

Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives

Les petites protéines de choc thermique (sHsps) constituent une famille diversifiée et répandue de chaperons moléculaires. Ce sont des protéines exprimées de façon ubiquitaire et qui sont présentes dans tous les règnes de la vie. Les sHsps ont d'abord été identifiées chez *Drosophila melanogaster* en tant que protéines de petit poids moléculaire inductibles par la chaleur (Tissieres et al., 1974). L'expression de nombreuses sHsps est régulée positivement dans le cadre de la réponse au stress cellulaire, mais ces protéines fonctionnent également de manière constitutive dans de nombreux types cellulaires, tissus et organismes (Basha et al., 2012). La plupart des sHsps sont capables d'agir comme des chaperons moléculaires ATP-indépendant en empêchant l'agrégation irréversible des protéines mal repliées.

Le génome de *Drosophila melanogaster* code pour 12 petites Hsp, qui s'expriment distinctivement lors du développement et qui ont différentes localisations intracellulaires et spécificités de substrats. Dans le cadre de cette thèse, j'ai étudié la structure et la fonction de DmHsp27, une sHsp nucléaire chez la drosophile. Ce travail a été essentiellement axé sur la question de savoir comment les oligomères de DmHsp27 accomplissent leur fonction de chaperons moléculaires. Pour aborder cette question, diverses méthodes biochimiques et biophysiques ont été mises en place.

5.1 DmHsp27 n'est pas le seule sHsp nucléaire chez les insectes

La relocalisation des sHsps cytosoliques dans le noyau est observée dans certaines conditions de stress chez pratiquement tous les mammifères (Arrigo and Ahmad-Zadeh, 1981, Borrelli et al., 2002, van de Klundert and de Jong, 1999), mais ce comportement est distinct des sHsps nucléaires qui sont présentes tout le temps dans le noyau chez DmHsp27 et certains sHsps de plantes, grâce à un signal de ciblage nucléaire (NLS) (Siddique et al., 2008, Siddique et al., 2003, Scharf et al., 2001, Michaud et al., 2008). J'ai montré dans le chapitre 2 que le signal NLS riche en arginine n'est pas une particularité de *D. melanogaster* et qu'il existe d'autres sHsps chez les insectes qui présentent le même NLS.

Le rôle exact de la localisation des sHsps dans le noyau reste inconnu. DmHsp27 présente deux patrons d'expression dans le noyau. La protéine peut se disperser uniformément à l'intérieur du noyau et/ou former de petits granules nucléaires identifiées comme des speckles (Michaud et al., 2008, Moutaoufik et al., 2016).

La présence d'une sHsp au niveau des "speckles" nucléaires dans les conditions de non stress est intrigante. Il a été rapporté que HspB1 et HspB5 peuvent se localiser au niveau des speckles nucléaire suivant le choc thermique ou la phosphorylation (van den et al., 2003, den Engelsman et al., 2004, den Engelsman et al., 2013, van Rijk et al., 2003). Par contre, aucune fonction particulière n'a été associée à cette localisation. Il est fort probable que les sHsps jouent le rôle de chaperon dans les speckles. En effet, la forte concentration des protéines dans des petites structures tels que les speckles pourrait favoriser les interactions non spécifiques et causer ainsi le mauvais repliement ou l'agrégation des protéines.

Le réseau d'interaction de DmHsp27 nous laisse croire que cette protéine ne joue pas seulement le rôle de chaperon moléculaire, mais qu'elle est probablement impliquée dans différents processus nucléaires tels que la réplication de l'ADN, la transcription et la maturation de l'ARN.

Dans notre laboratoire on a développé en collaboration avec Dr H.Kampinga (Groningen, Pays bas) une méthode *in cellulo* basée sur (Michels et al., 1995) pour mesurer l'activité thermoprotectrice de DmHsp27. Brièvement la technique se base sur la co-expression de DmHsp27 et la protéine bioluminescente luciférase. Suite au stress thermique si la luciférase est protégée (fonctionnelle), elle va catalyser l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP, de Mg^{2+} et d' O^2 pour générer de l'oxyluciférine et de la lumière à une longueur d'onde de 562 nm. La détection de l'activité luciférase est réalisée *in vitro*, après extraction protéique et ajout du substrat luciférine, d' O^2 et d'ATP. Cette technique développée permettra d'étudier l'action de DmHsp27 sur la luciférase tant que chaperon moléculaire dans le noyau des cellules *in vivo*.

5.2 Oligomérisation de DmHsp27 : Une sHsp distincte

Au cours des dernières années, plusieurs structures du domaine ACD chez les animaux ont été résolues par cristallographie aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (Rajagopal et al., 2015, Hochberg et al., 2014, Baranova et al., 2011, Jehle et al., 2011, Clark et al., 2011, Laganowsky et al., 2010, Bagneris et al., 2009, Weeks et al., 2014). Mais aucune structure oligomérique complète n'est encore disponible. Bien que l'ACD soit l'élément structurel définissant la famille des sHsp, l'oligomérisation dépend des régions NTR et CTE, parce que l'ACD isolé ne forme que des dimères stables (Bagneris et al., 2009).

Durant mes travaux de doctorat, des tentatives pour cristalliser toute la longueur de DmHsp27 ont été entreprises mais ont échouées. Ainsi, plusieurs méthodes structurales biochimiques et biophysiques ont été utilisées pour déterminer la structure quaternaire oligomérique de DmHsp27 et de ses mutants.

Les résidus cystéines 137 et 141 sont impliqués dans la dimérisation de HspB1 humain et Hsp25 murin respectivement (Baranova et al., 2011, Zavialov et al., 1998). Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que DmHsp27 ne fait pas l'interface de dimère par des ponts disulfures via la cystéine à la position 93. Cela suggère que DmHsp27 se dimérise essentiellement de manière dépendante des ponts ioniques dans le brin $\beta 6+7$. Ce mode de dimérisation chez les métazoaires appelé « $\beta 7$ -interface dimer» dans lequel les brins $\beta 6$ et $\beta 7$ sont fusionnés en un brin allongé qui forme l'interface du dimère avec son homologue du monomère voisin dans une orientation antiparallèle (Haslbeck and Vierling, 2015).

Le taux d'échange de sous-unités des sHsps est fortement dépendant de la température (Bova et al., 1997, Bova et al., 2002). La diffusion dynamique de la lumière DLS a été utilisée pour analyser la stabilité thermique de DmHsp27WT en séparant les populations solubles de différent rayon hydrodynamique (R_h). DmHsp27WT forme de gros oligomères solubles dans des conditions physiologiques. Ces oligomères ont tendance à être plus gros et plus polydisperses avec l'augmentation de la température. Ce changement de la taille oligomérique observé suite à l'augmentation de la température est complètement réversible lorsque la protéine est refroidie. Des résultats similaires ont été

observés pour HspB1 humain et Hsp25 murin (Ehrnsperger et al., 1999, Chalova et al., 2014, Skouri-Panet et al., 2012). Ces résultats illustrent la possibilité d'une importante réorganisation structurelle réversible de DmHsp27 lors du stress thermique. Les données de fluorescence intrinsèque du tryptophane ont montré que l'augmentation de la température est accompagnée par une diminution monotone de la fluorescence. De plus, l'amplitude de la fluorescence de DmHsp27WT retourne à sa valeur initiale lors du refroidissement, en soutenant une importante réorganisation structurelle réversible au cours du stress autour du résidu tryptophane.

Le profil habituel de sHsps sur chromatographie d'exclusion (SEC) est un seul pic symétrique correspondant aux formes oligomériques. Les données obtenues montrent que, contrairement aux sHsps de mammifères, DmHsp27WT forme deux populations d'oligomères ayant un poids moléculaire de 725 kDa et 540 kDa. Bien que les sHsps soient reconnus pour être dynamiques et en équilibre constant (Stengel et al., 2010, Basha et al., 2012), cela ne semble pas être le cas pour les oligomères de DmHsp27. En effet, chaque population isolée a donné un seul pic avec le même volume d'élution lorsqu'ils sont séparés et ré-analysés par SEC ou sur gel natif. En outre, l'activité de chaperon de DmHsp27WT et de ses deux populations d'oligomères était comparable dans des conditions réductrices de stress thermique. La question qui se pose est pourquoi DmHsp27WT a deux populations oligomériques fonctionnelles. À l'heure actuelle, il n'y a pas de réponse claire à cette question. Cependant, les données publiées récemment obtenues sur AgsA, une sHsp de la bactérie pathogène *Salmonella enterica* ont montré qu'elle existe dans un équilibre entre deux états oligomériques (18-mer et 24-mer). Cet équilibre semble indispensable pour l'activité de chaperon *in vivo* (Mani et al., 2016). Les résultats présentés ici suggèrent que l'équilibre entre les deux populations de DmHsp27 n'a pas d'importance pour son activité chaperon *in vitro*. D'autres expérimentations seront nécessaires pour évaluer la fonction *in vivo* des deux populations de DmHsp27.

5.3 Alpha cristallin de DmHsp27 : Un domaine bien conservé au niveau structural et fonctionnel

Le domaine alpha-cristallin (ACD) représente une signature conservée des sHsps. Dans l'espoir d'obtenir des mutants inactifs, trois différents résidus d'arginine situés dans l'ACD de DmHsp27 ont été mutés et caractérisés. L'arginine122 est équivalent de l'arginine127 chez HspB1, dont la mutation en tryptophane est responsable de la neuropathie motrice héréditaire distale (DHMN). Par ailleurs, l'arginine 131 de DmHsp27 est équivalente de l'arginine 136 chez HspB1, dont la mutation en tryptophane ou leucine est associée à la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 (Evgrafov et al., 2004, Kostenko and Moens, 2009). Enfin, l'arginine 135 de DmHsp27 l'équivalent de l'arginine 140 chez HspB1, l'arginine 120 chez HspB5 et l'arginine 116 chez HspB4, pour laquelle la mutation en glycine et cystéine (HspB1-R140G, HspB4-R116C et HspB5-R120G) est la cause de DHMN, la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2, la myopathie avec surcharge en desmine et la cataracte (Gentil and Cooper, 2012, Vicart et al., 1998, Inagaki et al., 2006, Bera and Abraham, 2002, Litt et al., 1998). Les données montrent que la mutation des résidus arginine au sein de l'ACD en glycine augmente la fluorescence intrinsèque du tryptophane. Cela pourrait signifier que le résidu tryptophane de DmHsp27 est plus accessible que le résidu correspondant dans les mutants ACD, suggérant que l'environnement du tryptophane est plus souple. Des analyses par électrophorèse native et SEC montrent que les mutants dans l'ACD induisent des changements importants dans la structure quaternaire de DmHsp27. Tous les mutants forment de gros oligomères d'environ 1100 kDa. Cette propriété de mutants d'arginine de DmHsp27 pour former de gros oligomères est similaire à HspB1-R140G, HspB4-R116C et HspB5-R120G (Nefedova et al., 2013, Michiel et al., 2009, Cobb and Petrash, 2000, Bova et al., 1999, Bera et al., 2002, Kumar et al., 1999). Puisque les mutants ACD avaient augmenté la taille oligomérique nous avons testé la possibilité d'agrégation *in vivo* dans des cellules cultivées comme ce qui a été montré pour les mutants Hsp27-R148G de hamster chinois et R120G, R120C et R120D chez HspB5 humain (Chavez Zobel et al. 2005 and Simon et al. 2007). *In vivo*, DmHsp27WT et les mutants R122G, R131G et R135G présentent la même localisation intranucléaire lorsqu'elles sont

exprimées dans les cellules HeLa et semblaient s'associer aux structures dites speckles contrairement à ce qui a été montré pour la mutation HspB5-R120 qui empêche la localisation au niveau des speckles (van den et al., 2003).

L'activité de chaperon du mutant R135 était comparable à celle de DmHsp27 dans les conditions de réduction et de stress thermique, tandis que les mutants R122G et R131G étaient plus efficaces que DmHsp27 pour empêcher l'agrégation de l'insuline sous les conditions de réductions. Certaines études ont montré que HspB4-R116C-, HspB5-R120G et HspB1-R140G diminuent l'activité chaperon en utilisant plusieurs substrats (Kumar et al., 1999, Simon et al., 2007, Nefedova et al., 2013, Bova et al., 1999). D'autres ont révélé que le mutant HspB5-R120G avait une activité comparable à celle de HspB5 sauvage dans sa capacité d'empêcher l'agrégation de l'insuline (Treweek et al., 2005).

Une étude par (Clark et al., 2011) a montré que le mutant HspB5-R120G peut se réarranger pour former un dimère par appariement entre l'histidine 83 et l'acide aspartique 80. Un tel réarrangement pourrait dissocier le mutant R135G de DmHsp27 de la même manière pour former un dimère par appariement de bases entre la glutamine 98 et l'acide aspartique 95 en se basant sur l'alignement de séquence. Il est possible que le dimère formé par l'ACD de DmHsp27 soit capable d'avoir plus d'une conformation, et les changements par les mutations seraient compensés. Seules les structures cristallographiques pourraient nous donner de telles réponses. Au total, ces résultats caractérisent les mutants d'arginine au niveau ACD de DmHsp27. Cependant, plusieurs investigations sont encore nécessaires pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de ces différences.

5.4 Région N-terminale de DmHsp27 : une région critique pour la structure et l'activité chaperon

Différents mécanismes ont été proposés pour réguler la structure oligomérique et le fonctionnement des sHsps. La phosphorylation de résidus serine dans la région N-terminale (NTR) a été rapportée pour réguler l'activité de chaperon des sHsps chez les mammifères (Haslbeck and Vierling, 2015). Il affecte l'état oligomérique vers des plus

petites espèces enrichies en dimères, tétramères et hexamères. Un mutant phospho-mimétique de HspB1 déplace l'équilibre entre les oligomères et dimères en faveur des plus petits assemblages (Shashidharamurthy et al., 2005, Theriault et al., 2004). De même, des études utilisant l'imitation de la phosphorylation des variantes de HspB5 révèlent un assemblage d'oligomères consistant principalement en 12-mers, hexamères et dimères (Peschek et al., 2013). La prédominance de ces espèces indique que principalement les contacts au niveau de la NTR de l'oligomère sont influencés par la phosphorylation, ce qui est également conforme à la localisation des sites de phosphorylation dans cette région. Bien que la phosphorylation de HspB5 résulte en une augmentation de l'activité chaperon (Peschek et al., 2013), la situation est plus compliquée pour HspB1 selon le substrat utilisé (Shashidharamurthy et al., 2005, Hayes et al., 2009, Rogalla et al., 1999). Les autres sHsps non mammifères peuvent également être phosphorylées. C'est le cas de DmHsp27, qui peut être phosphorylée par une/des kinase(s) inconnue(s) au niveau de deux sérines (S58 et S75)(Bodenmiller et al., 2007, Franco et al., 2011, Zhai et al., 2008). Cependant, il reste difficile de savoir si la phosphorylation de sHsps de non mammifères a un impact similaire sur la structure et l'activité chaperon comme c'est le cas pour les sHsps des mammifères. Ici j'ai montré que DmHsp27, et les mutants phospho-mimétiques et non-phosphorylables au niveau des deux sérine 58 et 75 avaient la même structure oligomérique, activité chaperon et localisation que DmHsp27WT. Ainsi, à la différence des sHsps de mammifères, les deux sites de phosphorylation S58 et S75 n'ont pas affecter l'équilibre oligomérique, ni la localisation intracellulaire de DmHsp27.

La région NTR de sHsps a été décrite comme étant mal conservée. Fonctionnellement, le rôle du NTR a été impliqué dans l'activité chaperon et l'oligomérisation. La plupart des études ont indiqué que la suppression ou la mutation de la région NTR sont accompagnées d'une réduction de l'activité chaperon et la dissociation des oligomères. Par utilisation des simulations de la dynamique moléculaire de Hsp16.9 du blé et Hsp18.1 du petit pois (Patel et al., 2014) ont montré que la région NTR du dimère est flexible/dynamique et présente deux conformations : une conformation fermée (inactive) lors du repos et une conformation ouverte (active) suite au stress, suggérant que la NTR du dimère se comporte comme un domaine structural. Dans ce travail, j'ai

caractérisé pour la première fois le rôle d'un motif conservé dans la région N-terminale de DmHsp27 sur la structure oligomérique et l'activité chaperon. La délétion de la région NTR dans de nombreux sHsps conduit à la perturbation d'oligomérisation et la perte de la fonction de chaperon (Baranova et al., 2011, Feil et al., 2001, Kundu et al., 2007, Laganowsky et al., 2010, Leroux et al., 1997, Heirbaut et al., 2014, Crack et al., 2002, Sun et al., 2004, Theriault et al., 2004). Des données similaires ont été obtenues après délétion complète du NTR chez DmHsp27 suggérant un rôle essentiel du NTR dans l'oligomérisation et l'activité chaperon.

Le motif conservé (FGFG) du phenylalanine 29 en glycine 32 est équivalent à la « région riche en phénylalanine » décrite chez plusieurs sHsps de vertébrés (Crabbe and Goode, 1994). La délétion de ce motif dans HspB4 et HspB5 humains montrent une diminution de la taille oligomérique et une augmentation de l'activité chaperon (Pasta et al., 2003). La délétion du motif (FGFG) affecte l'état oligomérique avec la formation de gros oligomères et améliore l'activité chaperon ce qui suggère la présence au moins d'un site important pour l'oligomérisation et l'activité chaperon dans ce motif. Pour déterminer les résidus fonctionnels dans le motif FGFG de DmHsp27, j'ai étudié les mutants de résidus F29, G30, F31 et G32. Le résidu F31, le moins conservé n'a aucun effet sur la structure quaternaire ni l'activité chaperon de DmHsp27. Le résidu F29 semble important pour oligomérisation du pic # 2 autour de 540 kDa décrit dans (Moutaoufik et al., 2016). Les mutants F29A et F29Y dissocient partiellement le pic # 2 pour former de gros oligomères présentés par le pic # 1 à environ 800 kDa. Les mutants G30R et G32R déstabilisent l'équilibre pour former un seul pic correspondant à un oligomère supérieur avec une augmentation de l'activité chaperon en utilisant l'insuline comme substrat. Deux articles sur la structure de Hsp16.9 du blé (van Montfort et al., 2001b) et Hsp16.0 de levure (Hanazono et al., 2013) ont mis en évidence le rôle important des phenylalanines dans la région N-terminale dans la formation d'oligomères et l'activité chaperon. Des études antérieures utilisant alphaB-cristallin bovin ou murin, ont montré que la mutation de F24, F27 ou F28 diminue la taille oligomérique et l'activité chaperon à des températures élevées (Kelley and Abraham, 2003, Horwitz et al., 1998, Plater et al., 1996). Récemment, (Heirbaut et al., 2014) ont montré que la mutation de la phenylalanine conservée à la position 33 en alanine dans le NTR de HspB6 humain la

rend moins active en utilisant l'insuline et l'alcool déshydrogénase de levure comme substrats. F28 chez alphaB-cristallin bovin et F33 chez HspB6 humain, qui sont équivalents à F29 dans DmHsp27 ont montré un comportement différent par rapport à F29 de DmHsp27. F29 de DmHsp27 semble plus affecter l'équilibre entre les deux pics (populations). De plus, la mutation de la glycine à la position 34 en arginine dans région NTR de HspB1 (équivalent à la glycine à la position 30 DmHsp27) a été associée à des neuropathies motrices héréditaires distales (Capponi et al., 2011). Une étude réalisée par (Muranova et al., 2015) a montré que le mutant HspB1-G34R forme des oligomères stables légèrement plus gros que les oligomères correspondants de HspB1WT et une diminution de l'activité chaperon.

En résumé, les mutations des F29, G30 et G32 dans le domaine N-terminal destabilisent la structure oligomérique *in vitro*. En outre, ces mutations augmentent l'activité chaperon dans les conditions de réductions.

5.5 Activation thermique de DmHsp27 : relation structure et fonction

Il existe une controverse concernant le mode d'activation de sHsps. Le modèle général d'activité chaperon suggère que les sHsps se dissocient en petites formes oligomériques, probablement dimères, pour se réassocier en une nouvelle forme oligomérique contenant le substrat lié (Haslbeck and Vierling, 2015, Basha et al., 2012, Delbecq and Klevit, 2013, Garrido et al., 2012, McHaourab et al., 2009). Ce modèle présente des exceptions pour certaines sHsps, par exemple pour Hsp26 de *S. cerevisiae*, chez laquelle la transition vers un état augmentant l'affinité et la liaison au substrat et l'activité chaperon se fait par de légers changements conformationnels sans perturbation de l'état oligomérique (Franzmann et al., 2008). Un autre exemple est observé chez les sHsps de classe II des plantes, qui restent oligomériques mais subissent des réarrangements structuraux lors de l'activation (Basha et al., 2010).

In vitro, HspB1 montre une auto-association suite à la chaleur, conduisant à une augmentation de la taille oligomérique, en corrélation avec l'augmentation de son activité chaperon (Lelj-Garolla and Mauk, 2006). Hsp22 de rat révèle des changements

conformationnels par la chaleur ce qui augmente l'exposition des surfaces hydrophobes et d'activité chaperon (Chowdary et al., 2004). CeHsp17 de *C. elegans* forme des gros assemblages en forme d'assemblage en feuille super-moléculaire (SMA : sheet-like super-molecular assemblies) à des températures élevées et seulement la forme SMA présente une activité chaperon (Zhang et al., 2015).

Il est évident que toutes les sHsps ne s'activent pas par le même mécanisme. Dans le cas de DmHsp27, j'ai montré une activation thermique réversible induite par des changements structuraux qui conduisent à la formation de gros oligomères supérieurs à 1000 kDa. DmHsp27 est plus efficace en tant que chaperon à 42 °C qu'à 20 °C en utilisant l'insuline. Ceci suggère que l'activation thermique de DmHsp27 se passe essentiellement par la formation de gros oligomères d'environ 1100 kDa. Les espèces activées lient les substrats non-natifs et empêchent leurs agrégations par la formation des complexes stables DmHsp27/substrat (Figure 5.1).

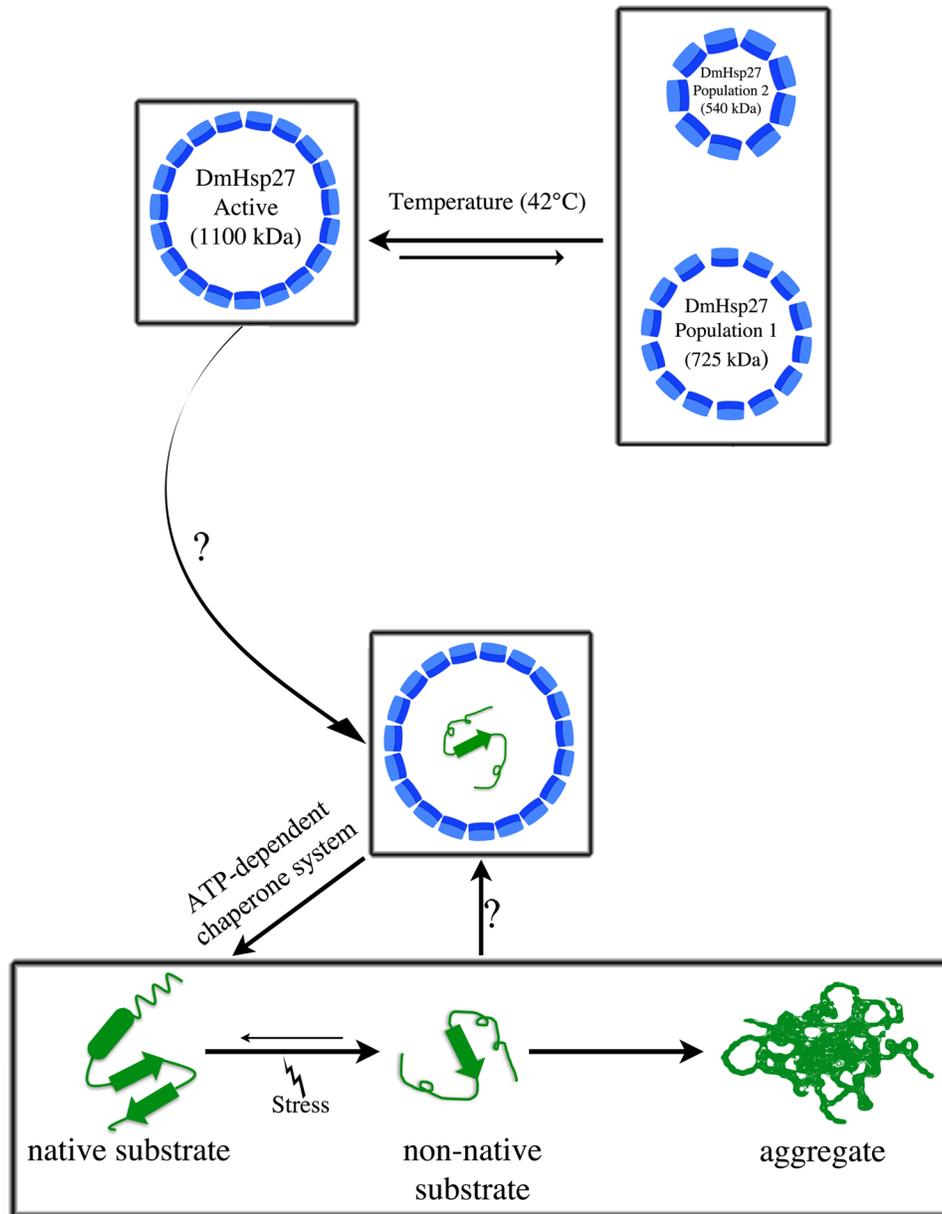


Figure 5.1: Le mécanisme d'activation de DmHsp27.

DmHsp27 forme des oligomères avec deux populations à 540 et 725 kDa. En réponse à l'augmentation de température, DmHsp27 s'active. Cette activation conduit à une association des oligomères d'environ 1100 kDa. Les espèces activées lient les substrats non-native et empêchent leurs agrégations par la formation de complexes stables de DmHsp27/substrat. Les substrats liés peuvent être libérés des complexes DmHsp27 et

replier par le système de chaperon ATP dépendant Hsp70/40. Les points d'interrogation indiquent les points, qui ne sont pas résolues en détail.

En résumé, la corrélation de la transition structurelle et l'activité chaperon de DmHsp27 est maintenant plus évidente. Néanmoins, nous sommes encore loin de comprendre les détails des mécanismes de l'activité chaperon. Comment DmHsp27 reconnaît et lie les substrats et l'implication de son NTR dans ce processus restent énigmatique.

5.6 Conclusion

Depuis leurs découvertes chez la drosophile les sHsps ont fait l'objet de nombreuses recherches, à la fois au niveau de leur structure qu'au niveau de leur fonction. Ici, nous avons étudié pour la première fois DmHsp27 une petite protéine de stress nucléaire chez *Drosophila melanogaster*. La structure oligomérique, le modèle d'activation thermique, la corrélation mécanistique des états oligomériques et l'activité chaperon de DmHsp27 ont été déterminées. Néanmoins, nous sommes encore loin de comprendre les principaux aspects importants de la fonction de DmHsp27. Nous avons entrepris un grand travail de cristallisation sans succès et à ce jour nous pensons que sans structure 3D, il reste difficile d'expliquer les différents assemblages obtenus suite à des variations dans la région N-terminale. De plus, comment DmHsp27 reconnaît et lie son substrat et comment se passe le réassemblage des complexes DmHsp27-substrats, reste encore un mystère.

Enfin, l'édition du genome est un domaine en plein essor, grâce au développement de différentes techniques reposant sur l'utilisation de nucléases. Ces avancées récentes, rapportent de nouveaux outils moléculaires très ingénieux qui pourraient être utilisées d'un coté pour analyser l'importance de la fonction des sHsps dans des conditions in cellulo et exploitées pour approfondir les résultats présentés dans cette thèse.