

Absence d'expression  
des protéines de choc thermique HSP70 dans plusieurs  
régions du néocortex chez le rat  
après une exposition tête seule aux ondes 900 MHz GSM

M. Bes, M. Hotte, J-M Edeline et T. Jay

# Protéines de choc thermique

⇒ Petit groupe de protéines induites en réponse à diverses formes d'agression physique ou chimique

⇒ Protection des cellules dans différentes conditions physiologiques, pharmacologiques et environnementales : molécules chaperonnes (capacité de réparation protéines)

⇒ Mécanisme pas encore connu: fonctions essentielles à la vie cellulaire: assemblage des complexes protéiques et leur transport dans divers compartiments intracellulaires  
(mitochondries: Ellis, *Nature* 2003, Young et al., *Cell*, 2003)

Pas seulement des molécules chaperonnes mais aussi impliqués dans les processus de survie et de mort cellulaire

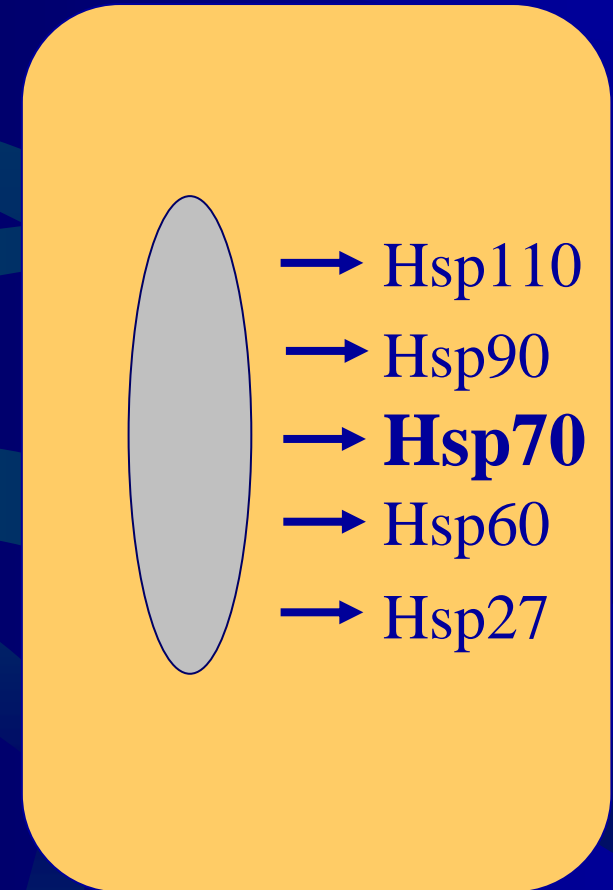
# Différents facteurs d'induction des familles de Hsp

## Agents de stress (dénaturation protéique):

- Choc thermique
- Alcool
- Rayons ultraviolets
- Métaux lourds
- Oxydants
- Chimiothérapie

## Altération de l'état physiologique (augmentation de la synthèse protéique):

- Cycle cellulaire
- Facteurs de croissance
- Infection, inflammation
- Récupération à hypoxie  
ou carence en glucose



# HSPs et radiation

## ⇒ Famille des HSPs 70:

⇒ Fritze et al. (1997) induction faible de l'ARN messager de la protéine Hsp70 dans cervelet et hippocampe chez des rats immédiatement après une exposition "corps entier" **4h** à 7.5 W/Kg (sans changement niveau de protéine). *Neuroscience*

⇒ Cleary et al. (1997): aucune preuve d'induction des Hsp70 dans des cellules en culture exposées **2h** à un rayonnement RF avec des DAS élevés. *Bioelectromagnetics*

⇒ Shallom et al. (2002): augmentation des Hsp70 chez embryons de poussins exposés (incubateur) **30 min** à des DAS de 1,75 et 2,5 W/kg. Max 3 heures après la réponse. *J Cell Biochem*

⇒ Tian et al. (2002): augmentation de la production des Hsp70 dans des cellules en culture exposées 24h à des DAS supérieurs à 20 W/kg . *Int J Radial Biol*

# HSPs et radiation

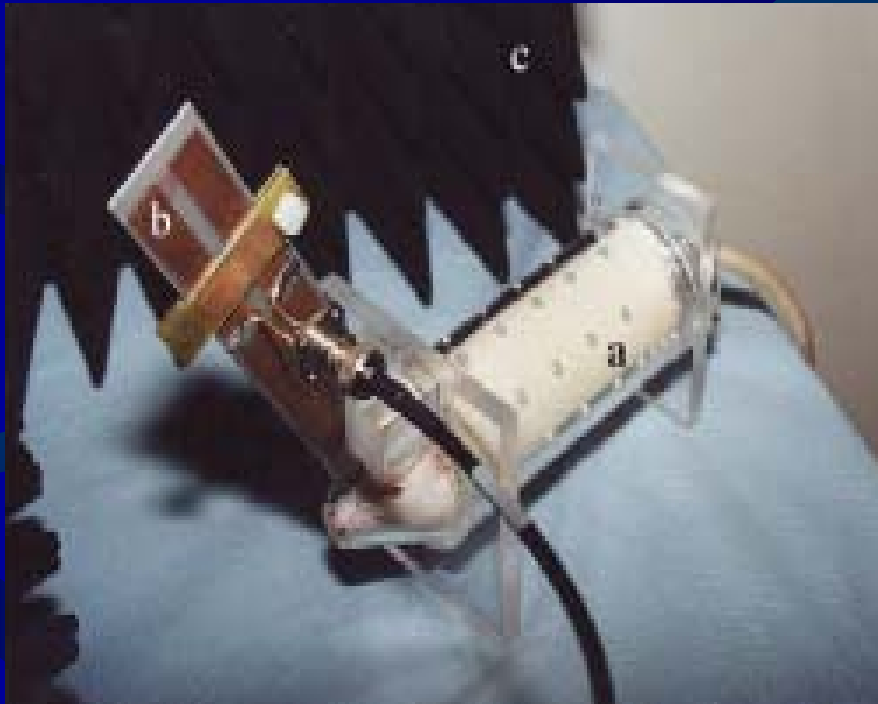
## Famille des HSPs 27 et autres:

⇒ Lesczynski et al. 2002: cellules endothéliales humaines exposées 1h à 900 MHz (2 W/Kg) augmentation passagère phosphorylation **hsp27** bloqué par un inhibiteur de p38MAPK et niveau expression de ces 2 protéines

⇒ Pommerai et al., 2000; 2003: ver de terre (*C. Elegans*) exposé 18h à faible intensité (750 MHz, 0.001 W/kg) élévation synthèse Hsp16: effets non lié à la température.

# HSPs et radiation (Orsay)

## Procédure exp utilisée:



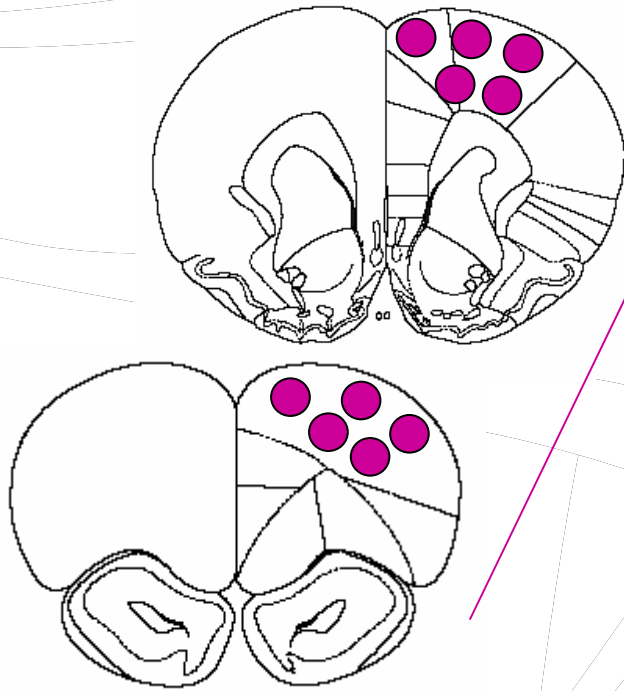
- Tester les niveaux de Hsp70 dans différentes régions chez des rats où seule la tête était exposée (1,5 W/Kg et à 5,25 W/Kg pendant 45 min; 900 MHz, pulsé à 217 Hz) et des rats sham (fusée sans exposition)
- Animaux anesthésiés (uréthane)
- Sacrifice 3h après début exposition, cerveaux frais prélevés (stockés – 80°C)

# Protocole expérimental

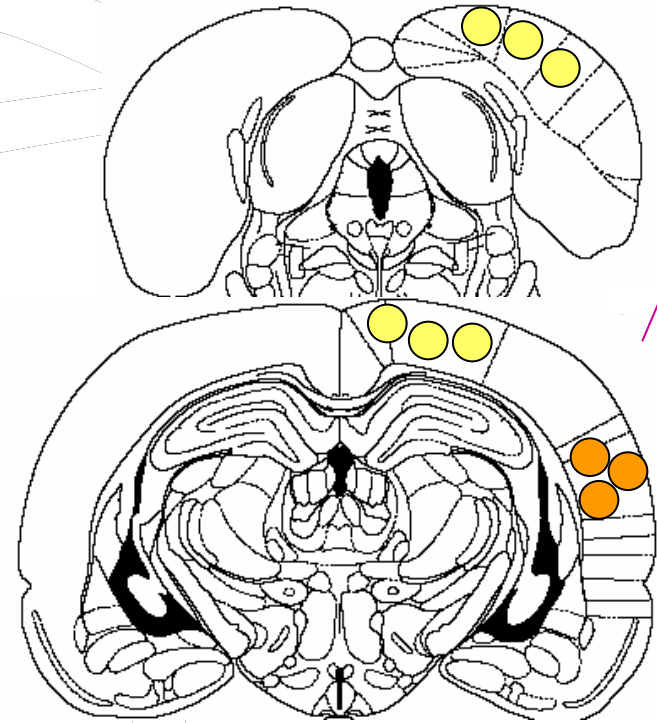
1. Prélèvements différentes régions corticales:
  - technique des « punches » : prélèvement sur coupes congelées (500  $\mu\text{m}$ )
  - régions prélevées: cortex frontal, occipital (visuel), temporal (auditif)
2. Préparation des extraits protéiques à partir d'homogénats:
  - tampon avec inhibiteurs de protéases et phosphatases
  - centrifugation puis dosage des protéines (méthode de Bradford avec BSA comme protéine standard pour gamme étalon)
3. Séparation des protéines par électrophorèse:
  - gel de polyacrylamide (méthode Laemmli): quantité identique de protéines (20 $\mu\text{g}$ ) dans chacun des puits + contrôle positif Hsp70 (50ng)
  - migration des protéines dans le gel soumis à un champ électrique
4. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

# Cortex frontal

# Cortex visuel et temporal



*Bregma + 4.2 à +2.2 mm*



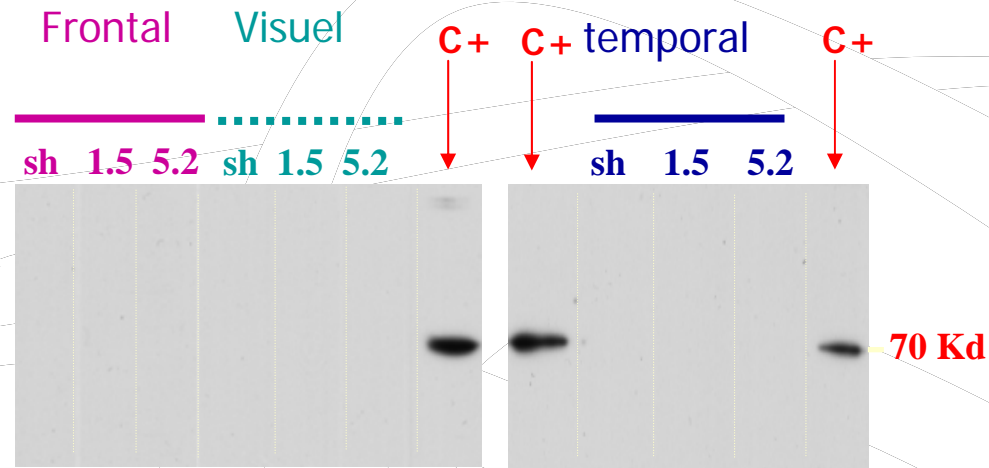
*Bregma - 3.8 à - 8.3 mm*



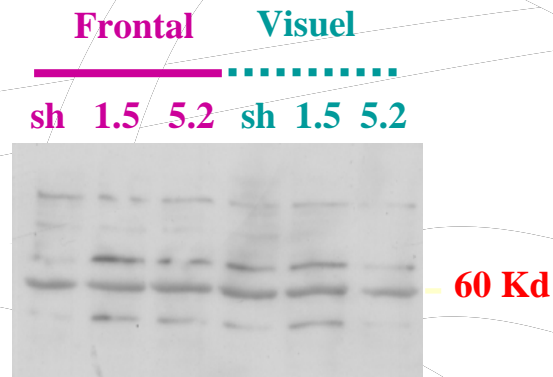
# Protocole expérimental (suite)

5. Immunoblots: détection de l'immunoréactivité de la protéine
  - membranes incubées avec l'anti-Hsp70 (1/1000: anticorps monoclonal fabriqué chez la souris Stressgen: 200µg pour 625€) puis anticorps secondaire couplé à la peroxydase qui reconnaît l'anti-Hsp70
  - présence de Hsp70 révélée par la méthode de chimioluminescence (ECL, Amersham): films exposés à la lumière émise par la réaction chimique luminescente.
  
6. Quantification des signaux
  - densité optique des signaux quantifiée à l'aide densitomètre

# Absence de protéine HSP 70 dans les régions frontales, visuelles et temporales



# Autres protéines (tyrosine hydroxylase)



## Hsc70 (constitutive) componente principale

### Presence of both Constitutive and Inducible Forms of Heat Shock Protein 70 in the Cerebral Cortex and Hippocampal Synapses

Heat shock proteins serve as molecular chaperones in a protein 'holding and folding' system. Protein sequencing, extraction and immunoblot analyses indicate that Hsc70, a constitutive form, is a major component of the rat postsynaptic density (PSD) fraction, while Hsp70, an inducible form, is present at the basal level. Immunohistochemical studies show that expression of Hsc70 is high, but that of Hsp70 is low, in the cerebral cortex and hippocampal formation. In dissociated hippocampal neurons, both Hsp70 and Hsc70 immunoreactivities are distributed throughout the soma and dendrites. In dendrites, there are many stained puncta which are mostly co-localized with PSD-95, a postsynaptic marker. Interestingly, variation in staining intensity of the puncta is significantly larger for Hsp70 than for Hsc70 in 2-week-old cultures, but becomes less significant in 5½-week-old cultures. At the electron microscopic level, both Hsp70 and Hsc70 are mainly associated with asymmetrical PSDs. However, Hsc70 is also associated with amorphous subsynaptic structures and spine apparatus-like cisternae. Our data indicate that both Hsp70 and Hsc70 are present in PSDs but are differentially distributed at subsynaptic sites, and provide a potential candidate system for a 'synaptic tag'.

Il Soo Moon<sup>1</sup>, In Sick Park<sup>2</sup>, Leslie T. Schenker<sup>3</sup>, Mary B. Kennedy<sup>3</sup>, Jung-il Moon<sup>1,4</sup> and Ingyol Jin<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy and Research Institute for Natural Science of Dongguk University, College of Medicine,

<sup>2</sup>Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea, <sup>3</sup>Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91125, USA and <sup>5</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

<sup>4</sup>Present address: Department of Biology, Brandeis University, Waltham, MA 02454, USA

studies have shown glycosylation within dendrites (Torre and Steward, 1996). Therefore, it seems that essential elements required for protein synthesis and post-translational modifications are present at the base of spines.

Less is known on the machinery involved in the protein life cycle within dendritic spines. However, it is believed that rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi apparatus extend into proximal portions of the spine neck (Spacek and Harris, 1997; Gardiol *et al.*, 1999). Subs synaptic cisternae, which are present close to the postsynaptic differentiations, are shown to be associated with several components involved in synthesis and secretion of proteins such as eIF-2 (initiation factor of the translation), ribosomes, BiP (an ER chaperone), rab1 (ER to Golgi traffic), CTR433 (medial Golgi) and TGN38 (trans-Golgi) (Gardiol *et al.*, 1999), indicating that many components necessary for the life cycle of certain proteins are present even in dendritic spines. However, little is known about the distribution of molecular chaperones in synaptic sites.

In an effort to characterize the molecular composition of the postsynaptic density (PSD), a postsynaptic submembranous protein complex (Sikelytz, 1985; Kennedy, 1997, 1998), we

# Conclusions

- Résultats préliminaires à compléter
  - 4 rats dans chaque groupe (sham, 1,5 et 5,25 W/Kg)
- Comparaison avec résultats *cfos* animaux anesthésiés?  
exposition 2 h ou chronique non explorée

# Perspectives

- Données importantes absentes :

1) seuil de SAR provoquant une induction de Hsps

2) cinétique Hsp 70 et autres: quand a lieu l'augmentation et combien de temps dure-t'elle?

Nécessité d'explorer différents temps après exposition aux RF

*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*  
24:167-178 © 2004 The International Society for Cerebral Blood Flow and Metabolism  
Published by Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Baltimore

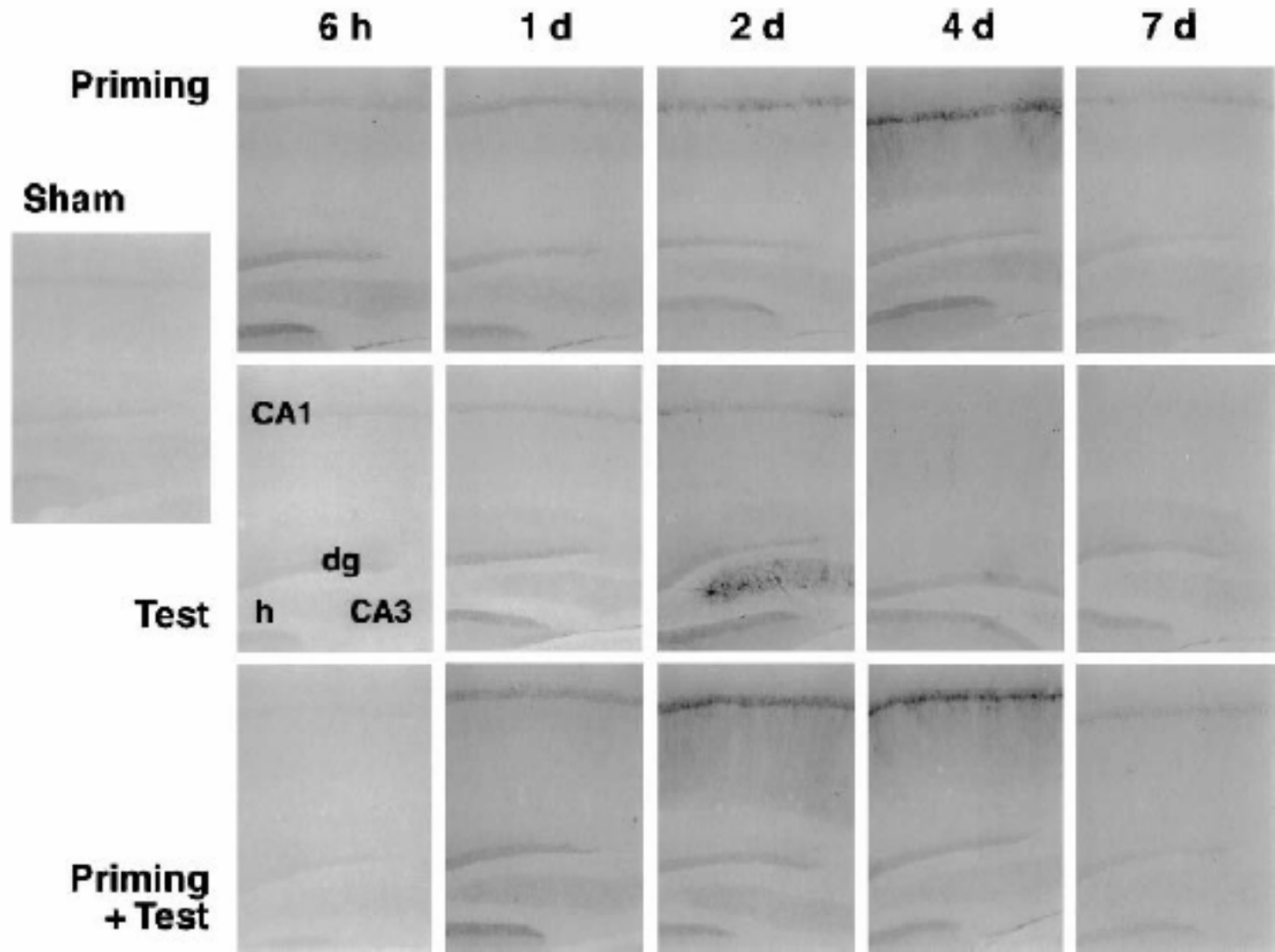
# Time Course and Cellular Distribution of Hsp27 and Hsp72 Stress Protein Expression in a Quantitative Gerbil Model of Ischemic Injury and Tolerance: Thresholds for Hsp72 Induction and Hilar Lesioning in the Context of Ischemic Preconditioning

Kazuhiko Nishino and Thaddeus S. Nowak, Jr.

*Department of Neurology, University of Tennessee, Memphis, Tennessee, U.S.A.*

---

# Distribution et cinétique de hsp70 dans l'hippocampe





# Remerciements

France Telecom R & D

T. S. Nowak,  
Department of Neurology,  
University of Tennessee,  
Memphis  
USA