Journal de la Société de Biologie, 193 (4), 361-367 (1999)

Interaction fonctionnelle de l'Hsp90 avec les récepteurs des stéroïdes

par M. G. Catelli, J. Devin-Leclerc, I. Bouhouche, F. Cadepond*

CNRS UPR 1524, ICGM, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris
e-mail: catelli@icgm.cochin.inserm.fr
** INSERM U488, 80, rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin Bicêtre Cedex*

RÉSUMÉ

L'Hsp90 (Heat Shock Protein 90) fait partie de la structure hétéro-oligomérique métastable et inactive des récepteurs des stéroïdes. Les données récentes sur ses propriétés de protéine de stress, de chaperon moléculaire spécialisé ainsi que les acquisitions sur sa structure tridimensionnelle sont ici exposées avec une focalisation particulière sur son impact dans la signalisation par les stéroïdes.

En particulier, son double rôle de modulateur positif et négatif vis-à-vis de la fonction des récepteurs est analysée tout au long du processus d'activation-désactivation par les ligands stéroïdiens.

Il est proposé que la machinerie de chaperonnage de l'Hsp90 assiste le récepteur dès sa synthèse en évitant son collapsus et en facilitant sa structure ouverte, apte à lier l'hormone. De plus, l'Hsp90 pourrait intervenir au cours de la structuration du core hydrophobe du récepteur autour de l'hormone, mais également prendre en charge le récepteur après la dissociation du ligand.

SUMMARY Hsp90 functional interaction with steroid receptors

Hsp90 (Heat Shock Protein 90) is a component of the inactive and metastable hetero-oligomeric structure of steroid receptors. Recent data on Hsp90 structure and function as a stress protein and dedicated molecular chaperone are here reviewed with a particular focus on Hsp90 chaperone cycle interfering with steroid receptor action.

The dual role of Hsp90 as a positive and negative modulator of steroid receptor function is considered along the activation-desactivation process of the receptors.

It is proposed that Hsp90 chaperone machinary assists the receptor during its synthesis thus avoiding collapse and facilitating an open structure able to bind ligand efficiently. Moreover, it is suggested that Hsp90 may help the folding of the hydrophobic core of the receptor around the ligand and finally Hsp90 may chaperone the receptor after the dissociation of the ligand.

Les hormones stéroïdes, produites essentiellement dans les gonades et dans les surrénales, agissent dans les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques qui jouent le rôle de transmetteurs du message hormonal. A la différence des récepteurs d'hormones polypeptidiques, ces récepteurs ne sont pas membranaires mais intracellulaires. Certains, comme ceux de l'œstradiol et de la progestérone, sont localisés dans le noyau de la cellule, même en absence de ligand ; d'autres sont essentiellement cytoplasmiques, comme ceux des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes, et sont translocés dans le noyau en présence du ligand spécifique. La liaison entre le récepteur et son stéroïde est non covalente, réversible et obéit à la loi d'action de masse. Elle est caractérisée par une haute affinité (Kd = 0,1-1nM), une grande spécificité pour le ligand et un nombre limité de sites, de l'ordre de 10^4 à 10^5 par cellule cible. Il s'agit donc d'une liaison saturable et tissu-spécifique bien qu'on découvre de plus en plus certains récepteurs aux stéroïdes dans des organes classiquement non-cibles.

EN ABSENCE D'HORMONE, L'Hsp90 FAIT PARTIE DE LA STRUCTURE HÉTÉRO-OLIGOMÉRIQUE DES RÉCEPTEURS DES STÉROÏDES

Les récepteurs des hormones stéroïdes sont des facteurs de transcription, activables par leurs ligands spécifiques, qui régulent l'expression génique des organes cibles. Deux formes de récepteurs peuvent être isolées à partir des homogénats tissulaires ou cellulaires : en

absence d'hormone, une forme de coefficient de sédimentation 8S, métastable et stabilisée par le molybdate, est présente dans la fraction cytosolique, lie spécifiquement l'hormone et n'est pas capable de se lier à l'ADN. En présence d'hormone, le récepteur est retrouvé dans la fraction nucléaire de l'homogénat d'où il est extractible, par 0,4M KCl, sous forme 4S. Cette forme 4S possède une haute affinité pour l'ADN et se lie spécifiquement aux consensus HRE (Hormone Response Element) présents dans les promoteurs des gènes régulés par les stéroïdes. *In vitro*, la forme 8S peut être transformée en forme 4S par la température (37° C) ou par les sels. Cette transformation, qui s'accompagne de l'apparition d'affinité pour l'ADN, peut seulement être accélérée par la présence d'hormone. Certains récepteurs comme ceux des glucocorticoïdes et des minéralocorticostéroïdes, en subissant cette transformation, perdent rapidement la capacité de lier l'hormone avec haute affinité.

Des anticorps polyclonaux et un un anticorps monoclonal BF4 obtenu à partir de la forme 8S du récepteur de la progestérone de Poulet, ont permis de démontrer que cette forme était hétérooligomérique et comprenait dans sa structure, en plus des sous-unités A et B liant l'hormone, une protéine reconnue spécifiquement par BF4 de 90kDa (Joab *et al.*, 1984). Il s'agit d'une composante commune aux formes 8S de tous les récepteurs des hormones stéroïdes, qui se dissocie lors de la transformation du 8S en 4S, identifiée par clonage moléculaire, caractérisation biologique et biochimique comme étant la protéine de choc thermique 90kDa (Hsp90: Heat shock protein 90) déjà connue pour former des complexes transitoires avec la tyrosine kinase oncogénique $pp60^{v\text{-}src}$ (Catelli *et al.*, 1985a, b ; Schuh *et al.*, 1985).

Lorsque les récepteurs des stéroïdes et la $pp60^{v\text{-}src}$ sont en interaction avec l'Hsp90, ils sont réprimés dans leur fonction respective de facteurs de transcription (liaison à l'ADN) et de tyrosine kinase. Ces observations font attribuer à l'Hsp90 un rôle négatif de maintien de ses cibles à l'état réprimé (Baulieu & Catelli, 1989).

PROPRIÉTÉS ET STRUCTURE DE L'Hsp90

L'Hsp90 est une protéine acide, phosphorylée, abondante (1 % des protéines cellulaires) et ubiquitaire, très conservée de la bactérie à l'Homme, dont la synthèse est accrue par le choc thermique et d'autres formes de stress. Sa localisation subcellulaire essentiellement cytoplasmique et partiellement nucléaire, devient à prédominance nucléaire après un choc thermique (Parsell & Lindquist, 1993).

L'Hsp90 comme les autres Hsp appartient à une classe de protéines conservées et ubiquitaires, corrélées fonctionnellement, et appelées chaperons moléculaires (Gething & Sambrook, 1992). Ces protéines, en conditions physiologiques ou de stress (thermique, oxydatif ou inflammatoire), interagissent avec des protéines non natives en prévenant les interactions intra et intermoléculaires inappropriées, en favorisant les étapes productives du repliement polypeptidique, évitant ainsi l'agrégation ou le collapsus. Les chaperons assistent également l'assemblage et le désassemblage oligomérique, et la translocation des protéines à travers les membranes, sans faire partie de la structure finale et active de la protéine assistée.

In vitro, l'Hsp90 possède une activité de chaperon moléculaire seule ou en coopération avec l'Hsp70 et d'autres protéines auxiliaires (Miyata & Yahara, 1992 ; Wiech *et al.*, 1992 ; Freeman *et al.*, 1996). *In vivo*, en conditions physiologiques et de stress, l'Hsp90 contribue, comme d'autres chaperons, à l'homéostasie protéique cellulaire en contrant les effets délétères de la protéotoxicité (Nathan *et al.*, 1997). Néanmoins, l'Hsp90 est considérée comme un chaperon spécialisé puisqu'elle joue un rôle indispensable dans la régulation conformationnelle d'un nombre limité de molécules de signalisation. Les cibles spécialisées de l'Hsp90, en plus des récepteurs des stéroïdes et de la $pp60^{v\text{-}src}$ (Picard *et al.*, 1990 ; Xu & Lindquist, 1997), sont des kinases du cycle cellulaire (Wee1), ou régulatrices de la synthèse protéique (eiF-2α-kinase), la caséine kinase II (signalisation par le calcium), la Raf1 kinase (composante de la voie MAP kinases), des facteurs de transcription comme HSF (Heat Shock Factor) et MyoD (régulateur de la différenciation musculaire). A cette liste se sont récemment ajoutées la protéine suppresseur de tumeur p53, la NO-synthase et une reverse-transcriptase (Pratt & Toft, 1997 ; Buchner, 1999). Des protéines de structure comme l'actine et la tubuline et des protéines auxiliaires participant aux machineries de chaperonnage interagissent également avec l'Hsp90. La remarquable variété d'interventions de l'Hsp90 dans différentes voies de signalisation a été récemment interprétée, sur la base d'expériences génétiques chez la Drosophile, comme facilitatrice de l'évolution morphologique. Cette facilitation dépendrait du pouvoir « tampon » de l'Hsp90 vis-à-vis de mutations de protéines qui contrôlent la morphogenèse (Rutherford & Lindquist, 1998).

Alors que l'Hsp90 n'est pas une protéine essentielle chez *E. coli*, elle est indispensable pour la viabilité chez la levure, la Drosophile et vraisemblablement chez tous les vertébrés. Chez la levure, bien que 5 % de la concentration normale intracellulaire de l'Hsp90 soient suffisants pour la viabilité cellulaire, des taux importants et inductibles par la chaleur sont nécessaires pour la croissance à des températures élevées (Parsell & Lindquist, 1993). De plus, l'expression de l'Hsp90 est positivement régulée par les stimuli mitogènes, le cycle cellulaire, le développement, les infections virales et les carcinogènes (Jérôme *et al.*, 1991, 1993). Ceci indique que l'Hsp90 joue son rôle de chaperon moléculaire non seulement après un choc thermique mais dans toutes les situations où la physiopathologie cellulaire requiert une synthèse protéique brusquement accrue.

La génétique de la levure a permis de démontrer que l'Hsp90 était un élément indispensable et actif dans plusieurs voies de signalisation, y compris celle des stéroïdes et de la kinase $pp60^{v\text{-}src}$ (Picard *et al.*, 1990 ; Xu & Lindquist 1993). Dans une souche de levure exprimant

un très faible taux d'Hsp90 (5 % de la valeur normale), la fonction des récepteurs des hormones stéroïdes est gravement compromise. L'absence de ce chaperon moléculaire empêcherait les récepteurs d'acquérir une conformation appropriée pour l'activation subséquente par l'hormone. L'Hsp90 est donc nécessaire en absence d'hormone au maintien des récepteurs dans un état inactif mais activable par le ligand spécifique (Bohen *et al.*, 1995).

L'alignement de séquences et la digestion protéolytique ont montré que l'Hsp90 possédait une structure modulaire dans laquelle les deux modules N- et C-terminaux très conservés sont reliés par une région charnière de longueur variable selon les espèces, riche en aminoacides chargés négativement (région A) ; le module C-terminal comprend une zone avec un "leucine-zipper" potentiel (Z), et une deuxième région chargée (B) qui participe au site de dimérisation. La protéine native est un dimère très allongé et flexible, le site de dimérisation étant constitué par les 200 aminoacides C-terminaux qui s'associent de façon antiparallèle (Nemoto *et al.*, 1995 ; Meng *et al.*, 1996). Il a été supposé que la flexibilité conformationnelle du dimère puisse dépendre de la région charnière, une augmentation supraphysiologique de température induisant un changement de conformation qui rapproche les deux extrémités N-terminales ainsi que la formation de multimères à partir du dimère natif (Maruya *et al.*, 1999 ; Chadli *et al.*, 1999). Deux isoformes codées par deux gènes, α et β, différentiellement inductibles par la chaleur, sont présentes dans le cytosol des vertébrés supérieurs ; une autre protéine cytosolique, appelée TRAP1 ou Hsp75, chaperon du récepteur de type 1 du TNF, moins abondante et strictement apparentée à l'Hsp90, est dépourvue de la zone charnière; un homologue de l'Hsp90, la Grp94, est présent dans le reticulum endoplasmique (Buchner, 1999).

Tout récemment, la structure tridimensionnelle du fragment N-terminal (1-221) de l'Hsp90 de levure et humaine a été résolue (Stebbins *et al.*, 1997 ; Prodromou *et al.*, 1997). Ce fragment possède un site ATP non canonique, similaire à celui de l'ADN gyrase B, suggérant ainsi que l'Hsp90 est une ATPase comme d'autres Hsp (*e.g.* Hsp70 et Hsp60 ou GroEL). La faible activité ATPase de l'Hsp90 a ensuite été démontrée nécessaire à sa fonction vitale ainsi qu'à sa fonction de chaperon vis-à-vis de cibles spécifiques comme les récepteurs des stéroïdes (Panaretou *et al.*, 1998). La même poche de liaison de l'ATP-ADP lie également la geldanamycine, antibiotique à activité antitumorale, qui rend inactive l'Hsp90. La liaison de l'ATP ou ADP n'a pas révélé des changements majeurs de conformation du fragment N-terminal. La découverte du site ATP dans la partie N-terminale de l'Hsp90 a amené à reconsidérer expérimentalement ses propriétés *in vitro* de chaperon moléculaire jusqu'alors considéré ATP-indépendant. Le domaine N-terminal (domaine ATPase) et le domaine C-terminal peuvent séparément supprimer l'agrégation de protéines non natives, le premier d'une façon ATP-dépendante et le deuxième en absence d'ATP. Donc, deux sites de chaperonnage présents sur la molécule d'Hsp90 semblent contribuer indépendamment à son activité. Le site N-terminal serait spécifique des protéines complètement dépliées et serait influencé par l'ATP-ADP et la geldanamycine. Le site C-terminal aurait une activité de chaperon vis-à-vis d'intermédiaires de repliement inactifs mais proches de l'état natif (Young *et al.*, 1997 ; Scheibel *et al.*, 1998). Il a été suggéré que la région charnière A, adjacente à la région ATPase, pourrait être cruciale pour les changements conformationnels de l'ensemble de la molécule et pour la liaison productive à ses substrats protéiques (Scheibel *et al.*, 1999).

LE CYCLE DU CHAPERON Hsp90 ET LA MATURATION DES RÉCEPTEURS DES STÉROÏDES

De nombreuses études ont contribué à l'identification des composantes du cycle du chaperon Hsp90 qui interviennent dans la maturation conformationnelle des récepteurs des stéroïdes. (Pratt & Toft, 1997 ; Buchner, 1999). Dans le cytosol, le dimère Hsp90 est associé en partie avec des sous-groupes de protéines auxiliaires, retrouvés de la levure aux mammifères, suggérant que les fonctions remplies par les différents complexes sont conservées chez les eucaryotes et dépassent le contexte des récepteurs des stéroïdes.

Le passage séquentiel des récepteurs des stéroïdes par au moins deux de ces complexes, dont l'Hsp90 constitue le cœur de l'interaction, est nécessaire pour la liaison appropriée de l'hormone et l'acquisition des propriétés activatrices. Le premier complexe est constitué de l'Hsp90 en interaction avec Hop (ou Hsp60 ou Sti1 chez la levure). Hop interagirait simultanément avec l'Hsp70 et ses deux cofacteurs, l'Hsp40 (ou DnaJ) et Hip, jouant ainsi le rôle de coordinateur de deux machineries de chaperonnage, celle plus pléiotropique de l'Hsp70, et celle plus spécifique de l'Hsp90. Le deuxième complexe est constitué de l'Hsp90 associée à une immunophiline de haut poids moléculaire et à la p23. Dans les deux complexes, la liaison de Hop ou de l'immunophiline à l'Hsp90 implique le motif TPR (tetratricopeptide) commun aux deux protéines (Radanyi *et al.*, 1994 ; Prodromou *et al.*, 1999). Le passage des récepteurs entre les deux complexes est très dynamique et requiert quelques minutes.

Le rôle de chaque composante de ces complexes n'est pas complètement élucidé. Certaines protéines ont une fonction de charpente et d'assemblage, d'autres possèdent des propriétés de chaperon ou cochaperon. Hip et l'Hsp40 (ou DnaJ) régulent l'activité ATPase de l'Hsp70, Hop fait le pontage entre Hsp70 et Hsp90 ; les immunophilines, même seules, ont une activité de chaperon qui s'ajoute à leur propriété de catalyse de l'isomérisation des liaisons prolyl-peptide. La p23, protéine acide et cochaperon, s'associe uniquement avec l'Hsp90 liée à l'ATP, cette association étant inhibée par la geldanamycine, inhibiteur compétitif de l'ATP sur ce site non canonique. Ainsi, la geldanamycine bloque la maturation complète du deuxième complexe Hsp90-récepteurs. Dans

ce cas, les récepteurs, tout en étant en interaction avec l'Hsp90, perdent la capacité de lier l'hormone avec une haute affinité et sont en partie ciblés vers la dégradation par le protéasome (Whithesell & Cook, 1996 ; Seignitz & Gehring, 1997). Pour le récepteur des glucocorticoïdes, le premier complexe comprenant l'Hsp70 et l'Hsp90 serait suffisant pour sa compétence à lier l'hormone alors que pour d'autres récepteurs, comme celui de la progestérone, l'interaction avec le deuxième complexe serait également requise. Dans tous les cas, il est plausible que l'effet positif sur la conformation de la poche hormonale soit obtenu à travers des cycles répétés de chaperonnage du récepteur par les deux complexes.

STRUCTURE MODULAIRE DES RÉCEPTEURS DES HORMONES STÉROÏDES : LE DOMAINE DE LIAISON À L'HORMONE INTERAGIT AVEC L'Hsp90

En parallèle avec la découverte de la présence d'Hsp90 dans les complexes 8S des récepteurs des stéroïdes, le clonage de ces récepteurs (Beato, 1989 ; Mansgeldorf *et al.*, 1995) a permis la description de leur structure modulaire. Le domaine N-terminal, qui possède une activité transcriptionnelle hormono-indépendante (AF1 = Activating Function 1), est suivi du domaine à doigts de zinc qui lie l'ADN (DBD = DNA Binding Domain), à son tour connecté par une région charnière au domaine de liaison à l'hormone (LBD = Ligand Binding Domain). Le LBD porte également une fonction d'activation transcriptionnelle hormono-dépendante (AF2) induite par les changements de conformation et le recrutement de coactivateurs. La région C-terminale porte une fonction de dimérisation qui coopère avec celle du deuxième doigt de zinc.

La possibilité d'exprimer un récepteur sauvage ou muté dans les cellules Cos7 (qui sont dépourvues de récepteur), a conduit à l'analyse de la formation de complexes avec l'Hsp90 endogène, détectés avec des anticorps spécifiques par immunoprécipitation ou alourdissement sur gradient de sucrose. Cette approche a montré les similitudes et les différences, parmi les récepteurs des hormones stéroïdes, de leur mode d'interaction avec l'Hsp90. Le LBD est nécessaire à l'interaction récepteur-Hsp90 mais, alors qu'il est suffisant pour le récepteur des glucocorticoïdes, il ne l'est pas dans le cas du récepteur des oestrogènes (Pratt *et al.*, 1988 ; Chambraud *et al.*, 1990 ; Cadepond *et al.*, 1991). Pour ce dernier récepteur, la zone comprise entre la fin du DBD et le début de la région charnière qui précède le LBD, se révèle cruciale pour la stabilité de l'interaction avec l'Hsp90. Cette région charnière comprend le signal de localisation nucléaire (NLS: Nuclear Localization Signal) constitué de résidus chargés positivement. L'hypothèse d'une interaction électrostatistique entre les charges positives des récepteurs et les charges négatives de l'Hsp90 de vertébrés semble en partie vérifiée (Binart *et al.*, 1989).

Les études sur la stoechiométrie des complexes Hsp90-récepteurs suggèrent qu'en général une molécule de récepteur est associée à un dimère d'Hsp90, l'exception étant le récepteur des œstrogènes qui est retrouvé sous forme dimérique associé à un dimère d'Hsp90 dans le complexe 8S (Sabbah *et al.*, 1989). De plus, la traduction de l'ARN messager des récepteurs des stéroïdes dans le lysat de réticulocytes de Lapin, dont la composition protéique ressemble à celle d'un cytosol et contient des protéines ubiquitaires comme l'Hsp90 et l'Hsp70, a permis de démontrer que l'association récepteur-Hsp90 a lieu dès la synthèse du récepteur et que la présence d'Hsp90 est particulièrement importante pour que le récepteur des glucocorticoïdes puisse acquérir la capacité à lier l'hormone avec haute affinité (Pratt & Toft, 1997).

Les études cristallographiques du LBD en présence ou en absence de ligand ont révélé les changements de conformation induits par le ligand et permettent d'envisager les étapes où l'Hsp90 pourrait intervenir (Ribeiro *et al.*, 1998 ; Moras & Gronemeyer, 1998).

Il faut rappeler que, bien que d'autres récepteurs nucléaires (récepteurs des rétinoïdes, des hormones tyroïdiennes et de la vitamine D) ne soient pas trouvés associés à l'Hsp90 comme les récepteurs des stéroïdes, ce chaperon semble nécessaire à la fonction des récepteurs des rétinoïdes quand elle est étudiée chez la levure (Holley & Yamamoto, 1995). De plus, la purification de récepteurs nucléaires non ligandés donne des protéines peu solubles et incapables de lier l'hormone avec une efficacité maximale. Cette efficacité est récupérée en grande partie par l'addition de lysat de réticulocytes. Probablement pour cette raison, seules les structures 3D des Apo-LBD de récepteurs relativement indépendants, *in vitro*, de l'Hsp90 ont pu être obtenus à l'heure actuelle, alors que les données cristallographiques les plus nombreuses concernent des LBD complexés aux ligands agonistes ou antagonistes. La structure Apo-LBD est constituée en majorité d'hélices α qui sont réarrangées dans la structure plus compacte Olo-LBD autour d'un core hydrophobe dont le ligand fait partie. La présence de l'hormone induit une étape de repliement autour du ligand à partir d'une conformation ouverte en absence de ligand, laissant supposer qu'il existe un vaste spectre d'états conformationnels possibles entre la forme Apo- et Olo-LBD (Ribeiro *et al.*, 1998).

Il est donc supposé que la conformation ouverte nécessite d'être stabilisée en tant que telle par des protéines comme les Hsp afin d'éviter le collapsus et l'agrégation qui sont habituellement rencontrés au cours de la purification des récepteurs. En effet, les études des cinétiques d'association de différents ligands ont montré que le t1/2 d'association de ligands de haute affinité est supérieur à celui de ligands de plus faible affinité. Ce temps n'est donc pas requis pour ouvrir la poche de liaison des récepteurs, mais pour la structurer autour du ligand, l'étape limitante pour atteindre l'état de haute affinité étant la formation du coeur hydrophobe induit par le ligand (Ribeiro *et al.*, 1998). Cette étape pourrait être assistée par l'Hsp90, puisque des changements conformationnels du récepteur, induits par le ligand, sont détectables dans

la forme 8S avant le relargage du chaperon (Couette *et al.*, 1996).

MUTAGENÈSE DE L'Hsp90 ET FONCTIONNEMENT DES RÉCEPTEURS DES STÉROIDES

En l'absence de données complètes sur la structure tridimensionnelle de l'Hsp90, la mutagenèse ponctuelle ou par délétion reste un outil pour la compréhension de son mode de fonctionnement et la définition de ses domaines. Pour nous limiter à la mutagenèse de l'Hsp90 dans le contexte de la signalisation par les stéroïdes, nous résumons essentiellement deux types d'études : a) mutagenèse ponctuelle au hasard de l'Hsp90 et sélection de mutants qui interfèrent avec la signalisation par les stéroïdes ; b) mutagénèse par délétion de l'Hsp90 et interaction avec les récepteurs.

La mutagenèse au hasard de l'Hsp90 de levure, suivie de la réintroduction des mutants dans une souche appropriée pour tester la fonction transcriptionnelle des récepteurs des stéroïdes, a confirmé que l'Hsp90 est une composante active et nécessaire de cette voie de signalisation, que certaines mutations affectent négativement le fonctionnement de tous les récepteurs des hormones stéroïdes, tandis que d'autres interfèrent seulement avec la fonction des glucocorticoïdes (Picard *et al.*, 1990 ; Nathan & Lindquist, 1993 ; Bohen & Yamamoto, 1993). L'approche génétique a révélé également des mutants de l'Hsp90 qui interfèrent avec la signalisation par les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase chez la Drosophile (Cutforth & Rubin, 1994) ou avec la fonction de la kinase Wee1, régulateur du cycle cellulaire chez *S. Pombe* (Aligue *et al.*, 1994).

Des mutants de délétion de l'Hsp90 ont été traduits dans le lysat de réticulocytes et analysés pour leur capacité à se lier au récepteur de la progestérone immobilisé sur une résine (Sullivan & Toft, 1993). Aucune interaction n'a été observée avec des mutants tronqués de leur région C-terminale (Δ580-728) ou portant des délétions internes (Δ381-441, Δ601-620 et Δ661-677), alors que la partie C-terminale (381-728) serait suffisante pour la formation des complexes.

Des mutants de délétion interne de l'Hsp90 coexprimés dans les cellules Sf9 avec le récepteur des glucocorticoïdes, des œstrogènes ou des minéralocorticostéroïdes ont été testés pour leur capacité d'interagir avec ces récepteurs (Cadepond *et al.*, 1993 ; Binart *et al.*, 1995). Les délétions de l'Hsp90 concernent les deux régions chargées, A et B ou la région Z (riche en leucine). La délétion de la région A produit une Hsp90 mutée incapable d'interagir dans ce modèle expérimental avec les trois récepteurs. La délétion des régions B ou Z n'empêche pas l'interaction de l'Hsp90 avec les récepteurs mais, dans ce cas, la liaison de l'hormone au récepteur des glucocorticoïdes et sa translocation nucléaire hormono-dépendante sont abolies. La liaison de l'aldostérone au récepteur des minéralocorticostéroïdes et sa translocation nucléaire sont abolies seulement par la coexpression de l'Hsp90 délétée de la région B. L'ensemble de ces résultats suggère que différents types de récepteurs sont différemment sensibles au même type d'Hsp90 mutée et souligne l'importance de la région B pour une liaison correcte de l'hormone à son récepteur.

Il n'est pas exclu, dans ces études basées sur la détection d'un complexe dans les extraits cellulaires, qu'une interaction faible *in vivo* se traduise expérimentalement par une absence d'interaction. En effet, le mutant de l'Hsp90 délété de la région charnière A interagit *in vivo* avec les récepteurs selon le test classique de co-translocation nucléaire (Meng *et al.*, 1996). La même approche a permis de montrer que des mutants de l'Hsp90, incapables de dimériser entre eux et de soutenir la viabilité chez la levure, sont néanmoins capables d'interagir *in vivo* avec le récepteur des oestrogènes. Il sera intéressant de tester s'ils peuvent se comporter comme des dominants négatifs en inhibant la fonction du récepteur.

Une approche de mutagenèse consistant à cibler l'Hsp90 dans le noyau, par insertion en proximité de l'extrémité N-terminale d'un signal de localisation nucléaire (NLS), a permis d'étudier l'interaction *in vivo* entre Hsp90 et récepteurs. De même, les effets de ce ciblage, qui change le rapport molaire des deux composantes du complexe dans le noyau, ont été étudiés au niveau de la fonction d'activation transcriptionnelle par les glucocorticoïdes.

Par double immunofluorescence indirecte et microscopie confocale, une cotranslocation nucléaire des récepteurs cytoplasmiques avec l'Hsp90 ciblée dans le noyau ou de l'Hsp90 cytoplasmique avec les récepteurs à localisation nucléaire constitutive, a été mise en évidence, en absence d'hormone stéroïde. Ce résultat souligne que l'association dynamique entre les deux protéines peut avoir lieu également dans le compartiment nucléaire où les stéroïdes régulent l'expression de gènes cibles, et que les complexes Hsp90-récepteurs trouvés dans les extraits cytosoliques ne résultent pas d'une interaction artéfactuelle (Kang *et al.*, 1994).

Cette Hsp90, ciblée dans le noyau, et qui confère la viabilité chez la levure comme l'Hsp90 sauvage, module négativement l'activité transcriptionnelle du récepteur des glucocorticoïdes, le taux d'inhibition étant corrélé à l'accumulation nucléaire de l'Hsp90. De plus, l'Hsp90 ciblée dans le noyau, contrairement à d'autres mutants (Bohen & Yamamoto, 1993), diminue la réponse aux glucocorticoïdes seulement aux doses saturantes de ligand ; le récepteur des glucocorticoïdes, même après activation par l'hormone *in vivo*, peut encore former des complexes avec l'Hsp90 et diminuer ainsi son interaction avec l'ADN cible (Kang *et al.*, 1999). Ces résultats indiquent que les changements quantitatifs du rapport entre les deux protéines influencent l'amplitude de la réponse à l'hormone pendant et après l'activation. Le rôle de l'Hsp90 comme modulateur négatif de la signalisation par les stéroïdes est ainsi illustré au niveau fonctionnel et s'ajoute aux preuves de son rôle positif dans la même voie de signalisation. L'hypothèse selon laquelle l'Hsp90 pourrait participer à différentes étapes de la voie d'acti-

vation-désactivation des récepteurs des stéroïdes par le ligand, rappelle le modèle proposé pour le facteur de transcription HSF1 (Heat Shock Factor 1) où l'Hsp90 influence l'interconversion entre la forme monomérique inactive et la forme trimérique active (Adnan *et al.*, 1998).

En conclusion, nous proposons un modèle où le chaperon Hsp90 pourrait moduler l'amplitude de la réponse aux hormones stéroïdes avant, pendant et après l'activation par l'hormone. Une modulation positive serait le résultat d'un rapport optimal entre Hsp90 et récepteur, alors qu'une atténuation des réponses résulterait d'un rapport excessivement bas ou élevé.

Les variations de la biodisponibilité de l'Hsp90 et de ses cofacteurs au cours de l'inflammation pourraient déterminer une protection de la voie des glucocorticoïdes mais également son invalidation partielle. Ce mécanisme pourrait rendre compte de certaines corticorésistances transitoires observées pendant une corticothérapie anti-inflammatoire (Polla *et al.*, 1998).

Remerciements. – Nous remercions l'ARC (contrat MGC 9045), la Ligue contre le Cancer (Comité de l'Indre) et l'Institut Electricité Santé pour le support financier de notre recherche.

BIBLIOGRAPHIE

Adnan A., Bharadwaj S., O'Carroll R. & Ovsenek N., Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, *18*, 4949-4960.

Aligue R., Akhavan-Niak H. & Russell P., A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *EMBO J.*, 1994, *13*, 6099-6106.

Baulieu E. E. & Catelli M. G., Steroid hormone receptors and heat shock protein Mr 90,000 (Hsp90): a functional interaction? *In « Stress-Induced Proteins »*, 1989, (Pardue M. L., Feramisco J. R., Lindquist S., eds.) Alan R. Liss Inc, New York, pp. 203-219.

Beato M., Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 1989, *56*, 335-344.

Binart N., Chambraud B., Dumas B., Rowlands D. A., Bigogne C., Levin J. M., Garnier J., Baulieu E. E. & Catelli M. G., The cDNA-derived amino acid sequence of chick heat shock protein Mr 90,000 (Hsp90) reveals a "DNA-like" structure, potential site of interaction with steroid receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1989, *159*, 140-147.

Binart N., Lombes M. & Baulieu E. E., Distinct functions of Hsp90 on oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: effects of Hsp90 deletion mutants. *Biochemical J.*, 1995, *311*, 797-804.

Bohen S. P. & Yamamoto K. R., Isolation of Hsp90 mutants by screening for decreased steroid receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, *90*, 11424-11428.

Bohen S. P., Kralli A. & Yamamoto K. R., Hold'em and fold'em: chaperones and signal transduction. *Science*, 1995, *268*, 1303-1304.

Buchner J., Hsp90 & Co: a holding for folding. *TIBS*, 1999, *24*, 136-141.

Cadepond F., Schweizer-Groyer G., Segard-Maurel I., Jibard N., Hollenberg S. M., Giguere V., Evans R. M. & Baulieu E. E., Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticoid receptor in a nonfunctional state. *J. Biol. Chem.*, 1991, *266*, 5834-5841.

Cadepond F., Binart N., Chambraud B., Jibard N., Schweizer-Groyer G., Segard-Maurel I. & Baulieu E. E., Interaction of glucocorticosteroid receptor and wild-type or mutated 90-kDa heat shock protein coexpressed in baculovirus-infected Sf9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, *90*, 10434-10438.

Catelli M. G., Binart N., Feramisco J. R. & Helfman D. M., Cloning of the chick Hsp90 cDNA in expression vector. *Nucl. Acids Res.*, 1985a, *13*, 6035-6047.

Catelli M. G., Binart N., Jung-Testas I., Renoir J. M., Baulieu E. E., Feramisco J. R. & Welch W. J. The common 90-kD protein component of non-transformed 8S steroid receptors is a heat shock protein. *EMBO J.*, 1985b, *4*, 3131-3135.

Chadli A., Ladjimi M. M., Baulieu E. E. & Catelli M. G., Heat-induced oligomerization of the molecular chaperone Hsp90. Inhibition by ATP and geldanamycin and activation by transition metal oxyanions. *J. Biol. Chem.*, 1999, *274*, 4133-4139.

Chambraud B., Berry M., Redeuilh G., Chambon P. & Baulieu E. E., Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-Hsp90 complexes. *J. Biol. Chem.*, 1990, *265*, 20686-20691.

Couette B., Fagart J., Jalaguier S., Lombes M., Souque A. & Rafestin-Oblin M. E., Ligand-induced conformational change in the human mineralocorticoid receptor occurs within its hetero-ologomeric structure. *Biochem. J.*, 1996, *315*, 421-427.

Cutforth T. & Rubin G. M., Mutations in hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in Drosophila. *Cell*, 1994, *77*, 1027-1036.

Freeman B. C., Toft D. O. & Morimoto R. I., Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid Aporeceptor-associated protein p23. *Science*, 1996, *6*, 1718-1720.

Gething M. J. & Sambrook J., Protein folding in the cell. *Nature*, 1992, *355*, 33-45.

Holley S. J. & Yamamoto K. R., A role for Hsp90 in retinoid receptor signal transduction. *Mol. Biol. Cell*, 1995, *6*, 1833-1842.

Jerôme V., Léger J., Devin J., Baulieu E. E. & Catelli M. G., Growth factors acting via tyrosine kinase receptors induce Hsp90α gene expression. *Growth Factors*, 1991, *4*, 317-327.

Jerôme V., Vourc'h C., Baulieu E. E. & Catelli M. G., Cell cycle regulation of the chicken Hsp90α expression. *Exp. Cell Res.*, 1993, *205*, 44-51.

Joab I., Radanyi C., Renoir J. M., Buchou T., Catelli M. G., Binart N., Mester J. & Baulieu E. E., Immunological evidence for a common non hormone-binding component in "non-transformed" chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature*, 1984, *308*, 850-853.

Kang K. I., Devin J., Cadepond F., Jibard N., Guiochon-Mantel A., Baulieu E. E. & Catelli M. G., *In vivo* functional protein-protein interaction: nuclear targeted Hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, *91*, 340-344.

Kang K. I., Meng X., Devin-Leclerc J., Bouhouche I., Chadli A., Cadepond F., Baulieu E. E. & Catelli M. G., The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, *96*, 1439-1444.

Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., & Chambon P., The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 1995, *83* , 835-839.

Maruya M., Sameshima M., Nemoto T. & Yahara I., Monomer arrangement in Hsp90 dimer as determined by decoration with N- and C-terminal region specific antibodies. *J. Mol. Biol.*, 1999, *285*, 903-907.

Meng X., Devin J., Toft D., Baulieu E. E. & Catelli M. G., Muta-

tional analysis of Hsp90 homodimerisation and subcellular localisation: Hsp90 dimer disruption does not impede its *in vivo* interaction with estrogen receptor. *J. Cell Science*, 1996, *109*, 1677-1687.

Miyata Y. & Yahara I., The 90-kDa heat shock protein, Hsp90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 1992, *267*, 7042-7047.

Moras D. & Gronemeyer H., The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1998, *10*, 384-391.

Nathan D. F. & Lindquist S., Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, *15*, 3917-3925.

Nathan D. F., Vos M. H. & Lindquist S., *In vivo* functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, *94*, 12949-12956.

Nemoto T., Ohara-Nemoto Y., Ota M., Takagi T. & Yokoyama K., Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat shock protein. *Eur. J. Biochem.*, 1995, *233*, 1-8.

Panaretou B., Prodromou C., Roe S. M., O'Brien R., Ladbury J. E., Piper P. W. & Pearl L. H., ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone *in vivo*. *EMBO J.*, 1998, *17*, 4829-4836.

Parsell D. A. & Lindquist S., The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann. Rev. Genet.*, 1993, *27*, 437-496.

Picard D., Khursheed B., Garabedian M. J., Fortin M. G., Lindquist S. & Yamamoto K. R., Reduced levels of Hsp90 compromise steroid receptor action *in vivo*. *Nature*, 1990, *348*, 166-168.

Polla B. S., Meng X. & Catelli M. G. Protéine de stress et inflammation. *In « L'Inflammation »*, 1998, (Russo-Marie F., Peltier A., Polla B. S. eds), J. Libbey Eurotext, pp. 480-491.

Pratt W. B., Jolly D. J., Pratt D. V., Hollenberg S. M., Giguere V., Cadepond F., Schweitzer-Groyer G., Catelli M. G., Evans R. M. & Baulieu E. E., A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA-binding, 9S glucocorticoid receptor complex. *J. Biol. Chem.*, 1988, *263*, 267-273.

Pratt W. B. & Toft D. O., Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Review*, 1997, *18*, 306-360

Prodromou C., Roe S. M., O'Brien R., Ladbury J. E., Piper P. W. & Pearl L. H., Identification and structural characterization of the ATP-ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 1997, *90*, 65-75.

Prodromou C., Siligardi G., O'Brien R., Woolfson D. N., Regan L., Panaretou B., Ladbury J. E., Piper P. W. & Pearl L. H., Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.*, 1999, *18*, 754-762.

Radanyi C., Chambraud B. & Baulieu E. E., The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90-kDa heat shock protein is encided by its tetratricopeptide repeat domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, *91*, 11197-11201.

Ribeiro R. C. J., Apriletti J. W., Wagner R. L., Feng W., Kushner P. J., Nilsson S., Scanlan T. S., West B. L., Fletterick R. J. & Baxter J. D., X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1998, *65*, 133-141.

Rutherford S. L. & Lindquist S., Hsp90 as a capacitator for morphological evolution. *Nature*, 1998, *396*, 336-342.

Sabbah M., Redeuilh G. & Baulieu E. E., Subunit composition of the estrogen receptor. Involvement of the hormone-binding domain in the dimeric state. *J. Biol. Chem.*, 1989, *264*, 2397-2400.

Scheibel T., Weikl T. & Buchner J., Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, *95*,1495-1499.

Scheibel T., Siegmund H. I., Jaenicke R., Ganz P., Lilie H. & Buchner J., The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, *96*, 1297-1302.

Schuh S., Yonemoto W., Brugge J., Barner V. J., Riehl R. M., Sullivan W. P. & Toft D. O., A 90,000-dalton binding protein common to both steroid receptors and the Rous sarcoma virus transforming protein, $pp60^{v\text{-}src}$. *J. Biol. Chem.*, 1985, *260*, 14292-14296.

Segnitz B. & Gehring U., The function of steroid hormone receptors is inhibited by the Hsp90-specific compound geldanamycin. *J. Biol. Chem.*, 1997, *272*, 18694-18701.

Stebbins C. E., Russo A. A., Schneider C., Rosen N., Hartl F. U., & Pavlevitch N. P., Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an anti-tumor agent. *Cell*, 1997, *89*, 239-250.

Sullivan W. P. & Toft D. O., Mutational analysis of Hsp90 binding to the progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 20373-20379.

Whithesell L. & Cook P., Stable and specific binding of heat shock 90 by geldanamycin disrupts glucocorticoid receptor function in intact cell. *Mol. Endocrinol.*, 1996, *10*, 705-712.

Wiech H., Buchner J., Zimmermann R. & Jakob U., Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature*, 1992, *358*, 169-170.

Xu Y. & Lindquist S., Heat-shock protein Hsp90 governs the activity of $pp60^{v\text{-}src}$ kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, *90*, 7074-7078.

Young J. C., Schneider C. & Hartl F. U., *In vitro* evidence that Hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett.*, 1997, *418*, 139-143.