I, Timmins J, Hall DR, McSweeney S. Crystal structure and DNA-binding analysis of RecO from *Deinococcus radiodurans*. *EMBO Journal* 2005; 24:906.
18. Ma X, Zheng W, Wei D, Ma Y, Wang T, Wang J, Liu Q, Yang S. High-level expression, purification and pro-apoptosis activity of HIV-TAT-survivin (T34A) mutant to cancer cells in vitro. *Journal of Biotechnology* 2006.
19. Nirenberg MW, Khorana HG, Holley RH. Nobel Prizes for Medicine: Discovery of the Genetic Code. *Nature* 1968; 220:324.
20. Rossmann MG, Blow DM. The refinement of structures partially determined by the isomorphous replacement method. *Acta Crystallographica* 1961; 15:24.
21. Schrodell A, de Marco A. Characterization of the aggregates formed during recombinant protein expression in bacteria. *BMC Biochemistry* 2005; 6.
22. Shen GJ, Datta AK, Izumi M, Koeller KM, Wong CH. Expression of alpha2,8/2,9-polysialyltransferase from *Escherichia coli* K92. Characterization of the enzyme and its reaction products. *Journal of Biochemistry* 1999; 274:35139.
23. Smith JK. Multiwavelength anomalous diffraction in macromolecular crystallography. *Direct Methods for Solving Macromolecular Structures*, S. Fortier (Ed.), Kluwer Academic Publishers: Dordrecht 1997:211.
24. Stampler R, Kappe G, Boelens W, Slingsby C. Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly. *Journal of Molecular Biology* 2005; 353:68.
22. van den Ent F, Amos LA, Lowe J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 2001; 413:39.
25. Sun J, Duffy KE, Ranjith-Kumar CT, Xiong J, Lamb RJ, Santos J, Masarapu H, Cunningham M, Holzenburg A, Sarisky RT, Mbow ML, Kao C. Structural and functional analyses of the human Toll-like receptor 3. Role of glycosylation. *Journal of Biochemistry* 2006; 281:11144.
26. Vorobiev S, Strokopytov B, Drubin DG, Frieden C, Ono S, Condeelis J, Rubenstein PA, Almo SC. The structure of nonvertebrate actin: implications for the ATP hydrolytic mechanism. *Proceedings of National Academy of Science U S A.* 2003; 100:100(10):5760.
27. Wilbanks SM, McKay DB. Structural replacement of active site monovalent cations by the epsilon-amino group of lysine in the ATPase fragment of bovine Hsc70. *Biochemistry* 1998; 37:7456.
28. Wysocka J, Allis CD, Coonrod S. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Frontiers in bioscience* 2006; 11:344.

29. Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 1996; 272:1606.

#### **1.4- Synchrotron**

1. Aikawa T, Segre GV, Lee K. Fibroblast growth factor inhibits chondrocytic growth through induction of p21 and subsequent inactivation of cyclin E-Cdk2. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:29347.
2. Barcellos-Hoff MH, Brooks AL. Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability. *Radiation research* 2001; 156:618.
3. Beauchamp JC, Isaacs NW. Methods for X-ray diffraction analysis of macromolecular structures. *Current Opinion in Chemical Biology* 1999; 3:525.
4. Biston MC, Joubert A, Adam JF, Elleaume H, Bohic S, Charvet AM, Esteve F, Foray N, Balosso J. Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Research* 2004; 64:2317.
5. Chapman D, Thomlinson W, Johnston RE, Washburn D, Pisano E, Gmur N, Zhong Z, Menk R, Arfelli F, Sayers D. Diffraction enhanced x-ray imaging. *Physics in Medicine and Biology* 1997; 42:2015.
6. Coan P, Pagot E, Fiedler S, Cloetens P, Baruchel J, Bravin A. Phase-contrast X-ray imaging combining free space propagation and Bragg diffraction. *Journal of synchrotron radiation* 2005; 12:241.
7. Corde S, Balosso J, Elleaume H, Renier M, Joubert A, Biston MC, Adam JF, Charvet AM, Brochard T, Le Bas JF, Esteve F, Foray N. Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways. *Cancer Research* 2003; 63:3221.
8. Cornelissen M, Thierens H, De Ridder L. Effects of ionizing radiation on cartilage: emphasis on effects on the extracellular matrix. *Scanning Microscopy* 1996; 10:833.
9. Dewit L. Combined treatment of radiation and cisdiamminedichloroplatinum (II): a review of experimental and clinical data. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1987; 13:403.
10. Diaz SH, Nelson JS, Wong BJ. Rate process analysis of thermal damage in cartilage. *Physics in Medicine and Biology* 2003; 48:19.
11. Elleaume H, Charvet AM, Le Bas JF. The synchrotron beam, a new dimension for contrast media research? *Acta Radiologica Supplementum* 1997; 412:29.
12. Fernandez M, Keyrilainen J, Serimaa R, Torkkeli M, Karjalainen-Lindsberg ML, Leidenius M, von Smitten K, Tenhunen M, Fiedler S, Bravin A, Weiss TM, Suortti P. Human breast cancer in vitro: matching histo-pathology with small-angle x-ray scattering and diffraction enhanced x-ray imaging. *Physics in Medicine and Biology* 2005; 50:2991.
13. Finger F, Schrole C, Soder S, Zien A, Goldring MB, Aigner T. Phenotypic characterization of human chondrocyte cell line C-20/A4: a comparison between monolayer and alginate suspension culture. *Cells, tissues, organs*. 2004; 178:65.
14. Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Cavani F, Setti S, Cane V, Giardino R. Pulsed electromagnetic fields reduce knee osteoarthritic lesion progression in the aged Dunkin Hartley guinea pig. *Journal of Orthopaedic Research* 2005; 23:899.
15. Fioravanti A, Nerucci F, Collodel G, Markoll R, Marcolongo R. Biochemical and morphological study of human articular chondrocytes cultivated in the presence of pulsed signal therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2002; 61:1032.
16. Foster ER, Downs JA. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS Journal* 2005; 272:3231.
17. Iwamoto T, Okamoto H, Iikuni N, Takeuchi M, Toyama Y, Tomatsu T, Kamatani N, Momohara S. Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 is highly expressed in cartilage from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2005.

18. Jonsson AC, Jonsson BA, Strand SE, Grafstrom G, Spanne P. Cell survival after Auger electron emission from stable intracellular indium exposed to monochromatic synchrotron radiation. *Acta Oncologica* 1996; 35:947.
19. Kaplan LD. The analysis of articular cartilage after thermal exposure: "Is red really dead?". *Arthroscopy* 2003; 19:310.
20. Kimler BF, Liu C, Evans RG, Morantz RA. Combination of aziridinybenzoquinone and cisplatin with radiation therapy in the 9L rat brain tumor model. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1993; 26:445.
21. Laster BH, Thomlinson WC, Fairchild RG. Photon activation of iododeoxyuridine: biological efficacy of Auger electrons. *Radiation research* 1993; 133:219.
22. Marples B, Wouters BG, Collis SJ, Chalmers AJ, Joiner MC. Low-dose hyper-radiosensitivity: a consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged G2-phase cells. *Radiation research* 2004; 161:247.
23. Minor W, Tomchick D, Otwinowski Z. Strategies for macromolecular synchrotron crystallography. *Structure* 2000; 8:R105.
24. Mollenhauer J, Aurich ME, Zhong Z, Muehleman C, Cole AA, Hasnah M, Oltulu O, Kuettner KE, Margulis A, Chapman LD. Diffraction-enhanced X-ray imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002; 10:163.
25. Muehleman C, Majumdar S, Issever AS, Arfelli F, Menk RH, Rigon L, Heitner G, Reime B, Metge J, Wagner A, Kuettner KE, Mollenhauer J. X-ray detection of structural orientation in human articular cartilage. *Osteoarthritis and cartilage* 2004; 12:97.
26. Pagot E, Fiedler S, Cloetens P, Bravin A, Coan P, Fezzaa K, Baruchel J, Hartwig J. Quantitative comparison between two phase contrast techniques: diffraction enhanced imaging and phase propagation imaging. *Physics in Medicine and Biology* 2005; 50:709.
27. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 2003; 100:5057.
28. Sawatzky DA, Foster R, Seed MP, Willoughby DA. Heat-shock proteins and their role in chondrocyte protection, an application for autologous transplantation. *Inflammopharmacology* 2005; 12:569.
29. Screnci D, McKeage MJ. Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches. *Journal of Inorganic Biochemistry* 1999; 77:105.
30. Short SC, Bourne S, Martindale C, Woodcock M, Jackson SP. DNA damage responses at low radiation doses. *Radiation research* 2005; 164:292.
31. Suortti P, Thomlinson WC. Medical applications of synchrotron radiation. *Physics in Medicine and Biology* 2003; 48:R1.
32. Takahashi T, Mizobuchi H, Toda M, Maeda A, Mizuno S, Ogawa Y, Yoshida S, Yamamoto H. Metabolic effects of X-ray irradiation on adult human articular chondrocytes. *International Journal of Molecular Medicine* 2003; 11:631.
33. Terauchi R, Takahashi KA, Arai Y, Ikeda T, Ohashi S, Imanishi J, Mazda O, Kubo T. Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis and rheumatism* 2003; 48:1562.
34. Thomlinson W, Berkvens P, Berruyer G, Bertrand B, Blattmann H, Brauer-Krisch E, Brochard T, Charvet AM, Corde S, Dimichiel M, Elleaume H, Esteve F, Fiedler S, Laissue JA, Le Bas JE, Le Duc G, Lyubimova N, Nemoz C, Renier M, Slatkin DN, Spanne P, Suortti P. Research at the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline. *Cellular and molecular biology* 2000; 46:1053.
35. Tomita M, Suzuki N, Matsumoto Y, Hirano K, Umeda N, Sakai K. Sensitization by wortmannin of heat- or X-ray induced cell death in cultured Chinese hamster V79 cells. *Journal of radiation research (Tokyo)* 2000; 41:93.
36. Tubiana M. Carcinogenic effects of low radiation doses. *Cancer Radiothérapie* 1999; 3:203.
37. Tubiana M, Aurengo A, Averbeck D, Masse R. Recent reports on the effect of low doses of ionizing radiation and its dose-effect relationship. *Radiation and Environmental Biophysics* 2006; 44:245.
38. Wagner A, Aurich M, Sieber N, Stoessel M, Wetzel W, Schmuck K, Lohmann M, Metge J, Reime B, Coan P, Bravin A, Arvelli F, Heitner G, Menk R, Irving T, Zhong Z, Muehleman C,

Mollenhauer J. Options and Limitations of Joint Cartilage Imaging: DEI in Comparison to MRI and Sonography. Nuclear Instruments & Methods 2005; 548:47.

39. Woese CR, Fox GE. The concept of cellular evolution. Journal of Molecular Evolution 1977; 10:1.

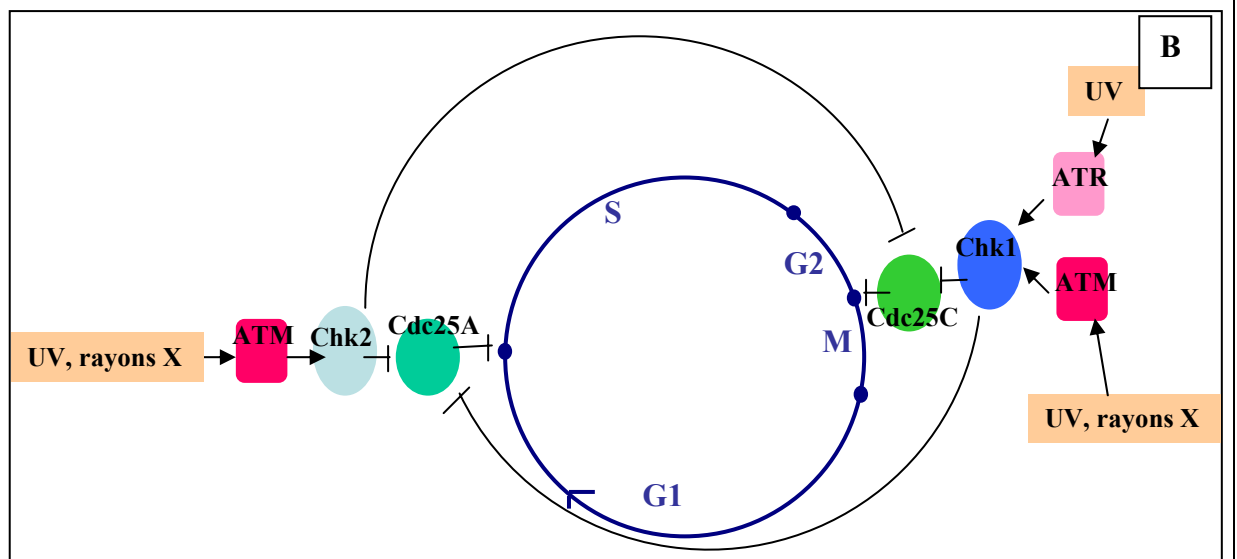
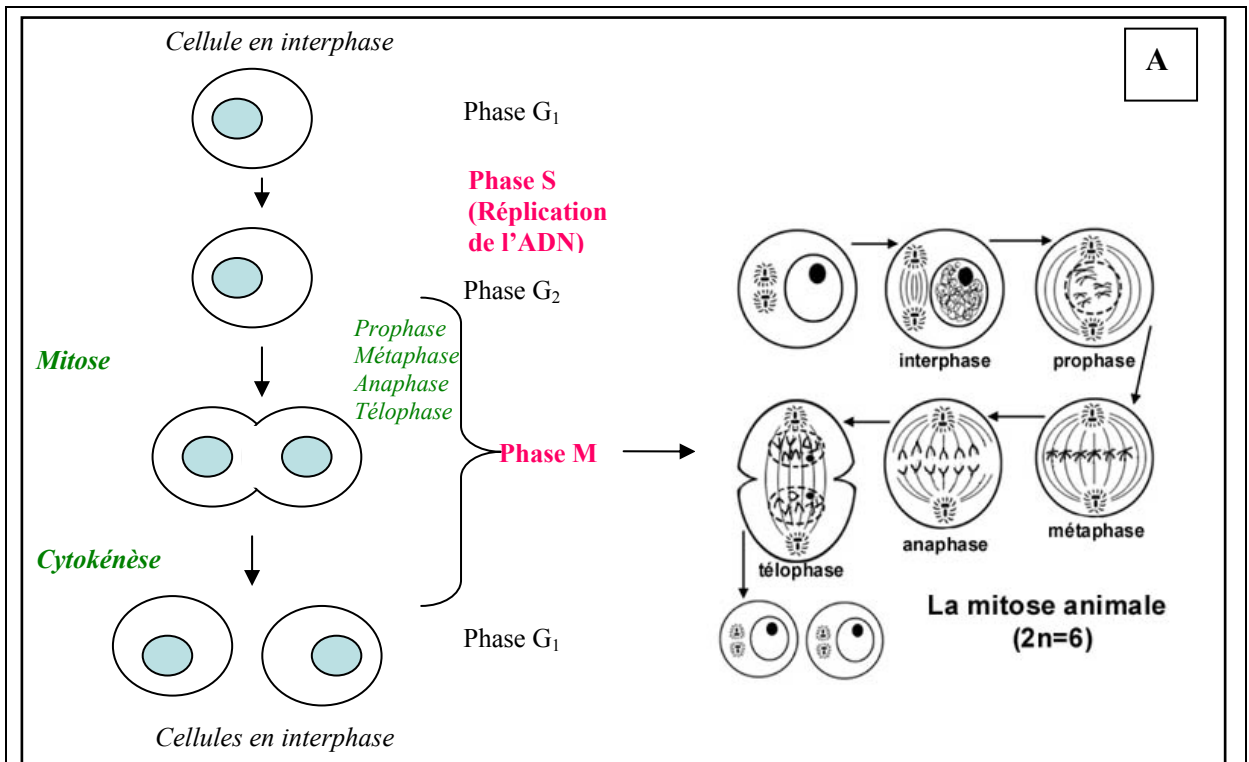
## **2- Livres**

- 1- « Biochemistry » Garrett R. H et Grisham C M - University of Virginia (3<sup>ème</sup> Edition, 2005).
- 2- « Biologie cellulaire et moléculaire » Karp G, éditions De Boeck (2<sup>ème</sup> édition française, 2004).
- 3- « Biologie moléculaire de la cellule » Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K et Watson JD, collection Médecine-Sciences, éditions Flammarion (1989).
- 4- « Biophysique : radiobiologie, radiopathologie » Galle P et Paulin R, collection Abrégés, éditions Masson (2000).
- 5- « Cancérologie Fondamentale » Lacave R., Larsen C-J, Robert J, Collection John Libbey, 2005.
- 6- « Genes » Lewin B, collection Médecine-Sciences, éditions Flammarion (6<sup>ème</sup> édition, 1999).
- 7- « Immunologie Générale » Letonturier P, éditions Masson (2001).
- 8- « Principles of protein X-ray crystallography » Drenth J, éditions Springer-Verlag Inc, (2<sup>ème</sup> édition 1999).
- 9- « Tumeurs cérébrales » Philippon J, éditions Masson (2004).

## **3- Sites internet**

- 1- ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- 2- Expasy: <http://www.expasy.org/>
- 3- FoldIndex: <http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>
- 4- Fondation Québécoise contre le cancer: <http://www.fqc.qc.ca/>
- 5- Google: <http://www.google.fr/>
- 6- HHPred: <http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/toolkit/index.php?view=hhpred> (Söding J, Biegert A, Lupas A N. The HHPred interactive server for protein homology detection and structure prediction. Nucleic Acids Research 2005; 33:244-248).
- 7- Infobiogen: <http://www.infobiogen.fr/>
- 8- Lodish, 4<sup>ème</sup> édition, Molecular Cell Biology: <http://www.whfreeman.com/lodish4e/>
- 9- Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb>
- 10- PSIPRED: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html> (McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics 2000; 16:404-5).
- 11- PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>
- 12- SoftBerry bio tools: <http://www.softberry.com/berry.phtml>
- 13- Wikipédia: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil>

## Annexe I – Mécanismes de la réparation de l'ADN



**Figure I-a) Le cycle cellulaire\***

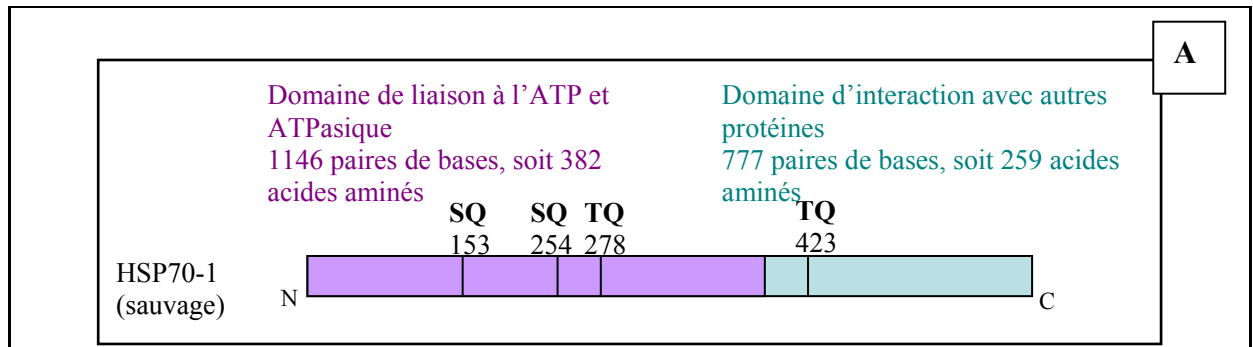
**A) Cycle représenté de façon simplifiée.**

A gauche : les cellules et la phase du cycle cellulaire correspondante. A droite : représentation d'une phase M (mitose) détaillée pour un animal possédant 3 paires chromosomes.

**B) Régulation du cycle cellulaire en réponse aux radiations ionisantes.**

Schéma simplifié d'après Yang J *et al*, 2003.

→ activation  
 —| répression



**HSP70-1**

MAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALN  
 PQNTVFDKRLIGRKFQDPVVQSDMKHWPVQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYP EEISSMVL  
 TKMKEIAEAYLGPVTVNAVITVPAYFND **SQR**QATKDAGVIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDR  
 TGKGERNVLIFFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHVVEEFKRKHK  
 KDI **SQ**NKRAVRRRLRTACERAKRTLSSS **TQ**ASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEP  
 VEKALRDAKLDKAQIHDLLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAVQA  
 AILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLTAGGVM TALIKRNSTIPTKQ **TQ**IFTTYSNDNQPGVLIQ  
 VYGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVTATDKSTGKANKITITN  
 DKGRLSKEEIERMVQEAKEYKADEVQRERVS AKNALESYAFNMKSAVEDEGLK GKISEAD  
 KKKVLDKQCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPIISGLYQGAGGPGPGGFGAQQPK  
 GGSGSGPTIEEVD

**B**

**HSP72**

MSARGPAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAM  
 NPTNTIFDAKRLIGRKFEDATVQSDMKHWPFRV VSEGGKPKVQVEYKGETKTFP EEISSMVL  
 TKMKEIAEAYLGGKVHSAVITVPAYFND **SQR**QATKDAGTITGLNVLRINEPTAAAIAYGLDK  
 KGCAGGEKNVLIFFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVSHLAEEFKRK  
 HKKDIGNKRAVRRRLRTACERAKRTLSSS **TQ**ASIEIDSLYEGVDFYTSITRARFEELNADLFRG  
 TLEPVEKALRDAKLDKGQIQEIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNKELNKSINPDEAVAYGAAV  
 QAAILIGDKSENVQDLLLLDVTPSLGIETAGGVM TPLIKRNTTIPTKQ **TQ**TFTTYSNDNQSSVL  
 VQVYGERAMTKDNNLLGKFDL TGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVTAAADKSTGKENKITI  
 TNDKGRLSKDDIDRMVQEAERYKSEDEANRDRVAAKNALESYTYNIKQTV EDEKLRGKISEQ  
 DKNKILDKCQEVINWLDNRNQMAEKDEYEHKQKELERVCNPIISKLYQGGPGGGSGGGGSGA  
 SGGPTIEEVD

**Figure I-b) HSP70 humaine\***

**A) HSP70-1 (1923 paires de bases, soit 641 acides aminés)**  
 Ces éléments ont été obtenus à l'aide du serveur de bioinformatique [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Les sites de phosphorylation potentiels pour les kinases ATM/ATR/DNA-PK (c'est-à-dire SQ et TQ) sont représentés en caractères gras et en rouge.

**B) Séquence en acides aminés de HSP72**  
 Séquence obtenue sur le serveur de bio-informatique [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Les sites de phosphorylation potentiels pour les kinases ATM/ATR/DNA-PK (c'est-à-dire SQ et TQ) sont représentés en caractères gras et en rouge.



**Séquence 1: HSP70-1, (641 résidus)**

**Séquence 2: HSP72, (639 résidus)**

**83.6% d'identité dans 642 résidus se chevauchant; Score: 2744.0; Fréquence de gap: 1.1%**

HSP70-1, 2 AKAAAIGIDLGTYSVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAL  
HSP72, 3 ARGPAIGIDLGTYSVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAM  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 62 NPQNTVFDKRLIGRKFQDPVQSDMKHWPVQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPEEISS  
HSP72, 63 NPTNTVFDKRLIGRKFEDATVQSDMKHWPVQVSEGGKPKVQVEYKGETKTFPEEISS  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 122 MVLTKMKEIAEAYLGYPTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTAAAI  
HSP72, 123 MVLTKMKEIAEAYLGGKVHSAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTITGLNVLRINEPTAAAI  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 182 AYGLDRTG--KGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVN  
HSP72, 183 AYGLDKKGCAGGEKNLIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVS  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 240 HFVEEFKRKHKKDLSQNKRAVRLRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITR  
HSP72, 243 HLAEEFKRKHKKDIGPNKRAVRLRLTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITR  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 300 ARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDVLVGGSTRIPKQKLLQDFNDRDL  
HSP72, 303 ARFEELNADLFRGTLEPVEKALRDAKLDKQIQEIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNDRDL  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 360 NKSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGETAGGVMTALIKRNST  
HSP72, 363 NKSINPDEAVAYGAAVQAAILIGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTPLIKRNTT  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 420 IPTKQIQIFFTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVVPQIEVTFD  
HSP72, 423 IPTKQIQIFFTYSDNQSSVLVQVYEGERAMTKDNNLLGKFDLTGIPPAPRGVVPQIEVTFD  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 480 IDANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDEVQRERVSAAK  
HSP72, 483 IDANGILNVTAAADKSTGKENKITITNDKGRLSKDDIDRMVQEAERYKSEDEANRDRVAAK  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 540 NALESYAFNMKSAVEDEGLKGGKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKREL  
HSP72, 543 NALESYTYNIKQTVDEKLRGKISEQDKNKILDKCQEVINWLDNRNMAEKDEYEHKQKEL  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 600 EQVCNPIISGLYQAGGPGPGGFGAQGPKGGSGSGPTIEEVD  
HSP72, 603 ERVCNPIISKLYQGGPGGGSGGGGS----GASGGPTIEEVD  
\* \* \* \* \*

**Séquence 1: HSP70-1, (641 résidus)**

**Séquence 2: HSP73, (646 résidus)**

**82.0% d'identité dans 646 résidus se chevauchant; Score: 2555.0; Fréquence de gap: 5.6%**

HSP70-1, 1 MAKAAAIGIDLGTYSVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA  
HSP73, 1 MSKGPVAVGIDLGTYSVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 61 LNPQNTVFDKRLIGRKFQDPVQSDMKHW-----  
HSP73, 61 MNPTNTVFDKRLIGRFRDDAVVQSDMKHWPVQVINDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVS  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 91 SMVLTKMKEIAEAYLGYPTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTAA-  
HSP73, 121 SMVLTKMKEIAEAYLGKTVNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNVLRINEPTAAA  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 150 IAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNH  
HSP73, 181 IAYGLDKKVGAEARNVIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNH  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 210 FVEEFKRKHKKDLSQNKRAVRLRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRA  
HSP73, 241 FIAEFKRKHKKDISENKRAVRLRLTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRA  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 270 RFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDVLVGGSTRIPKQKLLQDFNDRDLN  
HSP73, 301 RFEELNADLFRGTLDPEKALRDAKLDKSIHQIHDVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNDRDLN  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 330 KSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGETAGGVMTALIKRNSTI  
HSP73, 361 KSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTI  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 390 PTKQIQIFFTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVVPQIEVTFDI  
HSP73, 421 PTKQIQIFFTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFEITGIPPAPRGVVPQIEVTFDI  
\* \* \* \* \*  
HSP70-1, 450 DANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDEVQRERVSAAK

```

HSP73, 481 DANGILNVAVDKSTGKENKITTNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDEKQRDKVSSKN
***** * ***** *****
HSP70-1, 510 ALESYAFNMKSAVEDEGLKGIKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELE
HSP73, 541 SLESYAFNMKATVEDEKLQKINDEKQKILDKCNEIINWLDKNQTAEEKEFEHQKQKLE
***** * ***** *****
HSP70-1, 570 QVCNPIISGLYQGAGG-PG--PGGF--GAQGPKGSGSGPTIEEVD
HSP73, 601 KVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD
***** * *****

```

**Séquence 1: HSP72, (639 résidus)**  
**Séquence 2: HSP73, (646 résidus)**  
**86.2% d'identité dans 647 résidus se chevauchant; Score: 2829.0; Fréquence de gap: 1.9%**

```

HSP72, 3 ARGPAIGIDLGTYSVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAM
HSP73, 2 SKGPAVIGIDLGTYSVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAM
*** *****
HSP72, 63 NPTNTIFDAKRLIGRKFEDATVQSDMKHWPFRVSEGGKPKVQVEYKGETKTFFPEEISS
HSP73, 62 NPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVSS
***** ***** * * ***** * ***** * * * *
HSP72, 123 MVLTKMKEIAEAYLGGKVHSAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTITGLNVLRIINEPTAAAI
HSP73, 122 MVLTKMKEIAEAYLGKTVTNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNVLRIINEPTAAAI
***** ***** * * ***** *****
HSP72, 183 AYGLDKKGCAGGEKNVLIIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVS
HSP73, 182 AYGLDKK--VGAERNVLIIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVN
***** * * ***** *****
HSP72, 243 HLAEEFKRKHKKDIGPNKRAVRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITR
HSP73, 240 HFIAEFKRRKHKKDISENKRAVRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITR
* ***** *****
HSP72, 303 ARFEELNADLFRGTLPEVEKALRDAKLDKGOIQEIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNGKEL
HSP73, 300 ARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSOIHDIIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNGKEL
***** ***** * * ***** *****
HSP72, 363 NKSINPDEAVAYGAAVQAAILIGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTPLIKRNTT
HSP73, 360 NKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTT
***** *****
HSP72, 423 IPTKQITQFTTYSQSSVVLVQVYEGERAMTKDNNLLGKFDLTGIPPAPRGVQPQIEVTFD
HSP73, 420 IPTKQITQFTTYSQSSVVLVQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPAPRGVQPQIEVTFD
***** ***** * * ***** *****
HSP72, 483 IDANGILNVAADKSTGKENKITTNDKGRLSKDDIDRMVQEAERYKSEDEANRDRVAAK
HSP73, 480 IDANGILNVAVDKSTGKENKITTNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDEKQRDKVSSK
***** * ***** ***** * * * * *
HSP72, 543 NALESYTYNIKQTVDEKLRGKISEQDKNKILDKCQEVINWLDNRNMAEKDEYEHKQKEL
HSP73, 540 NSLESYAFNMKATVEDEKLQKINDEKQKILDKCNEIINWLDKNQTAEEKEFEHQKQKEL
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
HSP72, 603 ERVCNPIISKLYQ-----GGPGGSGGGG--SGASGGPTIEEVD
HSP73, 600 EKVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figure I-c) Recherche de similarités entre les différentes HSP70 considérées\***  
Ces résultats ont été obtenus par SIM sur le serveur de bio-informatique [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Les séquences proviennent du même serveur. Les sites TQ sont surlignés en **bleu marine** et les sites SQ en **turquoise**. La séquence **rouge** correspond à la séquence ayant servi à la fabrication de l'anticorps phospho spécifique.

Heat shock 70 kDa protéine 1 (HSP70.1) (HSP70-1/HSP70-2) [HSPA1A]

[Homo sapiens (Humain)] 641 AA

Score = 40.9 bits (89), Attendu = 0.004

Identités = 12/12 (100%), Positives = 12/12 (100%)

Recherche: 1 KHKKDISQNKRA 12

KHKKDISQNKRA

Sujet: 248 KHKKDISQNKRA 259

Heat shock 70kDa protéine 1A (Heat shock 70kDa protein 1B) [HSPA1A]

[Homo sapiens (Humain)] 641 AA:

Score = 40.9 bits (89), Attendu = 0.004

Identités = 12/12 (100%), Positives = 12/12 (100%)

Recherche: 1 KHKKDISQNKRA 12

KHKKDISQNKRA

Sujet: 248 KHKKDISQNKRA 259

Heat shock-related 70 kDa protéine 2 (Heat shock 70 kDa protein 2)

[HSPA2] [Homo sapiens (Humain)] 639 AA

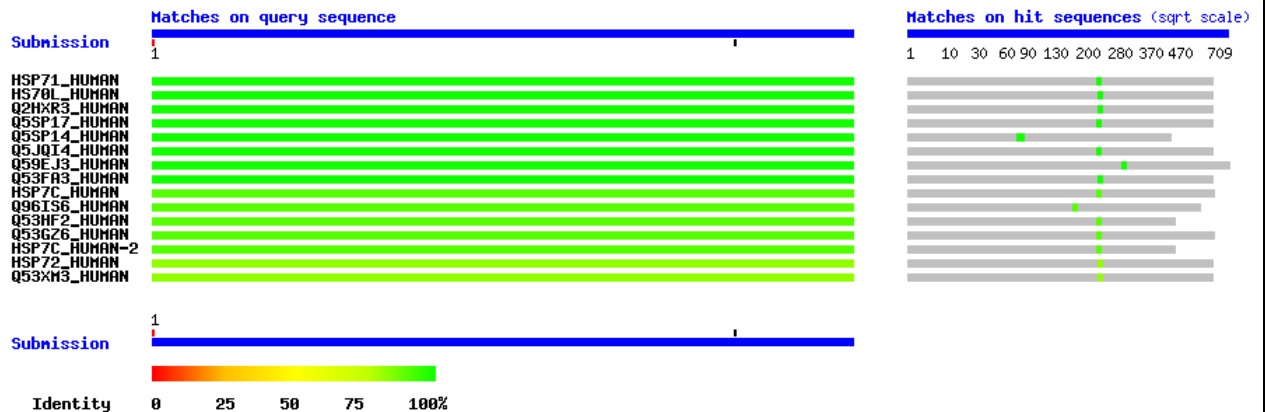
Score = 32.9 bits (70), Attendu = 1.2

Identités = 10/12 (83%), Positives = 10/12 (83%)

Recherche: 1 KHKKDISQNKRA 12

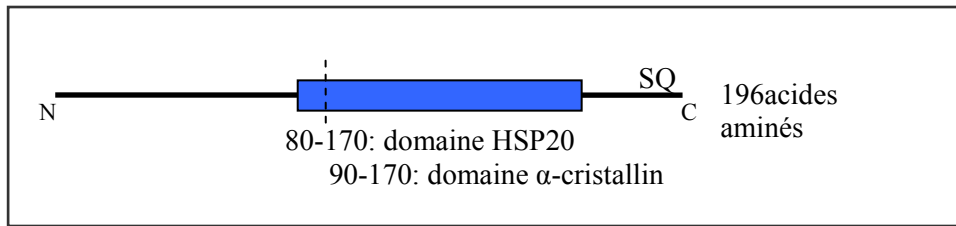
KHKKDI NKRA

Sujet: 251 KHKKDIGPNKRA 262



**Figure I-d) Spécificité de l'anticorps dirigé contre  $\gamma$ -HSP70-1<sup>Ser254</sup>\***

D'après les résultats obtenus à l'aide de « Blast » sur le serveur [www.expasy.org](http://www.expasy.org), l'anticorps semble effectivement bien spécifique de la protéine HSP70-1.



**A**

**B**

MADGQMPFSCHYPSRLRRDPFRDSPLSSRLDDGFGMDPFPDDL TASWPDWALPRLSSAWPG  
 TLRSGMVPRGPTATARFGVPAEGRTPPFPGEWPKVCVNVHSFKPEELMVKTKDGYVEVSGK  
 HEEKQQEGGIVSKNFTKKIQLPAEVDVPTVVFASLSPEGLLIEAPQVPPYSTFGESSFNNELPQD  
**SQ**EVTCT

**Figure I-e) HSP22 humaine\* (196 acides aminés)**

**A) Organisation**

Ces éléments structuraux ont été obtenus via le serveur de bioinformatique [www.expasy.org](http://www.expasy.org). La sérine xxxSQxx est la Ser<sup>190</sup>.

**B) Séquence en acides aminés**

Séquence obtenue sur le serveur de bio-informatique [www.expasy.org](http://www.expasy.org). En gras et en rouge: sites de phosphorylation potentiels pour les kinases ATM/ATR/DNA-PK (c'est-à-dire SQ et TQ).

```
Humain, 1 MADGQMPFSCHYPSRLRRDPFRDSPLSSRLDDGFGMDPFPDDL TASWPDWALPRLSSAW
Rat, 1 MADGQLPFPCSYPSRLRRDPFRDSPLSSRLDDGFGMDPFPDDL TAPWPEWALPRLSSAW
***** * * *****

Humain, 61 PGTLRSGMVPRGPTATARFGVPAEGRTPPFPGEWPKVCVNVHSFKPEELMVKTKDGYVE
Rat, 61 PGTLRSGMVPRGPTATARFGVPAEGRNPPFPGEWPKVCVNVHSFKPEELMVKTKDGYVE
*****

Humain, 121 VSGKHEEKQQEGGIVSKNFTKKIQLPAEVDVPTVVFASLSPEGLLIEAPQVPPYSTFGES
Rat, 121 VSGKHEEKQQEGGIVSKNFTKKIQLPAEVDVPTVVFASLSPEGLLIEAPQVPPYSPFGES
*****

Humain, 181 SFNNELPQDSSQEVTCT
Rat, 181 SFNNELPQDNQEVTCS
*****
```

**Figure I-f) Alignements de séquences : HSP22 chez l'homme et chez le rat**

Cet alignement est obtenu par la méthode SIM sur le serveur [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Il donne 95,4% d'identité sur 196 résidus se chevauchant.

10X PBS\* (Phosphate Buffer Saline) (0,1M PBS, pH 7,2)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,9 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,2 g, NaCl 90 g, Eau distillée 1000 ml (ajustement du pH à 7,2).

Gel d'acrylamide (pour le Western Blot)\*

Pour un gel à 10% (pourcentage nécessaire pour HSP70)

*Gel de séparation (des protéines en fonction de leur taille) :*

H<sub>2</sub>O (2,72ml), 30% polyacrylamide (2,32ml), 1,5M Tris pH8.8 (1,82ml), 10% SDS (70µl) (sodium dodécyl sulfate, détergent: ajoute des charges négatives aux protéines et rompt les liaisons hydrophobes), 10% APS (70µl) (persulfate d'ammonium, agent de polymérisation), TEMED (10µl) (agent de polymérisation)

*Gel de concentration (des protéines) :*

H<sub>2</sub>O (3,61ml), 30% polyacrylamide (0,66ml), 1M Tris pH6,8 (0,63ml), 10% SDS (50µl), 10% APS (70µl) (agent polymérisant), TEMED (5µl) (agent polymérisant)

Pour un gel à 12% (pourcentage nécessaire pour HSP22)

*Gel de séparation (des protéines en fonction de leur taille) :*

H<sub>2</sub>O (2,25ml), 30% polyacrylamide (2,78ml), 1,5M Tris pH8.8 (1,82ml), 10% SDS (70µl), 10% APS (70µl), TEMED (10µl).

*Gel de concentration (des protéines) :*

H<sub>2</sub>O (3,61ml), 30% polyacrylamide (0,66ml), 1M Tris pH6.8 (0,63ml), 10% SDS (50µl), 10% APS (70µl) (agent polymérisant), TEMED (5µl) (agent polymérisant)

Dosage des protéines (méthode de Bradford - Biorad assay) \*

Cette méthode permet la détection directe de la concentration en protéines d'un extrait donné. Seule une solution protéique pure (c'est-à-dire qui ne contient qu'une espèce protéique) permet de donner la concentration d'une seule protéine. La gamme de Bradford est réalisée, à l'aide d'une solution mère de BSA (bovine sérum albumine) à 1mg/ml, dans des tubes et l'absorbance à 595 nm des échantillons protéiques numérotés de 0 à 9 est mesurée. Pour la préparation des échantillons de 0 à 9, l'eau est ajoutée d'abord, puis les protéines, puis (en dernier) la solution de Bradford :

0 0 µl de BSA (1mg/ml) +800 µl d'eau distillée+200 µl de Bradford (concentration finale (Cf) de BSA : 0µg/ml)

1 2 µl de BSA (1mg/ml) +798 µl d'eau distillée +200 µl de Bradford (Cf<sub>BSA</sub> = 2µg/ml)

2 4 µl de BSA (1mg/ml) +796 µl d'eau distillée +200 µl de Bradford (Cf<sub>BSA</sub> = 4µg/ml)

3 6 µl de BSA (1mg/ml) +794 µl d'eau distillée +200 µl de Bradford (Cf<sub>BSA</sub> = 6µg/ml)

4 8 µl de BSA (1mg/ml) +792 µl d'eau distillée +200 µl de Bradford (Cf<sub>BSA</sub> = 8µg/ml)

5 10 µl de BSA (1mg/ml) +790 µl d'eau distillée +200 µl de Bradford (Cf<sub>BSA</sub> = 10µg/ml)

6 12 µl de BSA (1mg/ml) +788 µl d'eau distillée +200 µl de Bradford (Cf<sub>BSA</sub> = 12µg/ml)

7 14 µl de BSA (1mg/ml) +786 µl d'eau distillée +200 µl de Bradford (Cf<sub>BSA</sub> = 14µg/ml)

8 16 µl de BSA (1mg/ml) +784 µl d'eau distillée +200 µl de Bradford (Cf<sub>BSA</sub> = 16µg/ml)

9 18 µl de BSA (1mg/ml) +782 µl d'eau distillée +200 µl de Bradford (Cf<sub>BSA</sub> = 18µg/ml)

La droite de dosage des protéines A<sub>595</sub> en fonction de la concentration finale en BSA (µg/ml) est tracée. La concentration d'un échantillon protéique A est mesurée: α µl d'extrait protéique A sont prélevés et (800-α) µl d'eau distillée sont ajoutés plus 200 µl de Bradford. L'absorbance à 595 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Biorad, Hercules, CA, USA).

La droite de dosage tracée sert à la détermination de la concentration (en µg/ml) de l'échantillon protéique A. La concentration de la protéine est donnée par l'équation suivante :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = (A_{595(A)} \times \text{pente de la droite de dosage}) / \alpha (\mu\text{l}).$$

Extraits cellulaires

Tampon HYPO\*

10 mM HEPES pH7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF (ou de AEBSF).

Tampon HYPER\*

20 mM HEPES pH7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF (ou de AEBSF) + 10% de glycérol + 0,6% de Nonidet NP40 (IGEPAL) + inhibiteurs de protéases et de phosphatases.

Tampon NET-N\*

50 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA ; 120 mM NaCl ; 0,5% Nonidet NP40, supplémenté avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases

Tampon de bleu de charge pour la migration des protéines\* (pour 100 µl à 3X)

20 µl de SDS 10% (rompt les liaisons hydrophobes), 20 µl glycérol, 25 µl de stacking buffer (tampon de concentration : 1M de TRIS à pH 6,8), 10 µl de bleu de bromophénol, 5 µl de béta-mercaptoéthanol (réducteur des ponts disulfures).

Tampon de migration 1X\*

12 g de Tris Base, 57,4 g de glycine, 40 ml de SDS 10%, H<sub>2</sub>O 5 000ml

Tampon de transfert (Western Blots)\*

Tris Base 17,4 g, glycine 86,4 g, méthanol 1 200 ml, SDS (20%) 3 ml, H<sub>2</sub>O 4 800 ml

Solutions pour l'immunofluorescence

Tampon de fixation\*

4% paraformaldéhyde (PFA), 2% sucrose, 94% PBS

Solution de lyse\*

20 mM HEPES, pH7,4, 50 mM de NaCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 300 mM de sucrose 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

## Annexe II – Etude structurale

<b>Modification</b>	<b>Co-facteur requis</b>	<b>Site de la modification</b>	<b>Exemple de protéines modifiées</b>
<b>Acétylation</b>		acide aminé N-terminal ou K	histones
<b>ADP-ribosylation</b>		addition de poly-(ADP-ribose)	histones, lamine B, enzymes métabolisme ADN
<b>Amidation</b>	vitamine C	acide aminé C-terminal	gastrine ; neuropeptides et hormones peptidiques
<b>Biotinylation</b>	biotine (vitamine H)	K	carboxylase
<b>Hydroxylation</b>	vitamine C	P, K, D et Y	collagène
<b>Méthylation</b>	S-adenosyl-L-méthionine	K, H, R, D, E	actine ; calmoduline ; cytochrome C
<b>Phosphorylation</b>	divers (AMPc)	Y, S, T	kinases
<b>Modification impliquant des acides gras</b>	Isoprénylation	Cystéine en position C-terminale et le farnésyl ou le géranyl-géranyl	Ras
<b>Modification impliquant des acides gras</b>	Myristoylation N-terminale	Glycine en position N-terminale et acide myristique (myristoyl-CoA)	NADH-cytochrome b5
<b>Modification impliquant des acides gras</b>	S-palmitoylation (ou S-acylation)	Cystéine interne et acide palmitique : liaison thioester	rhodopsine
<b>Modification impliquant des acides gras</b>	N-palmitoylation	Cystéine N-terminale et acide palmitique : liaison amide	
<b>Ubiquitination</b>		K - Addition de polypeptides	histones H2A, H2B

**Tableau II) Les modifications post-traductionnelles les plus courantes**

HSP22 BamH1 (sens) - 33 nucléotides –  $T_M=64^\circ\text{C}$

5' caaGGATCCatggtgacggtcagatgcccttc 3'

HSP22 EcoR1 (réverse) - 32 nucléotides –  $T_M=61^\circ\text{C}$

5' caaGAATTCtaggtacaggtgacttctctggc 3'

HSP70-1 BamH1 (sens) - 31 nucléotides –  $T_M=69^\circ\text{C}$

5' caaGGATCCatggccaaagccggegcatcg 3'

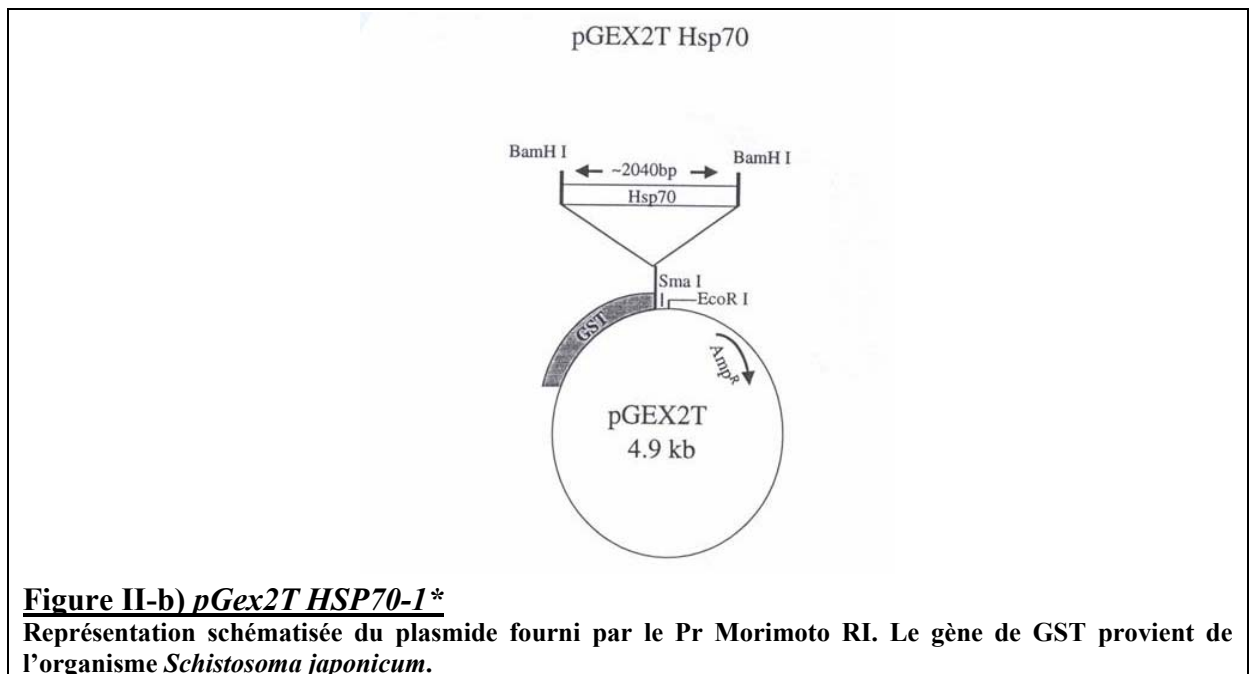
HSP70-1 EcoR1 (réverse) - 31 nucléotides -  $T_M=64^\circ\text{C}$

5' caaGAATTCctacctctcaatggtggggcc 3'

**Figure II-a) Amorces utilisées pour le clonage de HSP22 et HSP70**

Les sites de clivages des enzymes de restriction BamH1 et EcoR1 sont représentés en caractères majuscules. Les codons d'initialisation et de fin de transcription sont représentés en vert (start) ou en rouge (stop). Amorces vérifiées par la firme MWG ([www.mwgdna.com](http://www.mwgdna.com)).

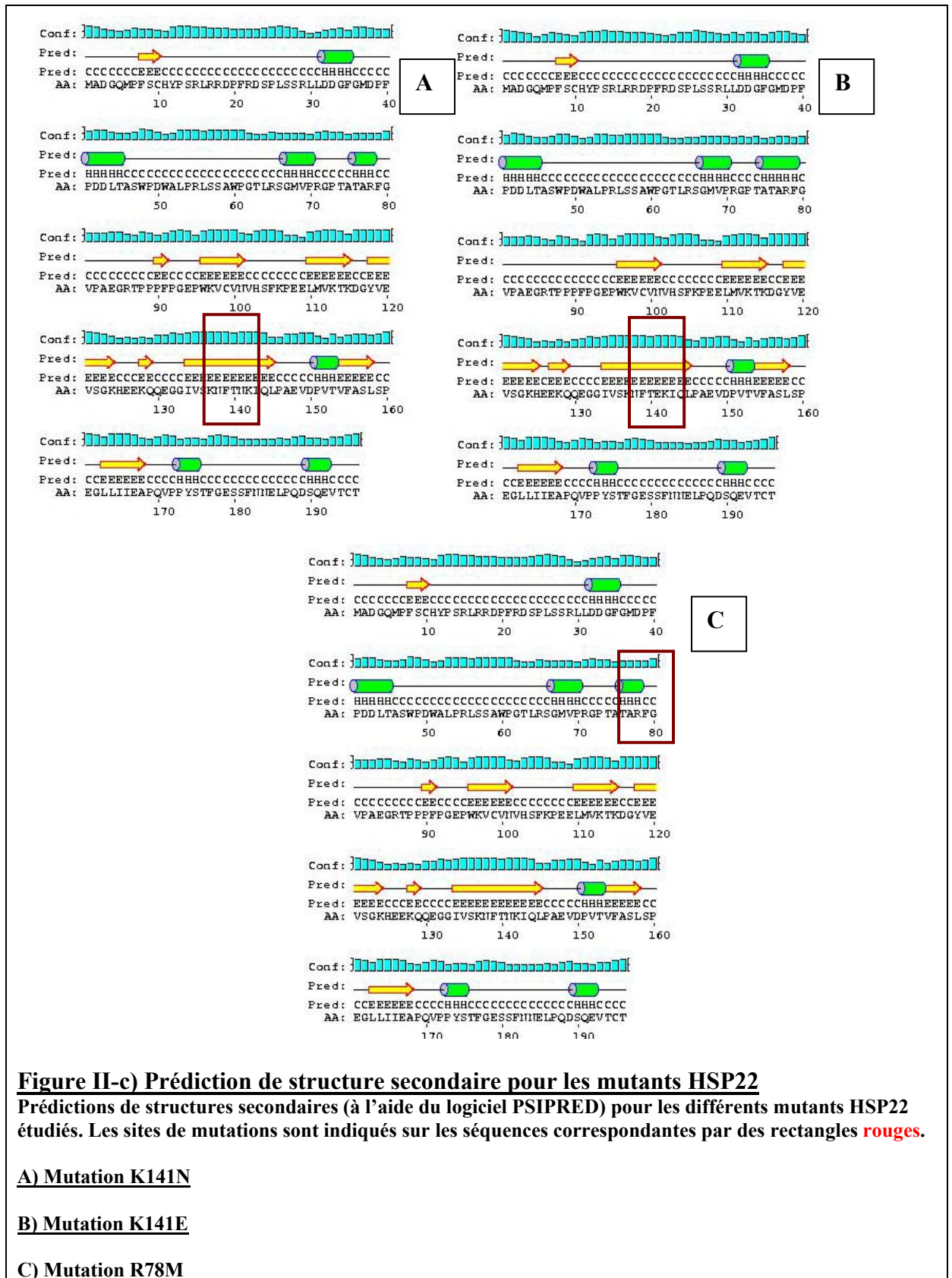
**Remarque :** seule la partie qui s'hybride est comptabilisée dans le calcul du  $T_M$ .



**Figure II-b) pGex2T HSP70-1\***

Représentation schématisée du plasmide fourni par le Pr Morimoto RI. Le gène de GST provient de l'organisme *Schistosoma japonicum*.





HSP22\_humaine MADGQMPPFSCHYPSRLRRDPFRDSPLSSRLDDGFGMDPPDDLTA SWPDWALPR----- 55  
HSP20\_Cyanobactérie -----MALVRWDPFREIDEIQRE----- 18  
HSP20\_M.jannascia -----MFRDPPFDSLFRMFKEFFATP----- 22  
HSP20\_Thermus -----MMRFDPPFKELEELQER----- 16  
HSP20-Taenia -----MSIFPTRDSRDLSSRRRTEFDWEFPQMALVPLDQVFDWAERSRQSLHDDIVNMHR 55  
HSP22\_Drosophila -----MRS LPMFWRMAEEMARMPRLSSPFHAFHFHEPP----- 32  
HSP20\_Deinococcus -----MSAGGSTPELHSQEEQHMMRFDPPFREIEELTQR----- 33

HSP22\_humaine -----LSSAWPGTLRSGMVRGPTATARFGVPAEGRTPPP-----FPGEPWK 97  
HSP20\_Cyanobactérie -----MNRMFDRILIPRTTEADGFAFMPAVEMHD-----DPETIT 52  
HSP20\_M.jannascia -----MTGTTMIQSSSTGIQISGKGFMPISII-----GDQHIK 55  
HSP20\_Thermus -----LVRAFG-----APQQGPRVYAPPVDVWE-----DEGLH 45  
HSP20-Taenia NLFSLPEPFTAMDNAFESVMKEMSAIQPREFHPELEYTQPGELDFLKDAYEVGKDGRLHFK 115  
HSP22\_Drosophila -----VWSVALPRNWQH IARWQEQELAPPATVNK-----DGK 65  
HSP20\_Deinococcus -----MDRAFA-----SGGAQTTRFAPPVDVHE-----DEQGLE 62

HSP22\_humaine VCVNVHSFKPEELMVKTKDGYVEVSGKHEEK----- 128  
HSP20\_Cyanobactérie LKLELPGLNPNLDLQATAEAVSITGERRFEK----- 84  
HSP20\_M.jannascia VIAWLPGVNKEDIILNAVGDLEIRAKRSPLMIT----- 89  
HSP20\_Thermus LLVYLPGEVEPEKVEVVAEEGVLVSKAERPFE----- 76  
HSP20-Taenia VYFNVKNFKAEIITIKADKNKLVVRAQKSVACGDAAMSESVGRSIPLPPSVDRNHIQATI 175  
HSP22\_Drosophila LTLDVKDYSELKVKVLDSEVVLVEAKSEQQE----- 96  
HSP20\_Deinococcus LTLDIPGVKPEDIQIEAENQTLTVQAERRYS----- 93  
: : . . : : : ..

HSP22\_humaine -----QQEGGIVSKN-----FTKKIQLPAEVDPVTVFASLSPEGL 163  
HSP20\_Cyanobactérie -----RSEDKGVTTRTEFRYG-----RFQRVILPNRIKHDQVKAAYK-DGI 124  
HSP20\_M.jannascia -----ESERIIYSEIPEEEEE-----IYRTIKLPATVKEENASAKFE-NGV 128  
HSP20\_Thermus -----RKENAAYHRLEGTYG-----TFVRSFNVPSTYDLSKVQARFR-HGV 116  
HSP20-Taenia TTDDVLVIEAPVNEPNYKAIKLSPEKGLAIQPSVQERQLAVKNKEGLEIVTAEDG-SKK 234  
HSP22\_Drosophila -----AEQGGYSSRH-----FLRRFVLP EGYEADKVSTLSSDGV 131  
HSP20\_Deinococcus -----RGEGRTAHRVERAYG-----TFTRTFVPAKYDLTKVEADFD-HGT 133  
. : : . :

HSP22\_humaine LIIEAPQVPPYSTFGESSFNNEPQDSQEVCT----- 196  
HSP20\_Cyanobactérie LTLTLPKADSEKAQVVKVS-----VVS----- 146  
HSP20\_M.jannascia LSVILPKAESSIKKGINIE----- 147  
HSP20\_Thermus LHLLVPRAEATKPKKIQVQ-----VE----- 137  
HSP20-Taenia IHLELKVDPHFAPKDVKVVAKGNKVYVHGVGTGKEEK TENASHSEHREFYKAFVTPPEVVDA 294  
HSP22\_Drosophila LTISVNPNGVQETLKEREVTEIQTGEPAKKSAEPEPKDKTASQ----- 174  
HSP20\_Deinococcus LNLRVPRSEAAQKRSISVRSGGQLAQPKTVEAEQPEPTVQPSADTAATE----- 182  
: :

HSP22\_humaine -----  
HSP20\_Cyanobactérie -----  
HSP20\_M.jannascia -----  
HSP20\_Thermus -----  
HSP20-Taenia SKTQAEIVDGLMVVEAPLFK 314  
HSP22\_Drosophila -----  
HSP20\_Deinococcus -----

Séquence 1: HSP22\_humaine 196 aa  
Séquence 2: HSP20\_Cyanobactérie 146 aa  
Séquence 3: HSP20\_M.jannascia 147 aa  
Séquence 4: HSP20\_Thermus 137 aa  
Séquence 5: HSP20-Taenia 314 aa  
Séquence 6: HSP22\_Drosophila 174 aa  
Séquence 7: HSP20\_Deinococcus 182 aa

Alignement des séquences prises 2 à 2 (%):

Séquences (1:2) Score: 14  
Séquences (1:3) Score: 4  
Séquences (1:4) Score: 13  
Séquences (1:5) Score: 11  
Séquences (1:6) Score: 10  
Séquences (1:7) Score: 14  
Séquences (2:3) Score: 16  
Séquences (2:4) Score: 30  
Séquences (2:5) Score: 19  
Séquences (2:6) Score: 14  
Séquences (2:7) Score: 30  
Séquences (3:4) Score: 17  
Séquences (3:5) Score: 10  
Séquences (3:6) Score: **2**  
Séquences (3:7) Score: 18  
Séquences (4:5) Score: 18  
Séquences (4:6) Score: 16  
Séquences (4:7) Score: **51**  
Séquences (5:6) Score: 9  
Séquences (5:7) Score: 13  
Séquences (6:7) Score: 17

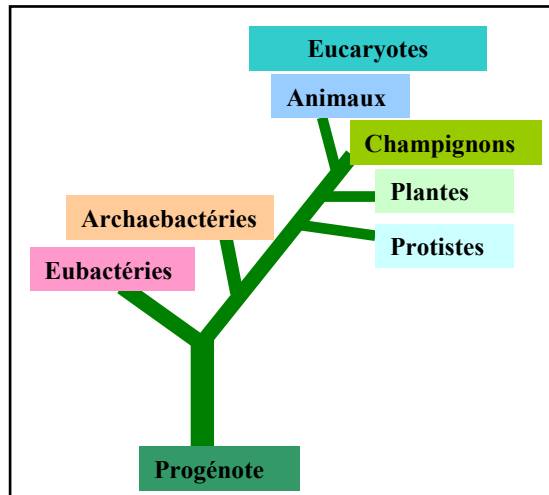
**Figure II-d) Alignements multiples ayant servis à l'élaboration de l'arbre phylogénétique (figure 48)**

**A) Alignements multiples.**

Créés par le logiciel ClustalW sur <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw/>

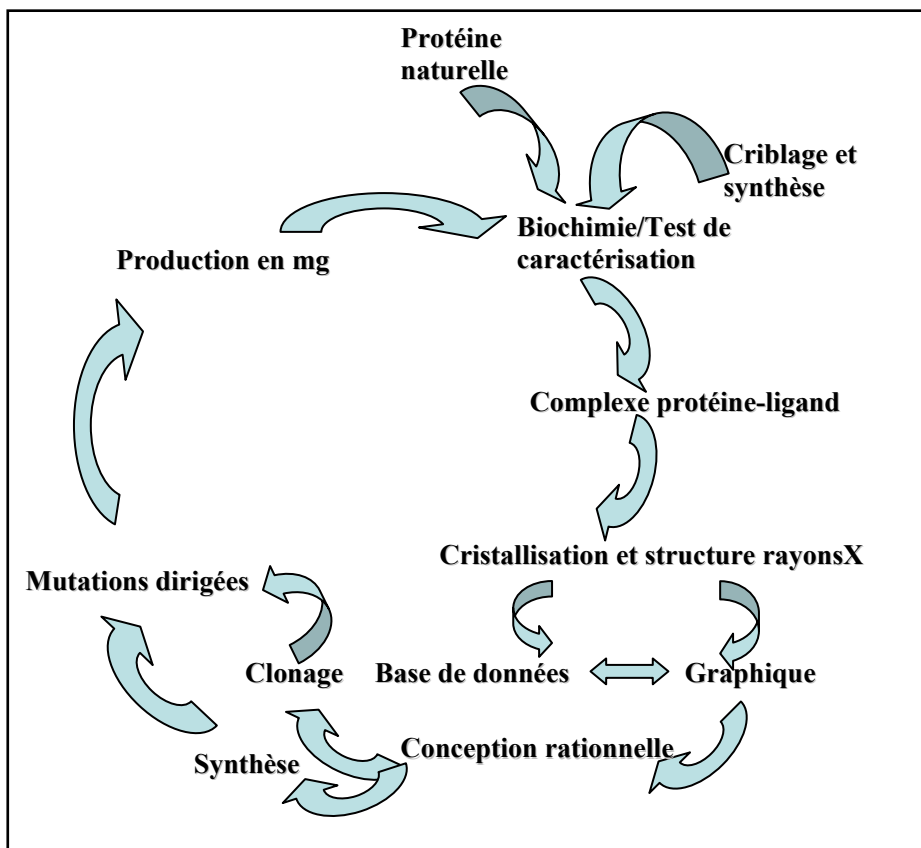
**B) Scores d'alignements:**

Séquences prises 2 à 2 (en %).



**Annexe II-e) L'arbre d'évolution cellulaire selon Carl Woese\***

Arbre décrit par Carl Woese en 1977. Cet arbre phylogénétique se base sur les résultats obtenus par l'étude des ARNr issus de la sous unité 16S du ribosome ; le progénote étant défini comme l'ancêtre commun à tous les êtres vivants (Woese CR et Fox GE, 1977).



**Figure II-f) Cycle du drug design\***

Schéma représentant les différentes étapes nécessaires à l'élaboration d'un nouveau médicament. Une application possible de la cristallographie : le drug design (Bertrand JA *et al*, 1997).

LB\* (Luria Broth medium)

10g bacto-tryptone, 5g bacto-yeast extract, 10g NaCl, H<sub>2</sub>O qsp 1 litre pH 7,0

TBE 1X\*

TRIS-Borate 89 mM, EDTA disodique 2mM pH 8

Mélange de PCR\*

En utilisant l'enzyme polymérase pfx Platinum de chez Invitrogen (Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France) (pour un volume final de 50µl), le mélange suivant est préparé : 5µl de tampon de pfx (10X), 1,5µl de dNTP (10mM), 1µl de MgSO<sub>4</sub> (50mM), 1,5µl de mix d'amorces (10µM chaque), 1µl ADN (500ng), 1µl d' "enhancer PCR" (10X), 1µl pfx platinum et 34µl d'eau distillée.

Double digestion\*

(mélange réalisé dans l'ordre)

Pour les inserts

20µl d'insert, 6µl du tampon de BamH1 contenant de la BSA (bovine serum albumine), 30µl d'H<sub>2</sub>O distillée, 2µl de BamH1, 2µl d'EcoR1.

Pour le plasmide pRSET(A)

10µl du plasmide (ça dépend de la concentration de départ), 6µl du tampon de BamH1 contenant de la BSA, 39µl d'H<sub>2</sub>O distillée, 2µl de BamH1, 2µl d'EcoR1, 1µl de phosphatase alcaline (cette enzyme va enlever le phosphate ce qui permettra au plasmide de ne pas se re-liguer avec lui-même).

Mélange de ligation\*

(volume final égal à 10µl) : 1µl du plasmide digéré, 4µl de l'insert digéré, 1µl du tampon de ligase (10X) contenant de l'ATP, 3µl d'eau distillée et 1µl de T4 DNA ligase (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada).

Tampon de lyse pour les bactéries\*

NaCl 250mM, Tris 50mM à pH 7,5, glycérol 5% (v/v), Triton X100 0,2% (v/v)

Composition des tampons pour la purification d'une protéine en fusion avec glutathion S transférase (GST) :

Tampon A\* (équilibre) :

50 mM Tris-HCl pH 8

300 mM NaCl

Tampon B\* (élution) :

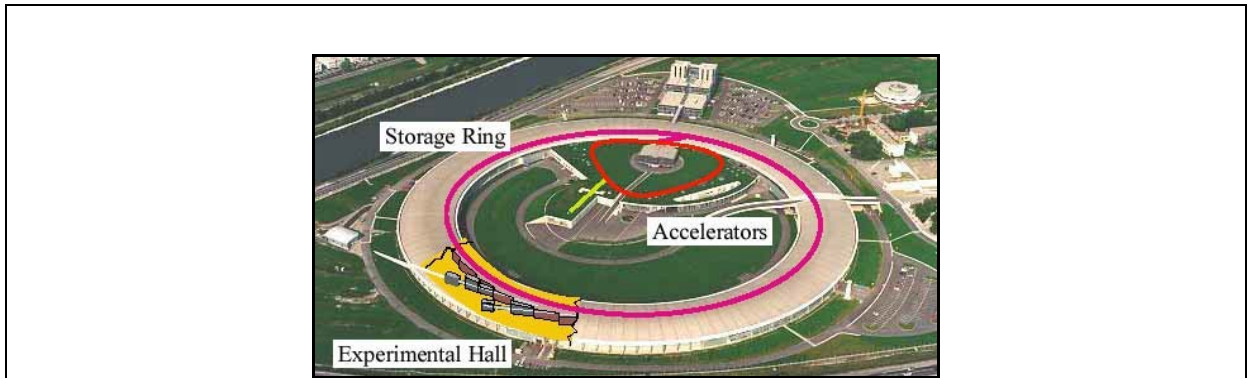
50 mM Tris-HCl pH 7,5

200 mM NaCl

10 mM glutathion réduit

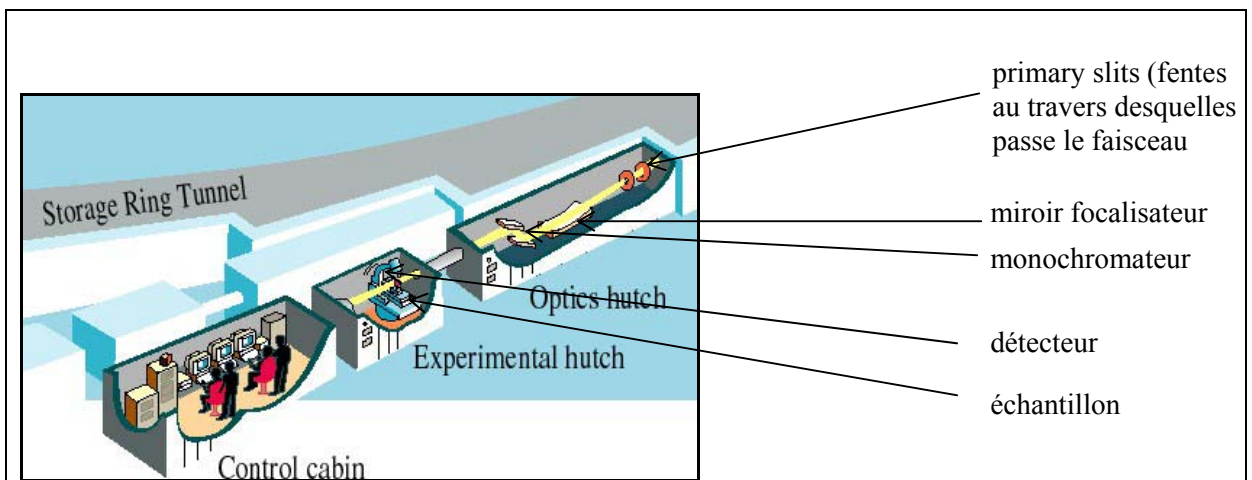
Colonne d'affinité : GSTrap FF de chez Amersham Biosciences.

## Annexe III – Fonctionnement du synchrotron



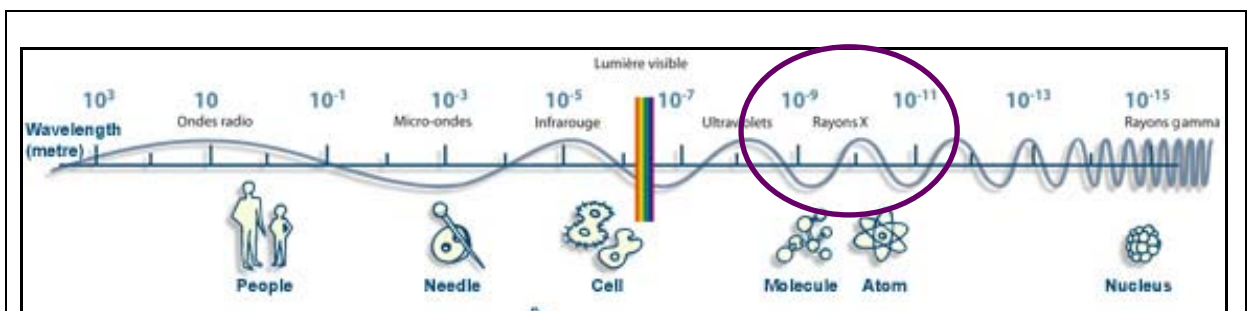
**Figure III-a) *Plan de la machine\** (synchrotron vu de haut)**

Les accélérateurs sont indiqués en jaune (linac) et en rouge (booster) et l'anneau de stockage en rose.



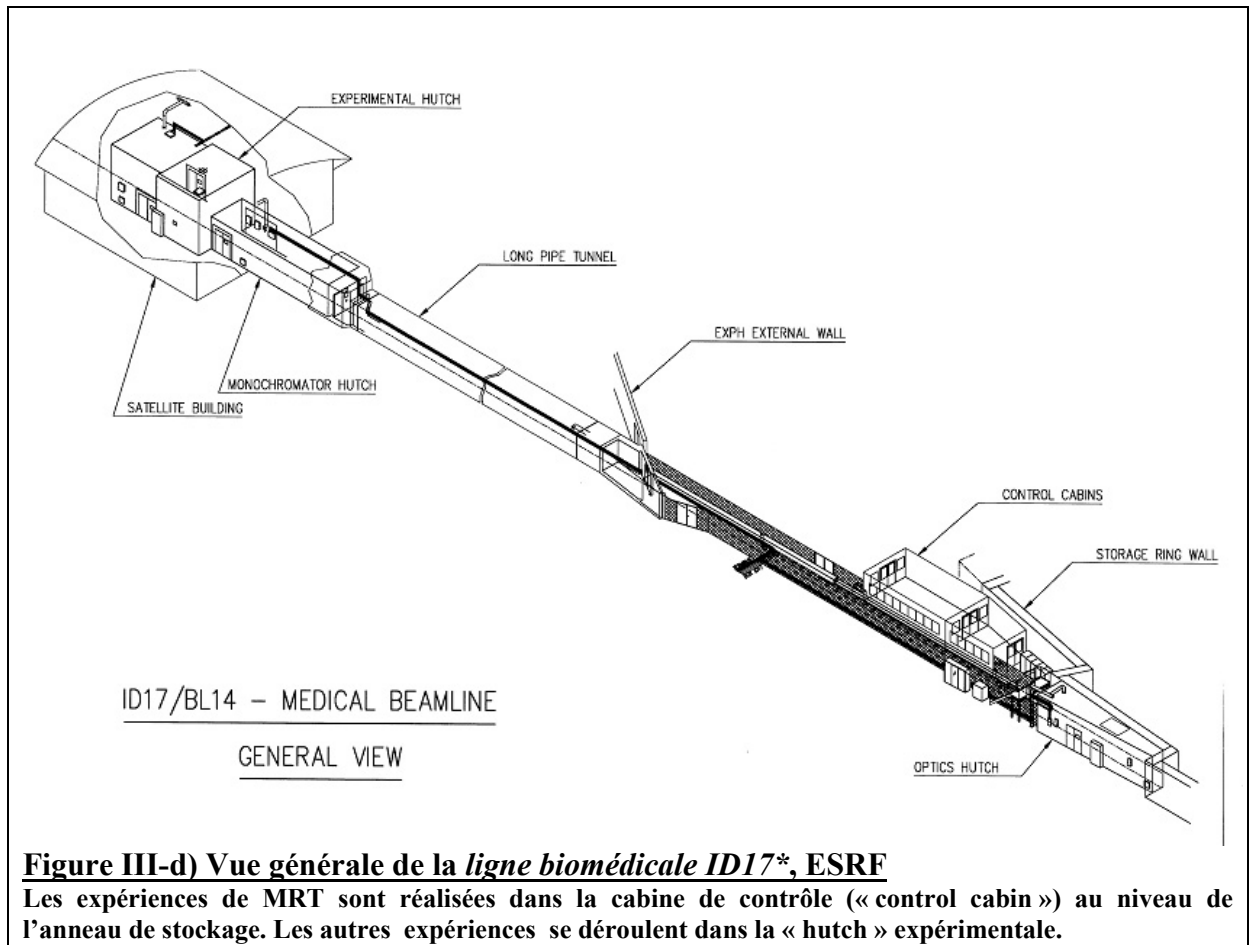
**Figure III-b) *Représentation d'une ligne de lumière\****

Schéma représentant les éléments principaux d'une ligne de lumière (il existe des variations suivant le type d'expérience pratiquée).



**Figure III-c) *Spectre de longueurs d'ondes : les rayons X***

Représentation du spectre de longueurs d'ondes. Les dessins en dessous montrent à quoi cela correspond (en dimension).



**Figure III-d) Vue générale de la *ligne biomédicale ID17\**, ESRF**

Les expériences de MRT sont réalisées dans la cabine de contrôle (« control cabin ») au niveau de l'anneau de stockage. Les autres expériences se déroulent dans la « hutch » expérimentale.

## Liste des publications

**Rénier W et al, soumis (A):** **Rénier W**, Gamo K, Joubert A, Bencokova Z, Gastaldo J, Marot D, McSweeney S, Foray N: Human HSP70-1 is a phosphorylation substrate of ATM that is required for stress signaling and DNA double-strand breaks repair pathways in response to ionizing radiation. En cours de soumission.

**Rénier W et al, soumis (B):** **Rénier W**, Joubert A, Gastaldo J, Bencokova Z, McSweeney S, Foray N: The bleed-through phenomenon generates artefacts in immunofluorescence of proteins forming nuclear foci: risks of misinterpretations for early post-stress events. En cours de soumission.

**Rénier W et al, (C):** **Rénier W**, Coan P, McSweeney S, Bravin A. Preliminary results of radiosensitivity of human primary cultured chondrocytes and fibroblasts upon X-ray doses delivered by phase contrast imaging<sup>1</sup>. En préparation.

**Rénier W et al, (D):** **Rénier W**, Coan P, McSweeney S, Bravin A: Human HSP22, involvement in aging processes and in DNA double strand breaks repair pathways<sup>2</sup>. En préparation.

Collaboration: Joubert A, Gamo K, Bencokova Z, Gastaldo J, **Rénier W**, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett C.F., Jeggo P. A., Foray N: DNA double-strand breaks repair in syndromes associated with acute radiation response: a balance between DNA-PK- and MRE11-mediated pathways. En cours de soumission.

---

<sup>1</sup> et <sup>2</sup> Titre et liste des auteurs provisoires.



HSP22 et HSP70 sont des protéines d'origine humaine appartenant à la famille des Heat Shock Proteins. Cette thèse décrit des travaux visant à déterminer l'implication de ces deux protéines humaines de choc thermique HSP70 et HSP22, dans les voies de réparation de l'ADN après stress. Ces protéines possèdent, comme leur nom le sous-entend, la capacité d'être surexprimées par la cellule après choc thermique mais aussi après une grande variété d'autres stress et dans de nombreuses maladies (Tavaria M *et al*, 1996). Pour mieux connaître ces protéines, une étude structurale a été initiée. Les structures tridimensionnelles de ces protéines ne sont pas connues ou seulement partiellement (Osipiuk J *et al*, 1999). Les essais de cristallisation des protéines furent arrêtés après l'obtention de clones. Des prédictions de structures secondaires et tertiaires (obtenues à l'aide de la bioinformatique) concernant HSP70-1 (partie C-terminale) et HSP22 furent alors réalisées, montrant une organisation en feuillets  $\beta$  pour le domaine de liaison au substrat de HSP70-1 et pour le domaine  $\alpha$ -cristallin de HSP22. Les résultats obtenus dans le cadre de l'étude des HSP dans les voies de la réparation de l'ADN ont montré que les HSP70 inductibles par le stress (HSP72 et HSP70-1) sont impliquées dans ces voies cellulaires après différents stress (rayonnement X et UV, champ magnétique, peroxyde d'hydrogène, cis-platine). HSP72 et HSP70-1 sont phosphorylées par les kinases apparentées à la famille des Phosphatidyl-Inositol-3-kinases ATM, ATR et DNA-PK (Sarkaria JN *et al*, 1998) après radiations ionisantes et réalisent à ce moment un déplacement en deux phases entre le cytoplasme et le noyau ; elles sont impliquées dans les stades précoces de la réparation. La même démarche de recherche a été adoptée pour HSP22. HSP22 apparaît comme étant impliquée dans les voies de la réparation de l'ADN aussi et plus particulièrement dans les voies de la réparation des cassures double brin après irradiation par rayonnement X (Paull TT et Gellert M, 1998 ; Lobrich M et Jeggo PA, 2005). HSP22 forme des foci dans les cellules âgées suggérant un rôle pour HSP22 dans le vieillissement cellulaire chez l'humain comme chez la mouche drosophile (Morrow G *et al* 2004). Une nouvelle méthode d'imagerie Diffraction Enhanced Imaging (DEI ; Chapman D *et al*, 1997), visant à l'acquisition d'une information histologique, développée au synchrotron ESRF, a été testée d'un point de vue radiobiologique sur des cultures primaires de fibroblastes et de chondrocytes. L'irradiation par cette méthode n'a pas présenté de différence en comparaison avec une irradiation par une source conventionnelle de cellules humaines issues de culture primaire, avec la même dose de rayonnement X (Rothkamm K et Lobrich M, 2003). Dans les cellules glioblastomales de rat, la réponse HSP70 est augmentée dans les conditions de la thérapie « synchrotron PAT-Plat » (c'est-à-dire en cas de photoactivation du platine à l'aide du rayonnement synchrotron (Corde S *et al*, 2003 ; Biston MC *et al*, 2004)).

HSP22 and HSP70 are human proteins belonging to Heat Shock Proteins family. The involvement of HSP70 and HSP22 in DNA repair pathways after stress is described in this thesis. These proteins have the ability, as suggested by their name, to be over expressed in cells after heat shock but also following a huge variety of stresses and in several diseases and cellular disorders (Tavaria M *et al*, 1996). In order to increase the knowledge on these proteins, a structural study has been initiated. The three-dimensional structures of these proteins are not or only partially known (Osipiuk J *et al*, 1999). Protein structural assays have lead to the creation of clones oh HSP70-1 and HSP22 and structural predictions have been performed for C-terminal part of HSP70-1 and HSP22, suggesting a  $\beta$ -fold organization for the HSP70-1 substrate binding domain and for the HSP22  $\alpha$ -crystallin domain. Results obtained in a DNA repair pathways study have shown that the HSP70s induced by stress (HSP72 and HSP70-1) take part in these pathways after several stresses (X-ray and UV, magnetic field, hydrogen peroxide, cis-platin). HSP72 and HSP70-1 are phosphorylated by PI3kinases related family members ATM, ATR and DNA-PK (Sarkaria JN *et al*, 1998) after ionizing radiation and perform a two phases displacement between the cytoplasm and the nucleus; HSP72 and HSP70-1 are involved in the early stages of DNA repair processes. HSP22 seems to be involved in DNA double strand break (DSB) repair pathways after X-ray irradiation (Paull TT and Gellert M, 1998; Lobrich M and Jeggo PA, 2005). Moreover, HSP22 appears to be involved in cellular aging processes as has been observed for its homolog in the fly drosophila (Morrow G *et al* 2004). The method Diffraction Enhanced Imaging (DEI; Chapman D *et al*, 1997), developed at the ESRF biomedical beam line ID17, in order to achieve histological information, has been tested in a radiobiological context on primary chondrocytes and fibroblasts. Irradiation using this method has not caused more damage than irradiation of primary cultured human cells with a conventional source delivering the same dose (Rothkamm K and Lobrich M, 2003). In rat glioblastoma cells, HSP70 response is increased under "synchrotron PAT-Plat" therapy conditions (platinum photoactivation via synchrotron light (Corde S *et al*, 2003; Biston MC *et al*, 2004)).

## **Chapter I**

Since life's origins, 3.8 billion years ago, living organisms have face of a continuous shower of particles and photons of all energies. DNA is one of the targets of this radiative stress. DNA covalent bonds or DNA lower energy bonds are likely to be broken or damaged, which would, without the existence of appropriate repair mechanisms, lead to the loss of genetic information and to cellular destruction. To survive and to assure specie survival, several mechanisms have been developed through evolution. Some of the pathways involved in DNA repair after stress such as non homologous end joining pathway (NHEJ), homologous recombination (H Rec), nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER) are detailed in chapter I. These pathways aim to repair DNA in order to prevent the activation of cellular death pathways, their failure potentially leading to tumoral transformation. DNA double strand breaks (DSB) feature, amongst various types of DNA damage as the most dangerous to cellular survival and the most difficult to repair. These DNA breaks are usually repaired by homologous recombination (H Rec ; Gatz SA et Wiesmuller L, 2006) or by NHEJ (Morrison C *et al*, 1997 ; Lieber MR *et al*, 2004). Other types of DNA damage exist, for instance DNA single strand breaks (SSB) or base damage that are repairable by corresponding pathways (H Rec or BER or NER).

This chapter describes the molecular and cellular response to X-ray and UV irradiation by focussing upon DNA damage management.

## **Chapter II**

First described in drosophila larva in the early sixties, the Heat Shock Proteins (HSP) have continued to be studied (Ritossa FM, 1964). These proteins have been shown to be overexpressed after hyperthermia exposure, not only in Drosophila but in all organisms. This particularity of being overexpressed after heat shock has given them their name. The knowledge of their roles has been extended following their discovery. They are now known to participate in the response to a variety of stresses such as heavy metals, ionizing radiation, drugs exposure or such as viral or bacterial infections. They are also overexpressed in degenerative diseases, for example in Alzheimer disease. It appears that HSP facilitate survival in non-optimal environments (Karp G, 2004). HSP are known to play a number of major physiological roles. Being molecular chaperones, HSP bear several associated functions including protein refolding, protein trafficking, prevention of protein aggregation, among more specific roles included in cellular signalling pathways, including apoptosis (Tavaria M *et al*, 1996). The HSP are described in chapter II.1. In order to increase the knowledge of the chosen proteins HSP70-1 and HSP22 holding potential PI3kinases relatives (ATM, ATR and DNA-PK) phosphorylation substrates domains in their sequences, a structural study has been initiated (Sarkaria JN *et al*, 1998; Abraham RT, 2004). Three-dimensional structures of these proteins are not or only partially known (Osipiuk J *et al*, 1999). A protein crystallography resume is presented in chapter II.1 and the methods used are indicated in chapter II.2. Results obtained for crystallization preparation trials and structural predictions (secondary and three-dimensional) are shown in chapter II.3. Chapter II.4 concludes and summarizes this theme.

## **Chapter III**

The role played by HSP, and by HSP70 and HSP22 in particular, in DNA repair pathways is poorly understood. HSP70 and HSP22 have been selected for this study because their amino acid sequences suggest a potential role as phosphorylation substrates of PI3 kinases related family members involved in DNA repair pathways: ATM, ATR and DNA-PK (Sarkaria JN *et al*, 1998; Abraham RT, 2004). Medical applied studies involving HSP70 have been followed, notably based on two novel techniques developed at the ESRF biomedical beamline. The diffraction enhanced imaging technique (DEI) (Chapman D *et al*, 1997), has been tested from a radiobiological point of view on primary chondrocytes and fibroblasts cultured cells. This technique allows histological information on the sample or patient to be analyzed. This DEI method is studied in the laboratory on a cartilage model (Wagner A *et al*, 2005). This method delivers a very low dose ( $\approx 9$  mGy) at an energy of 51.5 keV. Recently, evidence of low-dose damage has been shown (Marples B *et al*, 2004), hence the DEI method has been studied in a radiobiological approach in the corresponding cartilage cellular model (i.e. chondrocytes). The HSP70 response has also been analyzed in the context of the therapy devoted to the cure of glioblastoma (“synchrotron PAT-Plat” is a sub technique of SSRT) in the rat glioblastoma cellular model F98 (Corde S *et al*, 2003; Biston MC *et al*, 2004). The cis-platinum preincubated cells have been irradiated at the corresponding K-edge shell energy (i.e. at 78.34 keV *above*) using the synchrotron monochromatic X-ray beam, before analysis. The F98 model had previously been shown to achieve a 34% of survival in rats after this new treatment combining the use of a drug commonly used in chemotherapy (cis-platinum) and X-ray irradiation. This work is contained in chapter III (III.1). The corresponding methods are developed in chapter III.2. The results obtained experimentally are described in chapter III.3. The chapter III.4 summarizes the results.

