

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INDUCTION DE L'AUTOPHAGIE ET DE L'APOPTOSE PAR LE STRESS
THERMIQUE : EFFET PROTECTEUR DE LA THERMOTOLÉRANCE (40 °C)

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

SARAH KASSIS

OCTOBRE 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

DÉDICACE

À mes parents et mon frère

REMERCIEMENTS

Je voudrais premièrement adresser toute ma gratitude à ma directrice de recherche Dr Diana Averill, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, encadrée et orientée durant ces deux années. Merci pour sa confiance, sa patience envers moi et son soutien dans la progression de mon projet.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour accepter de prendre de leur précieux temps afin d'évaluer mon mémoire.

La réalisation de mon mémoire a été possible grâce au soutien de mes collègues de laboratoire à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance. Merci pour leur support moral et intellectuel ainsi que leurs judicieux conseils qui ont poussé ma réflexion tout au long de ma démarche. Je remercie Dr Audrey Glory et oui finalement Docteur, pour être toujours disponible, de m'avoir aidé à avancer et à ne pas relâcher, sa présence est toujours un réconfort. Merci à Maureen Dutordoir pour avoir été un excellent exemple à suivre au niveau professionnel et dans la vie quotidienne. Merci à Bélinda Crobeddu pour avoir été notre petite maman du laboratoire et pour avoir toujours pris soin de nous avec douceur, merci à Marceline Tchouagué pour sa gentillesse et ses conseils envers les cours de maîtrise et merci à Clara Lafortune pour son humour constant. Finalement un grand et sincère remerciement à Mélanie Chow-Shi-Yée, pour sa générosité, sa compréhension, pour ses vidéos drôles, et sa passion pour la nourriture qu'elle a partagée avec moi. Merci de m'avoir soutenu lorsque j'étais découragé. Sans la collaboration de ces filles, ce travail n'aurait pas pu s'achever. Elles ont rendu ces dernières années inoubliables. Une amitié spéciale et éternelle a été développée avec chacune d'elles.

Je voudrais exprimer mes remerciements à Dr Mélanie Grondin pour son implication dans ce projet qui a été à plusieurs reprises un grand secours. Merci à tous les professeurs, en particulier Dr François Ouellet, et les techniciens qui créent continuellement une ambiance de travail très agréable dans le département.

Finalement, je remercie toute ma famille et mes amis pour m'avoir encouragé à embarquer dans cette aventure. Merci d'avoir toujours été à mes côtés.

TABLE DES MATIÈRES

Dédicace	ii
Liste des tableaux	V
Liste des figures	VI
Liste des abréviations	VIII
Résumé	XII
Chapitre I	1
Introduction	1
1.1. Cancer	1
1.1.1. Traitements du cancer	3
1.2. Hyperthermie	6
1.2.1. Histoire de l'hyperthermie.....	6
1.2.2. Application de l'hyperthermie en clinique	8
1.2.3. Hyperthermie associée aux traitements de cancer	13
1.2.4. Effets moléculaires et biochimiques de l'hyperthermie	17
1.2.5. Thermotolérance.....	21
1.3. Apoptose	24
1.3.1. Mécanismes de régulation de l'apoptose.....	26
1.3.2. Apoptose et choc thermique	34
1.4. Autophagie.....	36
1.4.1. Mécanismes et régulation des voies de signalisation de l'autophagie	37
1.4.2. Autophagie : une réponse de survie ou de mort cellulaire.....	42
1.4.3. Autophagie et cancer	44
1.4.4. Autophagie et hyperthermie	46
1.5. Présentation du projet	48
1.5.1. Introduction	48
1.5.2. Hypothèses	49
1.5.3. Objectifs du projet.....	50
1.5.4. Choix de modèle.....	51
Chapitre II.....	52
Résultats expérimentaux.....	52
2.1. Préface	52
2.2. Article	54
2.2.1. Abstract	56

2.2.2.	Résumé	57
2.2.3.	Introduction	58
2.2.4.	Materials and methods.....	61
2.2.5.	Results	65
2.2.6.	Discussion	71
2.2.7.	Conclusion.....	76
2.2.8.	Acknowledgments	77
2.2.9.	Figures.....	77
Chapitre III.....		86
Conclusion		86
Annexes		92
Données supplémentaires		92
Article en collaboration		97
Références.....		100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Différences des effets entre l'hyperthermie et de la thermotolérance sur les cellules cancéreuses.....	22
--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Images des dispositifs de l'hyperthermie.	10
Figure 1.2. La combinaison de l'hyperthermie à la radiothérapie et chimiothérapie augmente le taux de mort des cellules tumorales.....	16
Figure 1.3. Mode d'action de l'hyperthermie au niveau cellulaire.....	19
Figure 1.4. Processus morphologiques d'une cellule en apoptose ou en nécrose.....	25
Figure 1.5. Mécanismes d'activation de l'apoptose par la voie extrinsèque et les voies intrinsèques.....	29
Figure 1.6. Les différents types d'autophagie.....	37
Figure 1.7. Régulation et signalisation du mécanisme d'autophagie chez les mammifères..	40
Figure 1.8. Le rôle de l'autophagie dans le cancer.	45
Figure 2.1. Heat shock (42 °C) induces autophagy in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.....	81
Figure 2.2. Heat shock (42 °C) enhances Beclin 1 and LC3 protein expression in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.....	82
Figure 2.3. LC3 protein expression is increased by heat shock (42 °C) in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.	83
Figure 2.4. Inhibition of autophagy increases heat shock (42 °C) induced apoptosis: protective effect of mild thermotolerant (40°C).....	84
Figure 2.5. Inhibition of autophagy increases heat shock (42 °C) mediated activation of caspase-9 and caspase-8: protective effect of mild thermotolerance (40 °C).....	84

Figure 2.6. Autophagy inhibition increases heat shock (42 °C) mediated activation of caspase-4, caspase-7 and calpain: protective effect of mild thermotolerance (40 °C). 85

Figure 4.1. Heat shock (42 °C) enhances protein expression Atg7 and the Atg5-Atg12 conjugate in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.. 94

Figure 4.2. Short exposure to lethal heat shock (45 °C) induces autophagy in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.. 95

Figure 1.3. Representative FACScan plots and statistic table for detection of apoptosis and necrosis in non-thermotolerant and thermotolerant cells exposed at 42 °C.....96

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-MA	3-méthyladénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFC	7-amino-4-trifluorométhylcoumarine
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose
AMBRA1	« Activating molecule in beclin-1 regulated autophagy »
AMC	7-amino-4-méthylcoumarine
AMPK	« 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase »
Apaf-1	Facteur d'activation des protéases apoptotiques
ARN	Acide ribonucléique
ASK-1	Kinase régulant le signal de l'apoptose
ATCC	« The American Type Culture Collection »
ATF4	Facteur de transcription activateur 4
ATF6	Facteur de transcription activateur 6
Atg	« Autophagy related genes »
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	Promoteur de mort associé à Bcl-2
Baf.	Bafilomycine A1
Bak	Protéine tueuse antagoniste homologue de Bcl-2
Bax	Protéine X associée à Bcl-2
Bcl-2	Protéine de lymphome de cellules B 2
Bcl-w	Protéine ressemblant à Bcl-2 2
Bcl-X_L	Protéine ressemblant à Bcl-2 1
BH	Domaine d'homologie à Bcl-2
BH3	Domaine d'homologie aux protéines Bcl-2 3
Bid	Agoniste des domaines de mort interagissant avec BH3
Bif-1	« Bax interacting factor 1 »
Bim	Protéine ressemblant à Bcl-2 11
BNIP3	Protéine interagissant avec Bcl-2/E1B 3
BRCA	Gène du cancer du sein
BSA	Albumine sérique bovine
Ca²⁺	Calcium (II)
CAD	ADNase activé par les caspases
Caspase	« Cysteine-dependent, aspartate-specific peptidases »
CARD	Domaine de recrutement et d'activation des caspases
CAT	Catalase

c-FLIP	« FLICE-like »
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CHOP	Facteur de transcription protéique homologue à C/EBP
CO₂	Dioxyde de carbone
Cu/ZnSOD	Superoxyde dismutase à cuivre/zinc
Cyt c	Cytochrome c
DAPK	Protéine kinase associée à la mort
DD	Domaine de mort
DED	Domaine effecteur de mort
DEVD	Asparagine-Glutamate-Valine-Asparagine
DISC	Complexe inducteur de signal de mort
DMEM	« Dulbecco modified eagle's medium »
DNP	2,4-dinitrophénol
DR	Récepteur de mort
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGTA	Acide éthylène-glycol-tétraacétique
eIF2α	Facteur eucaryotique d'initiation 2 alpha
EITD	Glutamate-isoleucine-Thréonine-Asparagine
Endo G	Endonucléase G
ERAD	Dégradation protéiques associée au réticulum endoplasmique
ERO	Espèces réactives oxygénées
FADD	Domaine de mort associé à la protéine Fas
FasL	Ligand Fas
FBS	Sérum foetal bovin
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GAPDH	Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
GCL	Glutamate cystéine ligase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HeLa	Cellules humaines de carcinome du col de l'utérus
Hsc70	« Heat shock cognate protein of 70 kDa »
HSE	Élément de choc thermique
HSF	Facteur de transcription de choc thermique
HSP	Protéine de choc thermique
HT	Hyperthermie
HTL	Hypethermie locale
HTG	Hyperthermie globale
IAP	Inhibiteurs des protéines de l'apoptose
ICAD	Initiateur de l'ADNase activée par les caspases
Inh.	Inhibiteur

IRE-1α	Sérine/thréonine-protéine kinase/endoribonucléase dépendante de l'inositol
JNK	«c-Jun N-terminal Kinase»
LAMP-2a	«Lysosomal-associated membrane protein-2a»
LEHD	Leucine-Glutamate-Histidine-Asparagine
LEVD	Leucine-Glutamate-Valine-Asparagine
MAP-LC3	« Protein microtubule-associated protein 1 light chain 3 »
MCA	Methoxycoumarin-acetyl
MEKK1	« Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1»
MDR	Phénomène de résistance multidrogues
MnSOD	Superoxyde dismutase à manganèse
MOPS	Acide 3-morpholinopropane-1 sulfonique
mTOR	« Mammalian target of rapamycin complexe 1 »
mTORC-1	Sérine/thréonine kinase cible de la rapamycine (complexe 1)
N	Cellules non thermotolérantes
NF-κB	Facteur nucléaire- kappa-Beta
O₂	Dioxygène
O₂⁻	Superoxyde
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymérase
PBS	Tampon phosphate salin
PE	Phosphatidyléthanolamine
PERK	« Protein kinase RNA (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase »
PI	Iodure de propidium
PIDD	Protéine inductible par p53 présentant un domaine de mort
PI3K	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PIPES	Acide 1,4-Piperazinediéthanesulfonique
Pgp	Glycoprotéine-P
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PTP	Pore de transition de la perméabilité mitochondriale
RE	Réticulum endoplasmique
RIP	Protéines interagissant avec les récepteurs
RIPK	Kinases interagissant avec les récepteurs
ROCK I	« Rho-associated kinase I »
RT	Radiothérapie
SDS-PAGE	« Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis »
Smac/Diablo	« Second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI »
SOD	Superoxyde dismutase
Suc-LY	Suc-Leucine-Tyrosine
tBid	Bid tronqué
TNF	Facteur de nécrose tumorale

TNFR	Récepteur des facteurs de nécrose tumorale
TRADD	Domaine de mort associé au TNF-R
TRAF-2	Protéine adaptatrice 2 associée au récepteur TNF
TRAIL	« TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand »
TSC 1/2	Facteur de sclérose tubéreuse 1/2
TT	Cellules thermotolérantes
UPR	Réponse aux protéines mal repliée
ULK	« Unc-51-like kinase 1 »
UVRAG	Gène associé à la résistance aux UV
XBP-1	Protéine de liaison à la X-box 1
$\Delta\Psi_m$	Changement de potentiel de la membrane mitochondriale

RÉSUMÉ

L'hyperthermie (39 à 45 °C) est une thérapie récente et alternative contre le cancer, utilisée en combinaison à la radiothérapie et la chimiothérapie. L'hyperthermie cible et augmente la chaleur d'une région tumorale. Son application à des températures létales (42 à 45 °C) crée un stress thermique sur les cellules cancéreuses et conduit à la mort cellulaire. Malgré l'effet cytotoxique de l'hyperthermie, les mécanismes cellulaires en réponse au stress thermique ne sont pas complètement établis, particulièrement envers un stress thermique faible. Le stress thermique faible est induit à des températures létales sur des expositions courtes ou à des températures modérées (39 à 40 °C) sur des expositions plus longues. Ce type de stress peut induire la thermotolérance qui est une réponse adaptative, rendant les cellules cancéreuses résistantes aux chocs thermiques ou aux traitements anticancéreux subséquents. L'action protectrice de la thermotolérance développe plusieurs éléments de défenses tels que les protéines de choc thermique qui peuvent diminuer l'induction de la mort par apoptose. De plus, il y a souvent une dérégulation de l'apoptose et de l'autophagie dans les cellules tumorales, favorisant de leur survie. L'hypothèse de ce projet est que l'autophagie serait activée en réponse à un stress thermique faible. Elle interviendrait comme un mécanisme de défense cellulaire pendant la thermotolérance, protégeant les cellules contre la mort cellulaire par l'apoptose induite par un stress thermique fort à 42 °C. Le but de cette étude est de déterminer le profil d'induction de l'autophagie lors d'un choc thermique faible et d'évaluer ensuite, son impact sur l'activation de l'apoptose en réponse à un choc thermique fort à 42 °C, chez les cellules cancéreuses HeLa. La présence de l'autophagie a été observée, chez les cellules thermotolérantes ou non thermotolérantes, par marquage de compartiments acides et par l'expression des protéines spécifiques telles que Beclin-1 et LC3. L'apoptose a été mesurée par détection de l'Annexin V ainsi que par l'activité des caspases. Les résultats ont montré que l'autophagie était activée transitoirement (0 à 45 min) chez les cellules HeLa exposées à un choc thermique de 42 °C. De plus, l'autophagie était davantage induite chez les cellules rendues thermotolérantes à 40 °C. Lorsque l'autophagie était inhibée par des agents chimiques (le 3-méthyladénine et la Bafilomycine A1), le niveau d'induction de l'apoptose était renforcé via les trois voies principales de l'apoptose : mitochondriale, des récepteurs de mort et du réticulum endoplasmique chez les cellules HeLa thermotolérantes et non thermotolérantes. Toutefois, les cellules thermotolérantes étaient moins sensibles à l'apoptose induite par le stress thermique léthal à 42 °C. Par conséquent, l'autophagie joue un rôle partiel dans la réponse protectrice des cellules cancéreuses contre l'apoptose induite par l'hyperthermie. Cette étude a amélioré notre compréhension des mécanismes de réponse cellulaire, en particulier de la relation entre l'autophagie et l'apoptose en réponse au choc thermique à 42 °C. Nos résultats suggèrent que l'hyperthermie combinée avec les agents qui bloquent l'autophagie pourraient être utile dans le combat contre les tumeurs. Il est ainsi important d'aller plus en profondeur sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les réponses des cellules aux stress thermiques afin d'optimiser l'efficacité thérapeutique de l'hyperthermie en clinique.

Mots clés : Hyperthermie, Stress thermique, Thermotolérance, Autophagie, Apoptose, Caspases

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Cancer

Le cancer est l'une des maladies dont l'être humain souffre le plus aujourd'hui. Il consiste en l'envahissement de n'importe quel tissu (sein, prostate, poumon, peau, cerveau, etc.) de l'organisme par des cellules cancéreuses qui forment une tumeur maligne. Ces nombreuses cellules proviennent d'une même cellule initiale, présentant plusieurs caractéristiques anormales au niveau du noyau, du cytoplasme, de la membrane et de la taille cellulaire (Cairns *et al.*, 2011). Cette cellule acquiert également la capacité à se diviser et se multiplier anarchiquement (Hanahan et Weinberg, 2011). En effet, une cellule cancéreuse est caractérisée par un cycle cellulaire perturbé, menant à une altération de la réplication du matériel génétique et une prolifération continue et incontrôlée. Elle finit par développer des propriétés d'adaptation métabolique et une pharmacorésistance. Certaines cellules cancéreuses peuvent circuler dans le sang et envahir d'autres parties saines du corps, conduisant à l'apparition de métastases.

Divers facteurs de risque peuvent promouvoir le développement d'un cancer. Il peut s'agir de facteurs de risque endogènes tels que des modifications dans la séquence génomique (mutation ponctuelle, translocation, délétion) qui causent un dommage à l'ADN dans la cellule (Cairns *et al.*, 2011). Ces facteurs sont aussi liés à la diminution de l'efficacité de réparation de l'ADN, observée davantage pendant le vieillissement (Société canadienne du cancer, 2015). Ainsi, la cellule ayant un ADN endommagé est à risque de se transformer en une cellule cancéreuse. Des facteurs de risque génétiques peuvent aussi être à l'origine d'un cancer (Société canadienne du cancer, 2015). Par exemple, une patiente peut être porteuse d'une mutation sur le gène du cancer du sein (BRCA1 ou BRCA2). Il existe aussi des facteurs exogènes qui sont associés aux modes de vie et à l'environnement de l'homme. Le

tabagisme est le premier facteur de risque cancéreux, amplifiant l'incidence de 27 à 30% de plusieurs types de cancer ; s'ensuivent la consommation de l'alcool et les habitudes alimentaires qui seraient à l'origine d'environ 18% des cancers (Boyle *et al.*, 2015). L'exposition professionnelle aux agents infectieux, aux rayons ultraviolets ainsi qu'à des substances cancérogènes tels l'amiante, le chrome, l'aluminium et les hydrocarbures polycycliques, entraîne une dérégulation génomique et augmente la probabilité d'être atteint d'un cancer. La pollution de l'air urbain et le manque d'activité physique ont aussi un impact sur le risque de développer la maladie (Société canadienne du cancer, 2015).

Au cours des dernières décennies, le cancer est devenu la première cause des décès avec 30% de taux de mortalité au Canada (Société canadienne du cancer, 2015). De plus, le taux d'apparition de cas de cancer continu à augmenter à ce jour. En 2015, au Canada, plus de 200 000 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués et environ 78 000 personnes en sont mortes (Société canadienne du cancer, 2015). La Société canadienne du cancer estime que deux personnes sur cinq vont être touchées par le cancer au cours de leur vie. De ce fait, la guérison de cette maladie est un des objectifs principaux de l'oncologie. Ce domaine médical en est un interdisciplinaire de la recherche qui a mené au développement d'une gamme de méthodes de diagnostics et de traitements contre les tumeurs malignes (Cutler, 2008). Cependant, l'amélioration de l'efficacité des traitements anticancéreux ainsi que la découverte et le développement de nouvelles modalités thérapeutiques contre le cancer en restent l'essentiel.

1.1.1. Traitements du cancer

À la suite d'un dépistage et/ou diagnostic d'une tumeur, des traitements anticancéreux sont proposés dans le but d'éliminer complètement la tumeur et d'éviter sa propagation aux tissus environnants. Les traitements classiques tels que la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont utilisés selon le stade du cancer, le degré de malignité, de la localisation et de la taille de la tumeur. Ces méthodes sont souvent combinées afin de parvenir à un meilleur contrôle de la tumeur et un plus haut taux de survie des patients (Kup *et al.*, 2015; Perera *et al.*, 2014).

1.1.1.1. Chirurgie

La chirurgie a été pendant plusieurs années l'unique solution contre le cancer et demeure très utilisée jusqu'à présent pour des tumeurs solides et primitives (Causey *et al.*, 2012). Elle permet de retirer partiellement ou complètement la tumeur envahissant l'organe ou le tissu. Cette intervention précoce chirurgicale pourrait nécessiter l'ablation totale de l'organe (ex : le sein) de façon à éliminer l'intégrité de la masse tumorale et de réduire le risque de récurrence.

La chirurgie peut être curative, conservatrice ou radicale avec réparation, mais elle peut également être palliative. Dans certains cas, la chirurgie n'est pas toujours suffisante pour éliminer complètement la tumeur. En effet, la tumeur peut être très grosse et son emplacement fait en sorte qu'il soit difficile de l'enlever sans endommager les tissus voisins. De ce fait, une radiothérapie ou chimiothérapie est effectuée soit avant la chirurgie afin de diminuer la taille de la tumeur soit après pour éliminer des tissus cancéreux restants (Société canadienne du cancer, 2015). Ces traitements sont aussi appliqués en prophylaxie pour diminuer la probabilité de récurrence.

1.1.1.2. Radiothérapie

La radiothérapie est administrée par de fortes doses de rayons ionisants susceptibles de détruire les cellules cancéreuses tout en essayant de préserver au maximum les tissus sains et avoisinants. On distingue la radiothérapie palliative qui consiste à réduire la taille de la tumeur et la radiothérapie curative qui éradique les cellules cancéreuses. Ce traitement régional cible le centre de la tumeur et cause des dommages à l'ADN, empêchant la réparation et la division cellulaire. Par conséquent, la radiothérapie conduit à la mort de cellules cancéreuses après plusieurs traitements (Société canadienne du cancer, 2015).

La radiothérapie est utilisée chez plus de la moitié des patients atteints de cancer. Des effets néfastes peuvent se produire chez les patients, pendant ou après le traitement. Certains effets sont à court terme tels que des réactions cutanées (rougeur de la peau), de la fatigue, des nausées et un changement de l'appétit. Des effets tardifs sont aussi observés comme l'aplasie médullaire, la perte de poids et de cheveux. De plus, les cellules cancéreuses réussissent parfois à développer une résistance aux radiations qui est souvent la cause de plusieurs échecs dans les traitements anticancéreux (Kaur *et al.*, 2011). Ainsi, il est préférable d'associer la radiothérapie avec d'autres traitements pour minimiser ce problème.

1.1.1.3. Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'administration de médicaments ou d'agents chimiques causant la mort de cellules cancéreuses afin d'arrêter ou ralentir la progression tumorale. L'activité cytotoxique de ces composés affecte le cycle cellulaire et bloque la réplication cellulaire (Feng et Chien, 2003). Il existe plusieurs groupes d'agents chimiothérapeutiques : les agents alkylants (ex : le melphalan et l'ifosfamide), les antimétaboliques (ex : antipurine, antifolate et leustatine), les alcaloïdes végétaux, les antibiotiques antitumoraux et les agents d'origine naturelle pouvant être des inhibiteurs de la topoisomérase comme la doxorubicine (Brannon-Peppas et Blanchette, 2004).

Les agents chimiothérapeutiques peuvent être administrés seuls ou en combinaison par voie orale ou intraveineuse, tout dépendant de la molécule et du dosage prescrits. Cependant, les agents cytotoxiques ne sont pas toujours spécifiques et peuvent cibler les cellules saines surtout celles en division rapide telles que les cellules de l'intestin, du sang et du follicule pileux. Par conséquent, plusieurs effets néfastes (ex : suppression de la moelle osseuse ou dommages aux organes due à la toxicité des agents chimiothérapeutiques) ou des inconvénients comme la perte de cheveux, peuvent parvenir.

La chimiothérapie est utilisée pour traiter plus de 200 types différents de cancer (Société canadienne du cancer, 2015). Cependant, les cellules cancéreuses peuvent aussi développer une résistance aux agents chimiothérapeutiques qui est le problème majeur des traitements contre le cancer. L'utilisation combinée de la chimiothérapie et d'autres traitements pourrait permettre d'éviter la résistance et les doses utilisées seraient plus faibles, diminuant ainsi les effets néfastes.

1.1.1.4. Autres traitements anticancéreux

Dans certains cas, les traitements classiques peuvent ne pas être efficaces ou appropriés pour éliminer toute la tumeur. En conséquence, les médecins ont recours à d'autres traitements telles l'immunothérapie, l'hormonothérapie ou encore la thérapie génique (Vanneman et Dranoff, 2012). Une autre modalité thérapeutique qui est présente depuis longtemps, mais peu reconnue est l'hyperthermie (Issels *et al.*, 2016).

1.2. Hyperthermie

1.2.1. Histoire de l'hyperthermie

L'hyperthermie provient de deux termes grecs *Hyper* et *Therme* signifiant haute et chaleur, respectivement. L'idée d'appliquer une chaleur pour lutter contre une maladie, particulièrement le cancer, a été mise en place depuis plusieurs siècles. En effet, il y a plus de 3000 ans, la médecine égyptienne utilisait du matériel chaud, comme une barre métallique chauffée, pour détruire et éliminer les tissus anormaux de l'organisme [voir revues (Baronzio *et al.*, 2006; Bettaieb *et al.*, 2013)]. Ensuite, une variété de civilisations anciennes dont les civilisations grecques, romaines, indiennes et asiatiques ont suivi cette méthode de traitement contre de nombreuses maladies (cancer, maladies neurologiques et neuroleptiques) (Bettaieb *et al.*, 2013; Decker et Safdar, 2009; Vertrees *et al.*, 2002).

Dans les années 1860, une rémission du cancer en réponse à la chaleur a été observée, provoquant un grand espoir chez les patients [voir revues (Bettaieb *et al.*, 2013; Sugahara *et al.*, 2008)]. En effet, les chirurgiens Busch et Coley avaient révélé qu'une fièvre causée par une infection bactérienne (l'érysipèle) diminuait la résistance des cellules cancéreuses sans avoir un effet sur la santé de l'humain et entraînait ainsi une régression de la tumeur [voir revue (Baronzio *et al.*, 2006)]. Ensuite, le Dr Coley a créé une toxine par l'incorporation d'une bactérie *Serratia marcescens* dans un vaccin contre le streptocoque qui développait une fièvre et permettait de contrôler la croissance tumorale (Baronzio *et al.*, 2006; Coley, 1893). Par conséquent, cette toxine fut utilisée comme traitement anticancéreux contre plusieurs types de cancer sans la nécessité d'opérer. Cependant, ce traitement semblait difficile, voir pratiquement impossible à gérer précisément au niveau des tumeurs profondes et encombrantes (Sugahara *et al.*, 2008). Il provoquait des réponses différentes et imprévisibles pour chaque patient [voir revue (Bettaieb *et al.*, 2013)]. De plus, des difficultés étaient observées au niveau du ciblage de la région envahie chez le patient (Baronzio *et al.*, 2013). À cette époque, l'obtention d'une procédure hyperthermique à la fois rapide, efficace et sécuritaire n'était pas encore résolue.

En 1898, Westermarck a établi une technique thermothérapeutique locale qui a pu conduire à une rémission à long terme d'un cancer cervical, sans induire de fièvre (Bettaieb *et al.*, 2013; Westermarck, 1898). Néanmoins, les patients souffraient toujours d'une douleur extrême à cause de la forte température utilisée [voir revue (Bettaieb *et al.*, 2013)]. Des méthodes, utilisant comme source chaleur, l'électricité ou des courants de haute fréquence, ont été tentées [voir revue (Dahl et Overgaard, 1995)]. Cependant, de nombreuses thérapies telles que la chimiothérapie et la radiothérapie, ont aussi été développées et ont démontré une efficacité plus grande que la thermothérapie à cette époque (Bettaieb *et al.*, 2013).

En 1967, Cavalière et son groupe de recherche ont appliqué l'hyperthermie par perfusion pour traiter des patients affectés par le mélanome et le sarcome métastatiques. Ils ont établi le concept qu'*in vivo*, les cellules cancéreuses sont plus sensibles à la chaleur que les cellules saines et que la quantité de cellules mortes dépend de la durée et de la température d'exposition (Baronzio; *et al.*, 2014; Seegenschmiedt et Vernon, 1995). À partir de 1970, des études *in vitro* sur des cellules de mammifères ont fourni des justifications pour l'application de l'hyperthermie en clinique [voir revue (van der Zee, 2002)], qui a ensuite été confirmée comme étant une méthode thérapeutique en oncologie [voir revues (Bettaieb *et al.*, 2013; Dahl et Overgaard, 1995)]. Cependant, quelques décennies plus tard, les premiers essais déroulés aux États-Unis ont obtenu des résultats décevants, dus par exemple à des problèmes d'assurance qualité, ce qui a mis un frein temporaire au développement de l'hyperthermie [voir revue (van der Zee, 2002)].

Avec l'amélioration des systèmes d'application de la chaleur, l'hyperthermie est devenue plus simple et sécuritaire [voir revue (Bettaieb *et al.*, 2013)]. Depuis, elle a émergé comme un nouveau traitement du cancer, un des meilleurs radiosensibilisateurs et a pu être adoptée par la communauté des professionnels en oncologie (Horsman et Overgaard, 2007; Kampinga et Dikomey, 2001; Overgaard, 2013; Sugahara *et al.*, 2008; van der Zee, 2002). Un intérêt mondial sur l'hyperthermie a été initié lors d'un premier congrès international sur l'oncologie hyperthermique en 1975 à Washington (van der Zee, 2002). Désormais, un symposium international sur l'oncologie hyperthermique a lieu tous les quatre ans, et plusieurs associations et institutions de l'étude sur l'hyperthermie ont été créées.

1.2.2. Application de l'hyperthermie en clinique

L'hyperthermie, ou thermothérapie (39 à 45 °C), est devenue l'une des thérapies prometteuses afin de lutter contre le cancer (Issels *et al.*, 2016; van der Zee, 2002; van der Zee *et al.*, 2008). Cette thérapie précise et non invasive est utilisée comme un adjuvant aux modalités de traitements tels que la chimiothérapie et la radiothérapie (Crezee *et al.*, 2016; Ohguri, 2016; Wust *et al.*, 2002). Elle permet de traiter différents types de cancer (du sein, de la peau, du cerveau, de la prostate, du col de l'utérus, etc.), y compris ceux qui sont métastatiques ou ont un faible taux de rémission [voir revues (Palazzi *et al.*, 2009; Toraya-Brown et Fiering, 2014; van der Zee, 2002)]. L'hyperthermie peut être administrée sur la zone tumorale ou sur l'ensemble de l'organisme (Huang *et al.*, 2016; Issels *et al.*, 2016; Seifert *et al.*, 2016; Wust *et al.*, 2002). Elle consiste de façon contrôlée, à l'élévation de la température au sein d'une région envahie de cellules cancéreuses [voir revues (Baronzio *et al.*, 2014; Palazzi *et al.*, 2009)]. Cette élévation peut être établie lors d'une exposition à des températures élevées provenant de radiations non ionisantes [voir revue (Palazzi *et al.*, 2009)].

L'hyperthermie a pour but d'atteindre toutes les cellules cancéreuses d'une tumeur, tout en limitant la cytotoxicité aux cellules saines. Elle s'applique par diverses méthodes sans la nécessité d'hospitalisation ou de soins médicaux subséquents (Kampinga et Dikomey, 2001; Mallory *et al.*, 2016). Dépendant de la localisation et de la profondeur de la tumeur, l'hyperthermie peut être superficielle ou régionale.

L'hyperthermie locale (HTL) est appliquée dans le cas de tumeurs sous-cutanées superficielles ou profondes, préférentiellement solides [voir revues (Bettaieb *et al.*, 2013; Wust *et al.*, 2002)]. La source d'énergie chauffante provient des ondes à haute fréquence (électromagnétiques ou ultrasoniques). Les sondes sont implantées dans la tumeur à partir d'un dispositif se trouvant à l'extérieur du corps. De ce fait, la chaleur est diffusée à l'intérieur de la tumeur sans avoir à atteindre les tissus sains environnants. Divers types de sondes stériles sont utilisés tels que des fils minces chauffants, des tubes remplis d'eau chaude, des antennes micro-ondes, des électrodes de radiofréquence ainsi que des ultrasons.

L'appareil est également pourvu d'un bolus d'eau afin d'éviter les brûlures superficielles. Il existe également l'hyperthermie interstitielle et endocavitaire utilisée pour les tumeurs qui ont un diamètre de moins de 5 cm et sont localisées par exemple, au niveau du cou, de la tête, de la prostate et du col de l'utérus [voir revue (Wust *et al.*, 2002)].

L'hyperthermie régionale (HTR) implique la perfusion chauffante à travers un organe et des cavités corporelles [voir revues (Bettaieb *et al.*, 2013; van der Zee, 2002)]. La perfusion péritonéale est proposée pour le cancer de la cavité péritonéale, de l'estomac et la perfusion régionale est utilisée pour les cancers affectant les jambes, les bras ou autres organes (ex : poumon) (Chicheł *et al.*, 2007; Rastrelli *et al.*, 2016; Zager, 2014). Utilisée aussi pour des tumeurs profondes (cancer du col de l'utérus, de la vessie), l'HTR est effectuée avec un applicateur de radiofréquence à multiples antennes. Par exemple, le BSD-2000 3D est un système appliqué en phase III clinique en adjacent à la radiothérapie pour les tumeurs pelviennes (Figure 1.1A) [voir revues (Baronzio *et al.*, 2014; Palazzi *et al.*, 2010; van der Zee *et al.*, 2000)]. Il distribue l'énergie en utilisant un réseau à plusieurs antennes qui entourent le corps du patient. Cet applicateur «Sigma-Eye» est composé de vingt-quatre paires d'antennes dipolaires, agencées en un anneau, autour du patient, permettant de maximiser la convergence de l'énergie au niveau de la région ciblée [voir revues (Owusu *et al.*, 2013; Wust *et al.*, 2002)]. Le sang du patient est constamment réchauffé sur une certaine période de temps tout en épargnant la peau. Lorsque l'HTR est combinée avec des agents cytotoxiques, une température plus faible est appliquée afin d'éviter de diminuer la toxicité des médicaments.

A.



B.



Figure 1.1. Images des dispositifs de l'hyperthermie. A. Le BSD-2000 3D est utilisé lors de l'hyperthermie régionale et est un appareil électromagnétique à 24 antennes dipolaires pour la diffusion de la chaleur. B. Le HECKEL HT-3000 est appliqué pour l'hyperthermie globale. Il est constitué de quatre émetteurs infrarouges filtrés à l'eau. Le patient est couché sur un lit régulier et est isolé par des couvertures qui forment une tente et gardent la chaleur à l'intérieur. Tirée de (Palazzi *et al.*, 2010) et de (Sulyok *et al.*, 2012).

Un cancer en propagation dans tout l'organisme nécessite l'hyperthermie globale (HTG) sous laquelle tout le corps du patient est exposé à une chaleur extérieure. Ces cancers métastatiques sont traités à des températures atteignant au maximum 42 °C [voir revues (Bettaieb *et al.*, 2013; Wust *et al.*, 2002)]. L'hyperthermie globale ne peut être réalisée qu'avec une analgésie profonde et une sédation ou une anesthésie générale uniquement pour les patients en bonnes conditions générales [voir revue (van der Zee, 2002)]. Une procédure standard pour l'application de la HTG implique le réchauffement du patient avec des rayonnements infrarouges. Un système utilisé de nos jours, est le HECKEL HT-3000 qui applique un rayonnement infrarouge filtré à l'eau et délivré vers la poitrine du patient par quatre émetteurs (Figure 1.1B) (Sulyok *et al.*, 2012). Les ondes infrarouges émises vont provoquer une augmentation importante du flux sanguin favorable par la suite, pour la circulation de médicaments chimiothérapeutiques. En effet, l'idéal est l'élévation de la chaleur sur des longues périodes de temps (3 à 6 h), tout en utilisant des agents cytotoxiques contre le cancer (Kraybill *et al.*, 2002; Schaaf *et al.*, 2014). Pour l'instant, l'HTG est souvent combinée avec des agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine et l'interféron- α afin de guérir des jeunes patients atteints d'un carcinome avancé de cellules rénales sans complications majeures (Bettaieb *et al.*, 2013; Bouhadjari *et al.*, 2016; Ismail-zade *et al.*, 2005).

L'avantage de l'application de l'hyperthermie est que cette thérapie entraîne peu d'effet secondaire pour les patients et présente un faible risque de rechute. Les effets secondaires provoqués par l'hyperthermie sont de faible importance en clinique : des cloques cutanées ou des lésions musculaires guérissant rapidement sont retrouvés chez 45% des patients et de graves brûlures apparaissent chez seulement 0,6% des patients (Twombly, 2010; van der Zee, 2002; van der Zee et van Rhoon, 2006; Wust *et al.*, 2002).

De nouvelles approches pour les applications hyperthermiques, comme le chauffage en liquide magnétique et l'induction de nanoparticules magnétiques chauffées et implantées au sein de la tumeur, sont étudiées et développées continuellement (Blanco-Andujar *et al.*, 2016; Kafrouni et Savadogo, 2016; Kossatz *et al.*, 2015). En outre, l'amélioration des techniques de l'hyperthermie utilisées présentement est en cours et est surtout concentrée sur une augmentation efficace de la chaleur dans les zones profondes des tumeurs internes.

1.2.2.1. Essais cliniques et limites de l'hyperthermie

L'hyperthermie présente un impact clinique très significatif. Pour les essais cliniques de phase I ou II, l'hyperthermie a démontré avoir un effet thérapeutique puissant contre plusieurs types de cancer tels que celui de la tête, du cou, du sein, du cerveau, de la vessie et du col de l'utérus. Pour le cancer du col utérin, le taux de contrôle local de la maladie, c'est-à-dire, le taux d'arrêt de la croissance tumorale sur le site d'origine du cancer et la survie globale des patients sur 3 ans, ont augmenté de 41% à 61% et de 27% à 51%, respectivement (van der Zee *et al.*, 2000). Une augmentation du taux local sur 5 ans a été de 24% à 69% pour les ganglions lymphatiques de tumeurs de tête et du cou. Pour le cancer de l'œsophage, la survie globale sur 3 ans a augmenté de 24% à 42% (Kampinga et Dikomey, 2001; van der Zee, 2002; van der Zee et van Rhoon, 2006).

Malgré les résultats positifs des essais cliniques, l'hyperthermie présente certaines limites (Bettaieb *et al.*, 2013; Peer *et al.*, 2010; Valdagni et Amichetti, 1994; van der Zee *et al.*, 2000). *In vivo*, les températures élevées sont plus difficiles à atteindre et une large région

de la tumeur ciblée semble être exposée à une plus basse température (40 à 41 °C) que prédite, diminuant les résultats toxiques attendus (Peer *et al.*, 2010). Pour l'instant, l'absence de données dosimétriques thermiques et rigoureuses en est le souci majeur. Lors du traitement hyperthermique, ce problème rend difficile le contrôle des températures au sein d'une tumeur. Le principe de base qui sous-tend la nécessité pour la dosimétrie thermique est la capacité à rédiger une ordonnance vérifiable pour l'hyperthermie (Jones *et al.*, 2005). En effet, en clinique l'obtention de températures nettement au-dessus de la température systémique de 37,5 °C dans un volume défini, est encore en développement. L'augmentation de température est provoquée par l'application d'un taux de densité de puissance spécifique d'absorption (SAR, mesuré en W / kg). Sachant que le taux métabolique basal humain est supérieur à 1 W / kg et que les taux de perfusion dans les tumeurs humaines sont autour de 5 à 15 ml par 100 g/min, une densité de puissance d'environ 20 à 40 W/kg au niveau de la région cible est requise pour atteindre au moins 42°C (Tilly *et al.*, 2001; Tilly *et al.*, 2005). De plus, lors du traitement, la dose thermique n'est pas distribuée équitablement dû à la variation des propriétés et du changement de flux sanguin dans les tissus tumoraux. Cette dose dépend de plusieurs paramètres comme la taille de la tumeur. Les conditions optimales qui permettent une distribution homogène de la chaleur n'ont pas encore été mises au point. Des techniques pour l'échauffement des tumeurs comme la résonance magnétique, menant avec précision, la distribution de la température en 3D de la tumeur, pourraient être utilisées comme solutions lors du traitement de l'hyperthermie en clinique.

Parmi les barrières que peut rencontrer le traitement par hyperthermie, on trouve le fait que les équipements disponibles pour chauffer les tumeurs sont coûteux, sont peu nombreux et seulement certains centres hospitaliers dans le monde en possèdent, comme les États-Unis, l'Europe, le Japon, l'Allemagne, l'Australie et la Belgique (Twombly, 2010). De plus, il y a peu de conscience publique au sujet des résultats prometteurs que ce traitement présente.

1.2.3. Hyperthermie associée aux traitements de cancer

En combinaison avec l'hyperthermie, les tumeurs ont une meilleure réponse de mort à la radiothérapie et la chimiothérapie, rendant ces dernières thérapies plus avantageuses (Issels *et al.*, 2016; Overgaard, 2013). L'hyperthermie mène à une augmentation substantielle des effets cytotoxiques et réduit le risque de transformation oncogénique (Bettaieb *et al.*, 2013; Issels, 2008; van der Zee, 2002). Ces combinaisons avec l'hyperthermie permettent une amélioration significative au niveau clinique sans avoir une accumulation d'effets secondaires (Datta *et al.*, 2015; Lutgens *et al.*, 2016). Plusieurs études récentes montrent que les traitements anticancéreux sont plus puissants en présence de températures élevées qui augmentent la perfusion sanguine et renforcent l'oxygénation au sein de la tumeur [voir revues (Bettaieb *et al.*, 2013; Datta *et al.*, 2015)].

1.2.3.1. Hyperthermie combinée à la radiothérapie

En combinant l'hyperthermie avec la radiothérapie pour le traitement de cancer, le taux d'amélioration du contrôle local de la tumeur ainsi que le taux de réponse étaient plus élevés que lors de l'application unique de la radiothérapie (Horsman et Overgaard, 2007; Overgaard, 2013). L'hyperthermie est considérée comme étant le radiosensibilisateur le plus puissant en plus du potentiel bénéfique de la radiothérapie (Horsman et Overgaard, 2007; Overgaard, 2013).

Ce traitement combiné cible les cellules en conditions d'hypoxie, appauvries d'oxygène et à faible pH, qui seraient en phase de réplication (phase S) de la division cellulaire (Bettaieb *et al.*, 2013). Généralement, les cellules qui répondent à ces critères sont les cellules cancéreuses présentes au centre de la tumeur et sont difficilement détruites par les rayons ionisants. Un certain choc thermique est alors appliqué comme additif lors du traitement par radiothérapie afin de tenter d'éliminer ces cellules tumorales radiorésistantes (Figure 1.2). En effet, l'hyperthermie conduit à une perturbation au niveau de

la réparation de l'ADN (Genet *et al.*, 2013). Une augmentation des aberrations chromosomiques induite par les radiations a été remarquée après l'utilisation de chocs thermiques, suggérant que des protéines nucléaires sont détruites en présence d'une chaleur élevée (plus de 43 °C) (Bergs *et al.*, 2016; Lepock, 2004). L'hyperthermie pourrait être à l'origine d'une inhibition spécifique par excision de base de la réparation de l'ADN et favoriserait l'accumulation d'ADN endommagé à l'intérieur du noyau (Genet *et al.*, 2013). Le choc thermique est ainsi un bon complément à la radiothérapie. Lorsque ces deux traitements sont réalisés simultanément, un ratio maximum d'amélioration thermique est observé. Des études *in vivo* ont montré une augmentation de l'effet de la radiothérapie par un facteur de 1,2 à 5 (Marino *et al.*, 1992; van der Zee, 2002). De plus, une augmentation de 31% à 61% du taux de réponses complètes a été observé en présence d'hyperthermie (Datta *et al.*, 2015; Lutgens *et al.*, 2016; van der Zee, 2002). Par exemple en Irlande, 83% de taux de contrôle local et 51% de survie globale sur 3 ans en combinant la radiothérapie et l'HTR ont été obtenus en comparant respectivement à 57% de taux de contrôle local et 27% de survie globale sur 3 ans avec la radiothérapie seule (Seifert *et al.*, 2016; van der Zee *et al.*, 2000). En combinant l'hyperthermie et la radiothérapie, une augmentation de 15% du taux de survie des patients atteints d'un cancer du col de l'utérus a été observée (Westermann *et al.*, 2005). De plus, l'hyperthermie pourrait réduire les doses de radiothérapie pouvant diminuer les effets secondaires (Hainfeld *et al.*, 2014).

1.2.3.2. Hyperthermie combinée à la chimiothérapie

L'hyperthermie permet une meilleure diffusion des médicaments au sein de la tumeur et permet aux agents chimiothérapeutiques de provoquer efficacement une cytotoxicité tumorale [voir revue (Bettaieb *et al.*, 2013)]. Lors de la chimiothérapie, le flux sanguin et l'oxygénation à l'intérieur de la cellule sont des facteurs importants pour un bon effet de la thérapie. Cependant, les cellules localisées au centre hypoxique des tumeurs reçoivent une petite dose d'agents chimiothérapeutiques de par leur faible vascularisation et ne seraient pas affectées par le traitement (Figure 1.2) (Bettaieb *et al.*, 2013). L'administration de l'hyperthermie engendre des dommages aux lipides responsables de l'intégrité et de la perméabilité membranaire, facilitant ainsi le passage des éléments de chimiothérapie à l'intérieur de la cellule cancéreuse (Issels, 2008; Owusu *et al.*, 2013). L'hyperthermie peut aussi induire une augmentation importante du flux sanguin et de la perméabilité vasculaire, augmentant le niveau de perfusion des vaisseaux dans la tumeur. Ainsi, elle accélère l'absorption cytotatique des agents chimiothérapeutiques dans les membranes cellulaires (Issels, 2008; Jain, 2005; Palazzi *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2005). De plus, une interaction synergique entre la chaleur et certains agents chimiothérapeutiques (ex : les agents alkylants, fluorouracile, taxanes, vinca-alcaloïdes et doxorubicine) a été observée et semble être efficace lorsque ces traitements sont appliqués simultanément (Issels, 2008; Wust *et al.*, 2002). Par conséquent, l'activité cytotoxique des agents anticancéreux sur une région spécifique de la tumeur est augmentée (facteur entre 1,2 à 10) et devient plus efficace sans être autant nuisible pour les tissus environnants (Palazzi *et al.*, 2009; Skibba *et al.*, 1982; Twombly, 2010; van der Zee, 2002). Cette combinaison permet donc de diminuer la dose de médicaments ainsi que la durée du traitement chimiothérapeutique.

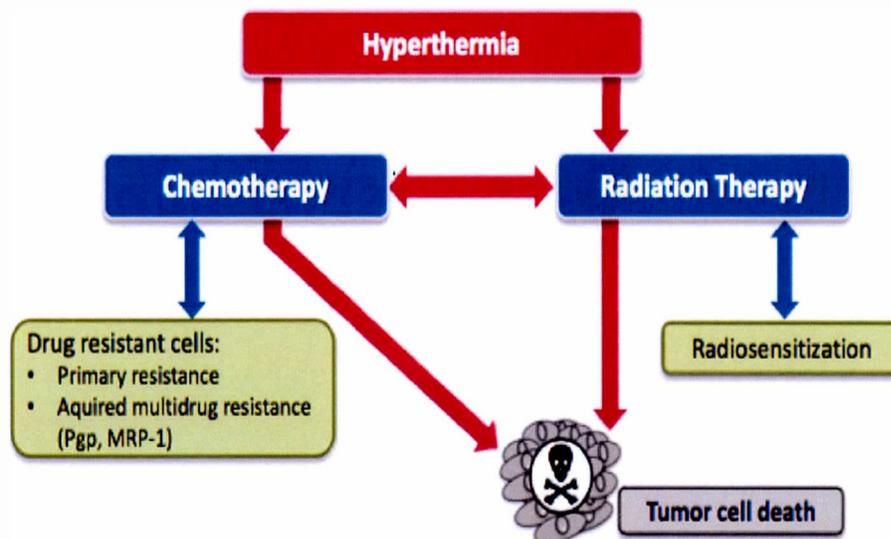


Figure 1.2. La combinaison de l'hyperthermie à la radiothérapie et chimiothérapie augmente le taux de mort des cellules tumorales. L'hyperthermie peut être administrée comme un prétraitement à la chimiothérapie ou la radiothérapie. L'hyperthermie élimine le risque de radiosensibilisation à la radiothérapie ainsi que le risque d'une résistance des cellules cancéreuses contre les agents chimiothérapeutiques. Il augmente l'effet cytotoxique dans la tumeur et entraîne la mort des cellules cancéreuses. Tirée de (Bettaieb *et al.*, 2013).

La raison qui explique plus de la moitié des échecs chimiothérapeutiques en clinique, est le développement d'une résistance chez les cellules cancéreuses. On parle du phénomène de résistance multidrogues (MRD) qui entraîne le rejet des médicaments ainsi que d'autres xénobiotiques impliqués dans la détoxification (Aller *et al.*, 2009; Ling, 1997). Cette résistance intrinsèque se développe lors de l'application d'agents anticancéreux comme les alcaloïdes de la vinca, les anthracyclines, les taxanes et l'épipodophyllotoxine ayant une action cytotoxique différente sur les cellules cancéreuses. Quelques protéines impliquées dans la résistance à la chimiothérapie sont les protéines à résistance multiple (MRP) dont la P-glycoprotéine (Pgp) (Bettaieb *et al.*, 2013; Ling, 1997). Cette dernière fait partie de la famille de protéines de transport ABC retrouvées à la membrane cellulaire. Une fois que l'agent anticancéreux pénètre la membrane cellulaire, Pgp étant surexprimée, agit comme une pompe transmembranaire, expulsant ce dernier à l'extérieur de la cellule (Aller *et al.*, 2009).

Dans ce cas, la quantité d'agent anticancéreux à l'intérieur de la cellule est diminuée et l'effet du traitement est affaibli. La multirésistance en clinique est un obstacle majeur à affronter afin d'améliorer l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques (Aouali *et al.*, 2005).

Il existe des agents chimiosensibilisants qui bloquent la fonction de la Pgp (Baird et Kaye, 2003; Bettaieb *et al.*, 2013). Lorsqu'ils sont combinés avec des agents chimiothérapeutiques, ils permettent leur accumulation à l'intérieur des cellules. Cependant, ces agents chimiosensibilisants ne sont efficaces qu'à de fortes doses toxiques. Ainsi, la combinaison de l'hyperthermie avec la chimiothérapie a été tentée. L'hyperthermie est susceptible d'inverser la résistance des tumeurs aux agents chimiothérapeutiques et de renforcer leur cytotoxicité (Figure 1.2) (Bettaieb *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2012)]. De plus, les cellules MDR ne développent pas toujours de résistance à la chaleur (Souslova et Averill-Bates, 2004). En effet, l'hyperthermie a entraîné les mêmes effets cytotoxiques et apoptotiques dans les cellules ovariennes cancéreuses (CHO) normales versus celles qui expriment la Pgp à la surface (Wrzal *et al.*, 2008). Ainsi, l'hyperthermie serait utile pour la destruction des cellules cancéreuses résistantes au traitement par la chimiothérapie [voir revue (Bettaieb *et al.*, 2013)].

1.2.4. Effets moléculaires et biochimiques de l'hyperthermie

Les chocs thermiques provoquent des changements moléculaires et biochimiques au niveau des cellules, qu'elles soient cancéreuses ou non. En effet, suite à l'exposition à l'hyperthermie, les protéines intracellulaires et les lipides sont premièrement ciblés (Figure 1.3) [voir revue (Bettaieb *et al.*, 2013)]. Les protéines subissent des modifications post-traductionnelles dont la glycosylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. Ces altérations entraînent une oxydation et une agrégation des protéines, qui finissent par se dénaturer. La déstabilisation des protéines affecte plusieurs interactions et mécanismes dans une cellule comme, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la perméabilité de la membrane, conduisant ainsi à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Baronzio; *et al.*, 2014; Bettaieb *et al.*, 2013; Issels, 2008; Richter *et al.*, 2010; Sakaguchi *et al.*, 1995). En

effet, en réponse à des températures élevées, des lésions à l'ADN ont lieu et les protéines nucléaires ne sont plus fonctionnelles (Bettaieb *et al.*, 2013; Sugahara *et al.*, 2008). L'endommagement irréversible de ces protéines empêche la réparation et la transcription de l'ADN, menant alors à une fragmentation nucléaire définitive. De plus, suite à la chaleur, les protéines impliquées dans le cycle cellulaire (la mitose) sont dénaturées. Un arrêt du cycle au stade G1 est alors imposé (Figure 1.3), déstabilisant le centrosome. Une catastrophe mitotique a alors lieu, empêchant la réplication et la prolifération cellulaire (Bettaieb *et al.*, 2013; Nakahata *et al.*, 2002; Owusu *et al.*, 2013). Au niveau de la membrane, les mécanismes de signalisation cellulaire sont altérés par dysfonctionnement des récepteurs et des protéines de transport membranaire par les chocs thermiques (Baronzio; *et al.*, 2014). La perméabilité membranaire est altérée (Figure 1.3), permettant à plusieurs composants organiques de pénétrer à l'intérieur de la cellule. Le cytoplasme et les organelles sont excessivement endommagés et la cellule subit un changement morphologique dû à la perte de protéines structurales (Lepock, 2004).

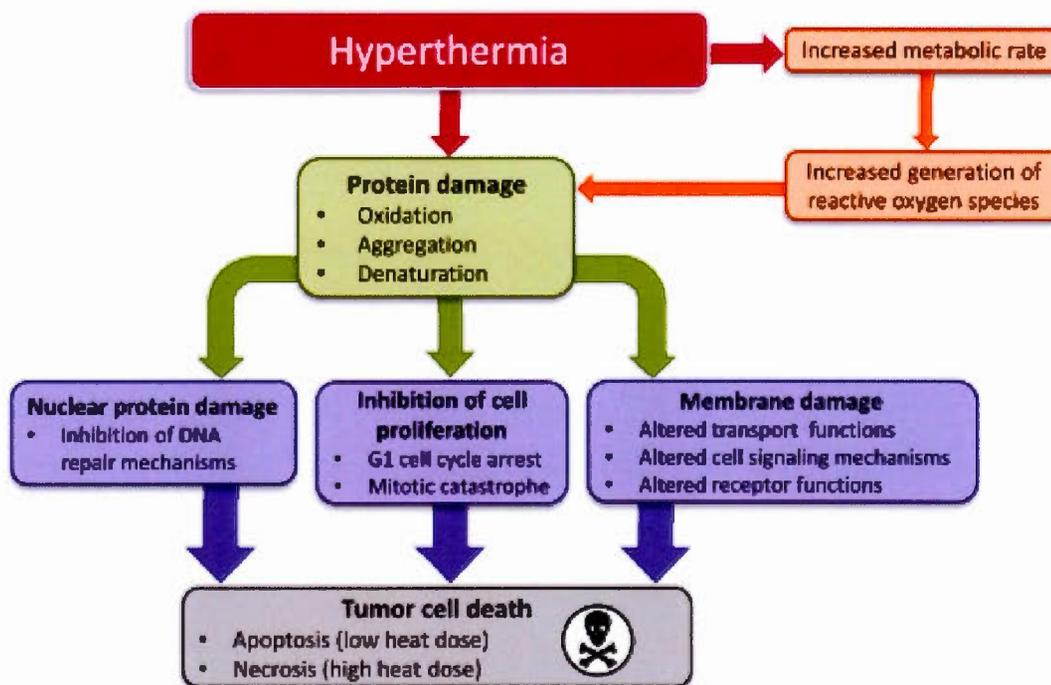


Figure 1.3. Mode d'action de l'hyperthermie au niveau cellulaire. L'hyperthermie est à la base de la détérioration des protéines intracellulaires. Elle provoque des changements brutaux au niveau de plusieurs processus importants pour la croissance et la prolifération d'une cellule cancéreuse. Ces dommages mènent à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose, dépendant de la dose de chaleur appliquée. Tirée de (Bettaieb *et al.*, 2013).

L'élévation de température conduit également, à une hausse de métabolisme cellulaire (Figure 1.3). De ce fait, une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont font partie le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) et le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) cause un stress oxydatif qui va conduire à l'activation des mécanismes de mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Bettaieb *et al.*, 2013; Palapati et Averill-Bates, 2011a; Sugahara *et al.*, 2008).

L'hyperthermie peut éliminer les cellules cancéreuses sans engendrer de dommages majeurs aux tissus sains adjacents puisque la source de chaleur peut cibler assez spécifiquement la tumeur [voir revues (Bettaieb *et al.*, 2013; van der Zee, 2002)]. En effet, le centre des tumeurs malignes présente un environnement hypoxique à niveau élevé d'acidité, privé de nutriment, qui n'est pas retrouvé dans les tissus sains (Issels, 2008; van der Zee, 2002). Au sein de ces zones tumorales peu perfusées, le système de vascularisation est chaotique et le pH est abaissé dû à l'incapacité d'éliminer les métabolites anaérobies dans le sang (Hegyí *et al.*, 2013; Wust *et al.*, 2002). La chaleur va persister dans les zones hypoxiques tumorales parce que la perfusion sanguine ainsi que l'apport d'oxygène et de nutriments sont diminués ; alors que dans les tissus sains, la chaleur est dissipée avec la circulation du sang (Sugahara *et al.*, 2008; Vaupel *et al.*, 1989). De plus, la sensibilité des cellules à la chaleur dépend de la phase du cycle cellulaire. Les cellules cancéreuses sont majoritairement en phase de réplication (S) et de mitose (M) du cycle cellulaire, nécessitant beaucoup de protéines nucléaires (par exemple les kinases cycline-dépendantes et p53). Ainsi, elles sont davantage vulnérables lorsqu'elles sont exposées aux chocs thermiques. Dans ces conditions, les cellules tumorales deviennent plus sensibles au stress thermique que les cellules dans les tissus sains (Bettaieb *et al.*, 2013; Issels, 2006). En résumé, l'hyperthermie exerce une action cytotoxique directe et conduit à la destruction des cellules cancéreuses au niveau des régions acides et d'hypoxie (Issels, 2008). En outre, lors de l'application de l'hyperthermie, la chaleur subie par les tissus environnants sains est un bénéfice. En effet, une température modérée (39 à 41 °C) peut renforcer le système immunitaire protégeant ainsi les cellules contre une croissance tumorale (Tableau 1.1) (Hegyí *et al.*, 2013; Peer *et al.*, 2010).

1.2.5. Thermotolérance

Lors de l'application de l'hyperthermie au niveau clinique, il est important de noter que la distribution de la température dans une tumeur est hétérogène, surtout chez les tumeurs en profondeur (Sugahara *et al.*, 2008). En effet, dans certaines régions de la tumeur, la température atteinte est supérieure à d'autres régions, provoquant différentes réponses chez les cellules cancéreuses (Tableau 1.1). Par conséquent, certaines cellules vont être exposées à des doses de chaleur létales (42 à 45 °C) alors que d'autres vont subir une température plus faible (39 à 41,5 °C), développant un phénomène nommé thermotolérance.

La thermotolérance est une réponse de survie adaptative qui apparaît précisément suite à l'exposition de cellules soit à des températures sublétales (39 à 41 °C) sur une longue période de temps (3 à 24 h) (thermotolérance modérée), soit à des températures létales telles que 42 °C à 45 °C sur une durée plus courte (10 à 30 min) (thermotolérance forte) (Singh et Hasday, 2013). La thermotolérance reste relativement mal explorée alors que son étude est essentielle, puisqu'elle correspond à la gamme de températures physiologiques correspondant aux fièvres qui sont fréquentes chez des patients sous traitement anticancéreux.

La thermotolérance active des réponses au stress qui entraînent de multiples changements biochimiques et moléculaires chez la cellule. En effet, sous l'influence de la thermotolérance, le niveau d'ERO est augmenté et plusieurs éléments de défense sont stimulés (Tableau 1.1) : les protéines de choc thermique (Hsp), les molécules de défense antioxydantes comme le manganèse superoxyde dismutase (MnSOD), la catalase (CAT), la glutamate-cystéine ligase (GCL) et le glutathion (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Glory et Averill-Bates, 2016; Palapati et Averill-Bates, 2011b). La thermotolérance influence également la régulation de l'expression des gènes codants pour différentes protéines telles que les facteurs de transcription tels que les protéines de choc thermique (Glory et Averill-Bates, 2016), les enzymes utiles pour l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Bettaieb *et al.*, 2013).

Tableau 1.1 Différences des effets entre l'hyperthermie et de la thermotolérance sur les cellules cancéreuses.

		Hyperthermie (42-45 °C)	Thermotolérance (39,5-41,5 °C)
Effets	Cytotoxiques	Arrêt de la croissance cellulaire	Expression des protéines de défenses
	Vasculaires	Diminution de la circulation sanguine	Augmentation de la circulation sanguine
	Immuns	Réprimés	Renforcés
	Par combinaison	Sensibilisation aux traitements anticancéreux	Résistance aux traitements anticancéreux

La réponse au stress due à la thermotolérance est liée à la synthèse et l'accumulation de cinq classes majeures de protéines de choc thermique : Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp104 et Hsp27 (Jego *et al.*, 2013; Sreedhar et Csermely, 2004). Conservés chez tous les organismes, les gènes codants pour ces Hsp sont régulés par le facteur de transcription « Heat shock factor protein 1 » (HSF-1), et son interaction avec l'élément de choc thermique (HSE), activés lors d'un stress (Naidu *et al.*, 2016). Les Hsp sont capables de s'associer aux protéines mal repliées et les conduire à leur dégradation par le protéasome. Ainsi, cette fonction de chaperon moléculaire diminue la formation d'agrégats protéiques insolubles, maintenant alors l'homéostasie et la prolifération cellulaire. La chaleur peut sur-réguler transitoirement l'expression de ces gènes qui permettra une cytoprotection contre un stress subséquent (Ritossa, 1996; Sugahara *et al.*, 2008). En effet, les Hsp suscitent la résistance cellulaire envers l'apoptose induite par les chocs thermiques létaux ainsi que d'autres formes de stress, comme le stress oxydatif et la radiation (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Bettaieb *et al.*, 2013; Palapati et Averill-Bates, 2010, 2011b).

La thermotolérance va permettre aux cellules de continuer à fonctionner normalement malgré un stress extrême et une agression toxique (Martindale et Holbrook, 2002). Ainsi, l'exposition des cellules à des températures modérées (39 °C à 41,5 °C) établie une certaine tolérance envers une variété de contraintes ultérieures, par exemple le stress thermique ou oxydatif, la présence d'agents chimiothérapeutiques (Tableau 1.1), les radiations et les stress environnementaux. Par conséquent, les cellules thermotolérantes développent une résistance à des doses normalement toxiques et létales (Tableau 1.1). Elles vont réussir à survivre jusqu'au rétablissement de la cellule après l'arrêt du stress. Au sein des cellules cancéreuses, la thermorésistance est transitoire, observée sur 24 à 48 h, n'affectant donc pas le traitement thermique en clinique, qui s'échelonne souvent sur des intervalles de temps (Wust *et al.*, 2002).

Les caractéristiques de la thermotolérance permettent aux cellules cancéreuses de résister à l'exposition aux chocs thermiques forts qui induit l'apoptose (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015; Bettaieb et Averill-Bates, 2005). En effet, les Hsp activées lors de la thermotolérance régulent les voies principales de l'apoptose en agissant comme des chaperonnes moléculaires ou en empêchant directement l'apoptose (ex : elles inhibent l'activation des caspases-3, -8 et -9). Cependant, tous les mécanismes impliqués dans la réponse adaptative des cellules lors de la thermotolérance ne sont pas entièrement abordés, d'où la nécessité d'étudier en profondeur ses notions.

1.3. Apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire génétiquement programmé qui permet à la cellule de s'autodétruire. Découverte par John Kerr, l'apoptose est très étudiée de nos jours (Kerr *et al.*, 1972). Elle est retrouvée dans les organismes pluricellulaires et assure l'élimination des cellules endommagées, infectées, redondantes ou contenant de graves lésions génétiques, pouvant altérer le fonctionnement normal de l'organisme [voir revues (Pallepati et Averill-Bates, 2012; Portt *et al.*, 2011)]. De plus, l'apoptose est importante dans divers phénomènes physiologiques tels que la morphogénèse, le développement embryonnaire, la différenciation, le remodelage ainsi que l'homéostasie cellulaire et tissulaire (Portt *et al.*, 2011). Étant également un processus hautement conservé et régulé, sa perturbation est observée dans plusieurs pathologies humaines comme la neurodégénération, les désordres auto-immuns et le cancer (Fulda *et al.*, 2010; Labbe et Saleh, 2008; Portt *et al.*, 2011; Zhivotovsky et Orrenius, 2010).

L'apoptose est un mode ubiquitaire de mort cellulaire qui se caractérise par une série d'événements biochimiques particuliers, conduisant à des changements de la morphologie cellulaire : modification de la membrane plasmique, perte de l'asymétrie membranaire, fragmentation de l'ADN, condensation de la chromatine nucléaire, dégradation du cytosquelette, rétrécissement et bourgeonnement de la cellule en des vésicules nommées corps apoptotiques (Figure 1.4) (Kerr *et al.*, 1972; Mondal et Dutta, 2014). Ces derniers contiennent un cytoplasme, un fragment de noyau ainsi que des organelles empaquetées et intactes, entourés d'une bicouche lipidique (Elmore, 2007). Sur leur membrane externe, les corps apoptotiques présentent des ligands tels que les phosphatidylsérines qui sont reconnues par les cellules phagocytaires. Une fois formés, les corps apoptotiques sont ainsi rapidement éliminés et dégradés en étant phagocytés par les cellules du système immunitaire (ex : les macrophages) (Elmore, 2007; Pallepati et Averill-Bates, 2012). Contrairement à la nécrose, l'apoptose ne déclenche aucune réaction inflammatoire. Les constituants intracellulaires des cellules en apoptose ne sont pas abandonnés dans l'environnement. Ainsi l'apoptose n'interfère pas avec les cellules adjacentes (Elmore, 2007; Pallepati et Averill-Bates, 2012).

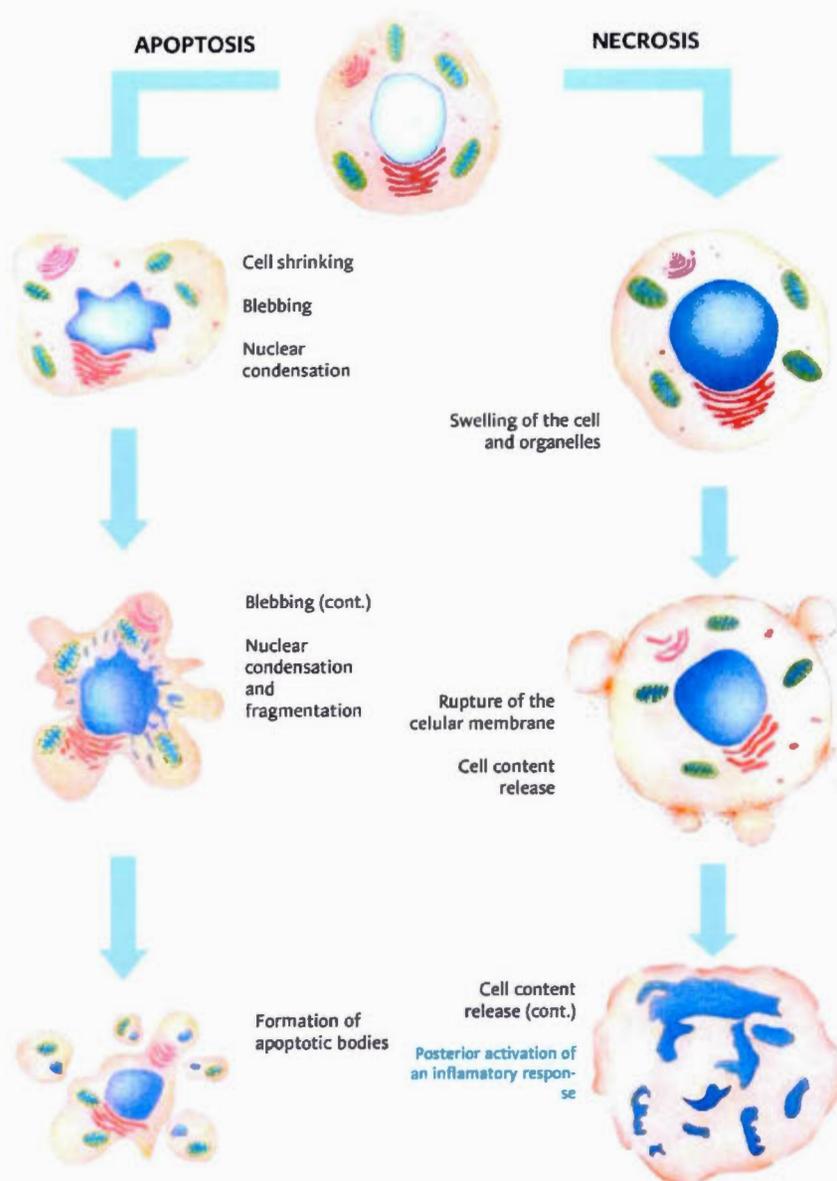


Figure 1.4. Processus morphologiques d'une cellule en apoptose ou en nécrose. L'apoptose est caractérisée par le rétrécissement de la cellule, la condensation et la fragmentation du noyau, formant des corps apoptotiques qui sont ensuite digérés par des phagocytes. La nécrose procède à la rupture de la membrane plasmique qui provoque le déversement des constituants intracellulaires vers le milieu extérieur de la cellule. Ces composés peuvent endommager les cellules environnantes et promouvoir une réponse inflammatoire. Tirée de (Monteiro *et al.*, 2015).

L'apoptose peut être induite par des voies extrinsèques ou intrinsèques en réponse à une variété de stimuli physiologiques et pathologiques comme l'absence de facteurs de croissance, la lumière UV, les radiations ionisantes, le choc thermique, le stress oxydatif, le manque de nutriments et les produits chimiques (médicaments chimiothérapeutiques et pesticides) (Negroni *et al.*, 2015; Sprick et Walczak, 2004). La voie extrinsèque, aussi appelée voie des récepteurs de mort, implique des récepteurs de la famille de facteur de nécrose tumorale (TNFR) (Portt *et al.*, 2011). L'induction de l'apoptose peut également se faire par la voie intrinsèque mitochondriale ou la voie intrinsèque du réticulum endoplasmique (ER).

1.3.1. Mécanismes de régulation de l'apoptose

La majorité des voies de l'apoptose implique l'activation de « cystéine-dépendent, aspartate-spécifique peptidases » (caspases) qui constituent une famille de protéases apoptogènes avec une cystéine au site catalytique (Shalini *et al.*, 2015). Ces enzymes sont synthétisées dans le cytosol de façon constitutive sous forme de précurseurs inactifs, les zymogènes (pro-caspases). Elles contiennent un pro-domaine à l'extrémité amine et un domaine protéase à l'extrémité carboxyle (Creagh, 2014). La pro-caspase est activée par l'hydrolyse d'une chaîne polypeptidique au niveau d'un résidu aspartate de l'extrémité carboxyle (Creagh, 2014). Suite au clivage protéolytique, le pro-domaine est éliminé et le domaine à l'extrémité carboxyle va construire un dimère avec la partie restante, formant une caspase active, à deux sous-unités (SU) (Green et Llambi, 2015; Shi, 2002). À son tour, la caspase activée clive une pro-caspase, engendrant une cascade de protéases actives, une amplification des voies de signalisation de l'apoptose et enfin la mort rapide de la cellule.

Plus d'une dizaine des caspases majeures ont été découvertes. Elles sont divisées en trois catégories : les caspases initiateuses (caspases-2, -8, -9 et -10) avec un long pro-domaine, les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7) et les caspases dites inflammatoires (caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14) (Rai *et al.*, 2005; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Certaines caspases agissent à la fois dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose telle que la

caspase-2 ou dans l'inflammation et l'exécution comme les caspases-4 et -12 (Pallepati et Averill-Bates, 2012; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016; Wyllie, 2010).

Les caspases jouent un rôle essentiel dans la dégradation des protéines du cytosquelette et de la réparation de l'ADN (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Elles conduisent aux changements morphologiques de la cellule en apoptose. En effet, les caspases ciblent certaines protéines structurales (ex : lamine A, gelsoline, cytokératine et filament d'actine) au niveau de l'acide aspartique qui aboutit à une perte de la forme cellulaire (Figure 1.5) (Crawford et Wells, 2011). La caspase-3 active l'endonucléase ADNase activée par les caspases (CAD) en clivant son inhibiteur, l'initiateur de l'ADNase activée par les caspases (ICAD), permettant ainsi à CAD de dégrader l'ADN (Green et Llambi, 2015). Elle clive également l'enzyme de réparation de l'ADN poly-(ADP-ribose)-polymérase (PARP) (Figure 1.5) (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Ainsi la caspase-3 est nécessaire au processus d'apoptose menant à la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et à la formation des corps apoptotiques. Également, les caspases clivent et activent les kinases pro-apoptiques comme le « Rho-associated kinase I » (ROCK I), la kinase 2 activée par p21 (PAK2) et la « Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 » (MEKK1) qui sont nécessaires pour le bourgeonnement de la membrane (Green et Llambi, 2015; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016).

Cependant, l'activation des caspases ne confirme pas nécessairement l'induction de l'apoptose ; elles peuvent être activées pour un phénomène inflammatoire. Ainsi, d'autres éléments de l'apoptose peuvent être détectés et étudiés. Par exemple, les phosphatidylsérines, qui sont normalement des protéines intramembranaires, se retrouvent exposées sur la surface externe de la membrane plasmique lors de l'apoptose (Figure 1.5) (Segawa *et al.*, 2014). Elles peuvent être reconnues par des sondes fluorescentes telles que l'annexine V-FITC.

Le déclenchement de l'apoptose peut se faire par l'intermédiaire de trois voies principales de l'apoptose : la voie des récepteurs de morts, la voie mitochondriale et la voie du réticulum endoplasmique. Ces voies signalétiques sont médiées par l'activation de caspases et convergent au niveau de la caspase-3 pour la phase d'exécution de l'apoptose (Igney et Krammer, 2002).

1.3.1.1. Induction de l'apoptose par la voie extrinsèque

La voie extrinsèque a lieu via des interactions transmembranaires entre des signaux extérieurs et des récepteurs de signalisation pro-apoptotiques (Portt *et al.*, 2011; Sprick et Walczak, 2004). Elle est médiée par l'activation des récepteurs de la famille TNFR, notamment Fas (APO1/CD95), TNFR-1 (p55/CD120a) et « TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand » (TRAIL-R, TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5) (Figure 1.5) (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Ces récepteurs de mort transmembranaires possèdent au niveau de l'extrémité carboxyle, un domaine intracellulaire nommé domaine de mort (DD) qui permet de transmettre le message à la voie de signalisation intracellulaire (Mondal et Dutta, 2014; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). L'activation des différents récepteurs TNFR se fait grâce à la formation de trimère avec les ligands appropriés (TNF- α , FasL et/ou TRAIL) qui sont des cytokines spécifiques à la superfamille de TNFR (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Ces ligands peuvent provenir de la cellule cible ou d'une cellule adjacente. Une fois liés aux ligands, les TNFR oligomérisés recrutent une protéine adaptatrice cytoplasmique qui lie le domaine de mort. La protéine adaptatrice « Domaine de mort associé à la protéine Fas » (FADD) est recrutée lorsque les ligands FasL interagissent avec le récepteur Fas alors que les protéines adaptatrices « Domaine de mort associé au TNF-R » (TRADD), FADD et les protéines interagissant avec les récepteurs (RIP) sont recrutées lorsque les ligands TNF- α se lient au récepteur TNFR-1. Les récepteurs TRAIL-R interagissent avec les ligands TRAIL et entraînent une voie apoptotique similaire à celle déclenchée par les récepteurs Fas (Pennarun *et al.*, 2010). Ensuite, selon le type cellulaire, FADD mène au recrutement des pro-caspases-8 ou -10 par son domaine effecteur de mort (DED) à l'extrémité amine. Le complexe de signalisation induisant la mort (DISC) est alors formé (Savitskaya et Onishchenko, 2015). Les pro-caspases-8 ou -10 vont homodimériser et s'auto-cliver pour adopter la forme d'une caspase activée. Par la suite, ces caspases initiales déclenchent la phase exécutive de l'apoptose, qui implique une cascade d'activation de plusieurs caspases effectrices, notamment la caspase-3. Cependant, la voie des récepteurs de mort peut être inhibée par une forte concentration de la protéine « FLICE-like » (c-FLIP). Cette protéine contient deux DED et intervient dans la fixation de la caspase-8 avec FADD. Dans ce cas, la mort cellulaire par apoptose n'est pas déclenchée et la cellule survie (Kantari et Walczak, 2011).

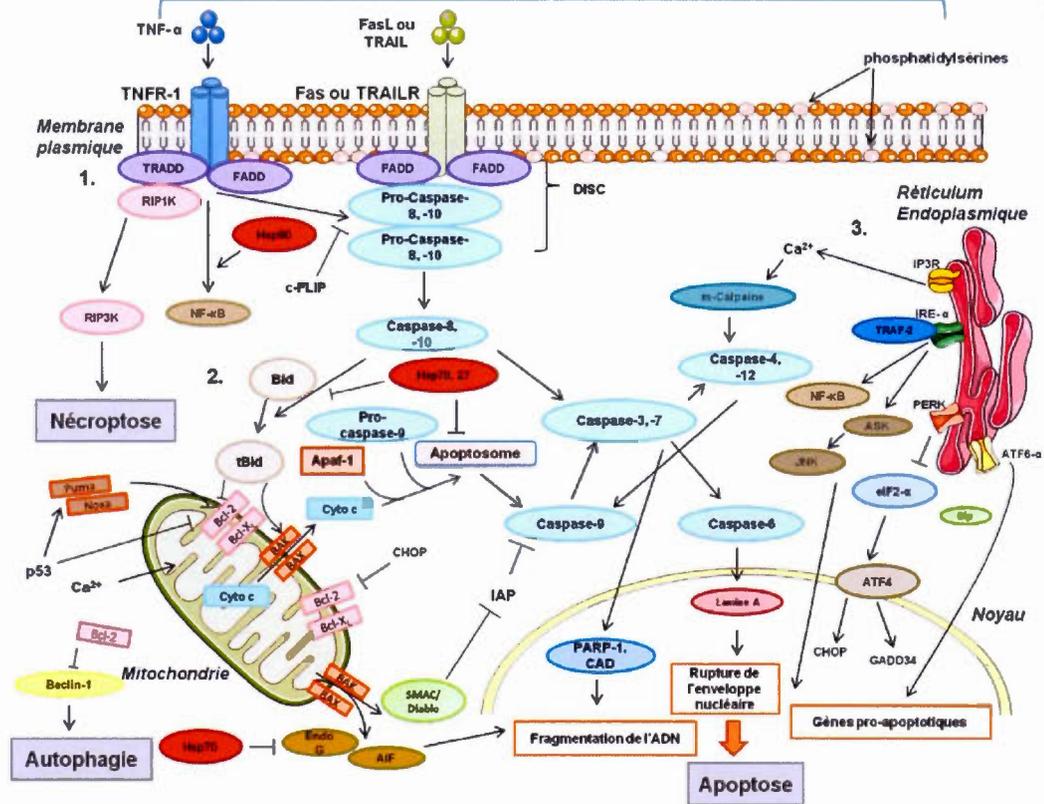


Figure 15. Mécanismes d'activation de l'apoptose par la voie extrinsèque et les voies intrinsèques. La cellule déclenche l'apoptose en réponse à un stress provenant de divers facteurs environnementaux tels que le choc thermique et l'augmentation des ERO. L'apoptose est caractérisée par l'activation des caspases au sein de trois voies : 1. La voie extrinsèque implique l'interaction des ligands avec le récepteur approprié (TNF- α /TNFR-1 ; FasL/Fas ; TRAIL/TRAILR), entraînant le recrutement et l'activation de la caspase-8 ou -10. À leur tour, ces caspases initiatrices activent, par clivage, soit les caspases effectrices soit le facteur pro-apoptotique Bid en tBid qui déclenche la voie mitochondriale. 2. La voie intrinsèque mitochondriale est régulée par la famille de protéines Bcl-2. Suite à leur activation, les protéines Bcl-2 pro-apoptotiques (Bax et Bak, Puma et Noxa) perturbent la membrane mitochondriale. Ceci provoque la libération de deux protéines: le SMAC/Diablo qui empêche l'action inhibitrice des IAPs et le cytochrome c qui forme l'apoptosome. Elles activent la caspase-9 qui active la caspase-3. Cette dernière clive les protéines structurales (ex : lamine A). EndoG et AIF sont également des facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie qui clivent l'ADN et entraînent l'apoptose indépendamment des caspases. 3. La voie intrinsèque du RE relâche le Ca²⁺ dans le cytosol, stimulant l'apoptose par la mitochondrie et activant la caspase-4/12 par l'intermédiaire de la calpaïne. IRE-1 α et CHOP inhibent Bcl-2 au niveau du RE et de la mitochondrie, respectivement. IRE-1 α se lie à TRAF-2 et active ASK-1 et JNK. L'activation des facteurs pro-apoptotiques est régulée par les Hsp telles que Hsp27, 70, 72, et 90, au niveau des trois voies de l'apoptose. Bcl-2 inactive Beclin-1 et empêche l'induction de l'autophagie et active l'apoptose. L'inhibition de la caspase-8 par c-FLIP provoque l'activation du facteur de transcription NF- κ B et le déclenchement de la nécroptose, une autre forme de mort cellulaire programmée qui dépend de l'activation des kinases RIP (1 et 3) mais conduit à une réponse inflammatoire.

1.3.1.1. Induction de l'apoptose par la voie intrinsèque mitochondriale

L'induction de l'apoptose se fait également par la voie intrinsèque mitochondriale. Cette voie de signalisation, régulée par la mitochondrie, permet également d'initier ou d'amplifier le mécanisme d'activation des caspases. Son induction implique la présence de stimuli provenant d'un stress génétique ou métabolique (hypoxie, hyperthermie, infection virale, toxine, stress oxydatif, etc.) (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Ola *et al.*, 2011; Pallepati et Averill-Bates, 2010). Les stimuli engendrent des signaux intracellulaires qui agissent directement à l'intérieur de la cellule. Ils vont altérer la membrane mitochondriale, conduisant à la diminution du potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) (Mercié et Belloc, 2001). La perméabilité interne est augmentée et permet la diffusion de molécules de moins de 1,5 kDa, augmentant la pression osmotique au sein de la matrice mitochondriale. Cette pression cause alors l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (PTP) et engendre la libération du cytochrome c ainsi que d'autres protéines pro-apoptotiques, dans le cytosol (Halestrap, 2009; Mayer et Oberbauer, 2003; Orrenius *et al.*, 2015). Le cytochrome c va se lier au facteur activateur de l'apoptose 1 (Apaf-1), au dATP et au domaine de recrutement et d'activation des caspases (CARD) de la pro-caspase-9, formant l'apoptosome (Figure 1.5) (Gupta *et al.*, 2009; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Ce complexe permet le réarrangement et l'auto-clivage de la pro-caspase-9 qui active la caspase-9. Ensuite, la caspase-9 se dissocie, clive et active à son tour les caspases effectrices. La caspase-3 est activée par les caspases-8, -9 et -10 et représente un point de convergence des voies extrinsèque et intrinsèque, déclenchant des changements dans la morphologie cellulaire.

La voie mitochondriale est contrôlée par les protéines membres de la famille Bcl-2, particulièrement au niveau du PTP de la mitochondrie. Un changement dans l'équilibre dynamique de ces protéines mène à l'inhibition ou à l'induction de la mort cellulaire (Glory *et al.*, 2014; Ola *et al.*, 2011). La famille de Bcl-2 est composée de protéines pro-apoptotiques à multidomains telles que la protéine X associée à Bcl-2 (Bax) et la protéine tueuse antagoniste homologue de Bcl-2 (Bak) et des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, la protéine ressemblant à Bcl-2 1 (Bcl-X_L), la protéine ressemblant à Bcl-2 2 (Bcl-w) et

la « Myeloid cell leukemia-1 » (Mcl-1). Cette famille contient également des protéines à un seul domaine d'homologie aux protéines Bcl-2 3 (BH3) telles que Bid, Bim, Puma, Noxa (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Tous les membres de la famille de Bcl-2 possèdent au moins un domaine BH3 nécessaires pour leur fonction. Les protéines anti-apoptotiques sont toutes composées de quatre domaines BH. Elles sont généralement localisées au niveau du réticulum endoplasmique ou de la membrane externe de la mitochondrie et lient les protéines pro-apoptotiques afin de les séquestrer et de les rendre inactives (Ola *et al.*, 2011). Dans les cellules cancéreuses, Bcl-2 et Bcl-X_L sont surexprimées et exercent leur effet anti-apoptotique en se liant en partie aux protéines Bax et Bak (Ola *et al.*, 2011).

La voie de signalisation extrinsèque peut rejoindre la voie intrinsèque. En effet, lorsque la formation du DISC est insuffisante, caspase-8 peut cliver l'agoniste des domaines de mort interagissant avec BH3 (Bid) en Bid tronqué (tBid), menant à sa translocation vers la mitochondrie (Figure 1.5) (Portt *et al.*, 2011). Ensuite tBid interagit avec Bax et Bak, les libérant de leur interaction avec Bcl-2 ou Bcl-X_L. Ces protéines pro-apoptotiques vont oligomériser et former des canaux hétérotétramiques à travers la membrane de la mitochondrie entraînant la perméabilisation membranaire. Ceci induit la sortie du cytochrome c ainsi que d'autres protéines pro-apoptotiques, dans le cytosol (Figure 1.5) (Orrenius *et al.*, 2015). Ces dernières sont telles que les «Second Mitochondrial derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with a Low pI» (Smac/Diablo) et les protéases sérines OMI/HtrA2 (Figure 1.5). Elles arrêtent l'action inhibitrice des inhibiteurs des protéines de l'apoptose (IAP) et permettent l'activation de la caspase-9. En outre, un autre groupe de facteurs apoptogéniques incluant le facteur inducteur de l'apoptose (AIF), l'endonucléase G (EndoG) et la CAD sont également relâchés dans le cytosol (Orrenius *et al.*, 2015). Une fois activées, ces facteurs se dirigent vers le noyau, favorisant la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine indépendamment des caspases (Orrenius *et al.*, 2015; Savitskaya et Onishchenko, 2015).

En réponse à un stress cellulaire, il existe aussi une voie intrinsèque du réticulum endoplasmique qui est moins connue. Elle peut agir en coopération avec la voie mitochondriale au niveau de la caspase-9.

1.3.1.2. Induction de l'apoptose par la voie intrinsèque du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est responsable de la maturation de divers protéines et du stockage du calcium (Wang et Kaufman, 2016). Lors de leur synthèse, les protéines pénètrent au sein de la lumière du RE dans laquelle, elles adoptent une structure secondaire et peuvent former un complexe multiprotéique. Ainsi, un système de contrôle de qualité est retrouvé dans ce compartiment. Il implique les protéines chaperonnes qui reconnaissent les protéines mal repliées et leur attribue une structure fonctionnelle (Savitskaya et Onishchenko, 2015). Certaines protéines ayant une conformation anormale sont dirigées vers le cytoplasme par le « Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation » (ERAD) où elles sont ubiquitinylées et dégradées par le protéasome 26S.

Le processus de repliement peut être défectueux et entraîner l'accumulation de protéines mal repliées. Ceci provoque un stress du RE qui peut induire la voie de réponse aux protéines non repliées, « Unfolded Protein Response » (UPR). Cette réponse a pour objectif le rétablissement ou l'élimination des protéines non repliées et donc la restauration de l'homéostasie du RE (Pallepati et Averill-Bates, 2012). L'UPR provoque plusieurs mécanismes à l'intérieur de la cellule. L'afflux de nouvelles protéines dans le RE est empêché par l'inhibition de la traduction, diminuant l'agrégation des protéines. L'activation des chaperonnes (Bip/GRP78 et GRP94) et de la voie de dégradation ERAD est augmentée (Cao et Kaufman, 2012; Savitskaya et Onishchenko, 2015). La protéine Bip/GRP78 est une protéine de 78 kDa régulée par le glucose. Elle favorise le repliement des protéines et évite leur agrégation. Elle peut s'associer à des protéines transmembranaires qui sont des capteurs du stress du RE tels que « Inositol Requiring enzyme 1 α » (IRE-1 α), « Protein kinase RNA (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase » (PERK) et « Activating Transcription Factor 6- α » (ATF6- α). En condition normale, BiP/GRP78 maintient ces capteurs sous forme inactive (Walter et Ron, 2011) alors qu'en stress modéré du RE, BiP/GRP78 reconnaît les protéines mal repliées, se dissocie de ces capteurs et déclenche l'UPR.

Lorsque le stress est rigoureux ou sur une longue durée, la réponse adaptative de l'UPR devient insuffisante et la mort cellulaire par apoptose est induite. Le domaine kinase du IRE-1 α lie la protéine adaptatrice 2 associée au récepteur TNF (TRAF-2) et le phosphoryle (Figure 1.5) (Sano et Reed, 2013). TRAF-2 phosphorylée active le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), la kinase régulant le signal de l'apoptose « ASK-1 » et la « c-Jun N-terminal Kinase » (JNK) qui inhibe Bcl-2 (Circu et Aw, 2012; Savitskaya et Onishchenko, 2015). Bax et Bak change de conformation et provoquent des pores dans la membrane du RE. Le calcium (Ca²⁺) est alors libéré dans le cytosol par les canaux calciques (Figure 1.5). La concentration de Ca²⁺ est augmentée et permet l'activation de la m-calpaïne qui active la caspase-4/12 par clivage (Momi, 2004; Palapati et Averill-Bates, 2012; Yamamuro *et al.*, 2011). Ensuite, la translocation de la caspase-4/12 près de la mitochondrie, active la caspase-9 dans le cytosol, induisant le processus apoptotique de façon indépendante de la voie mitochondriale. Par ailleurs, le Ca²⁺ sorti dans le cytosol s'accumule à l'extérieur de la mitochondrie, engendrant la dépolarisation de la membrane interne et ainsi l'apoptose par voie mitochondriale.

De même, la protéine PERK est activée par la dissociation de Bip lui permettant de phosphoryler « eukaryotic translation initiation factor 2 » (eIF2- α) (Figure 1.5) (Wang et Kaufman, 2016). La phosphorylation d'eIF2- α favorise la translocation de mRNA codant pour le facteur de transcription ATF4 qui cible les gènes codants pour GADD34 et le facteur de transcription pro-apoptotique « C/EBP homologous protein 10 » (CHOP) (Savitskaya et Onishchenko, 2015) (Figure 1.5). La protéine GADD34 lie et déphosphoryle eIF2- α , empêchant l'UPR mais favorisant l'induction de l'apoptose (Brush *et al.*, 2003; Sano et Reed, 2013). Activée lors d'un stress RE à long terme, CHOP réprime le promoteur de Bcl-2 et entraîne la surexpression de *Bim*, *Puma*, *Noxa*, *Bax*, *Bid*, *TRB3* et *DR-5* [voir revues (Sano et Reed, 2013; Shore *et al.*, 2011)].

Bip se libère également de l'extrémité amine d'ATF6. ATF6 devient alors, un facteur de transcription lorsqu'il pénètre dans l'appareil de Golgi et subit un double clivage par des protéases qui vont le relâcher dans le cytosol (Wang et Kaufman, 2016). Ensuite, il se dirige

vers le noyau afin de réguler l'expression des gènes codants pour les protéines impliquées dans l'UPR.

1.3.2. Apoptose et choc thermique

En fonction du type de cancer, à des doses excessives de chaleur, la cellule cancéreuse va mourir par nécrose alors qu'à de plus faibles doses, la cellule rentre en apoptose (Figure 1.3) [voir revue (Bettaieb *et al.*, 2013; Zhang et Calderwood, 2011)]. En effet, dans les cellules cancéreuses (ex : HeLa et CHO), les chocs thermiques létaux (≥ 42 °C) activent l'apoptose par les trois voies : mitochondriale, du réticulum endoplasmique et des récepteurs de mort (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015; Bettaieb et Averill-Bates, 2005). De plus, l'hyperthermie perturbe l'équilibre entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille «protéine de lymphome de cellules B 2» (Bcl-2), favorisant l'induction de l'apoptose (Glory *et al.*, 2014). Par exemple, suite à l'hyperthermie, l'expression des protéines Bcl-2 et Bcl-X_L diminue dans les cellules cancéreuses HeLa alors que les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Puma et Noxa voient une augmentation de leur expression (Glory *et al.*, 2014). Ce déséquilibre favorise l'activation de la caspase-9 par la mitochondrie et la caspase-3 conduisant au phénomène de l'apoptose.

Lorsque les cellules sont exposées à l'hyperthermie (≥ 42 °C), la réponse au stress de RE est induite pour restaurer et maintenir l'homéostasie de la cellule. Les chocs thermiques augmentent la phosphorylation de PERK, eIF2- α , IRE-1 α et le clivage d'ATF6. Si le stress est trop sévère ou prolongé, l'expression des facteurs de transcription CHOP et XBP1 sera activée ainsi que leur translocation au noyau, induisant l'apoptose par le RE (Bettaieb et Averill-Bates, 2015; Liu *et al.*, 2012). Également, il a été démontré que l'hyperthermie cause l'apoptose par le stress du RE via l'activation de caspases-4/12 dans les cellules cancéreuses mélanomes de la peau (Shellman *et al.*, 2008).

La thermotolérance mise en place à 40 °C protège les cellules contre l'induction de l'apoptose par les trois voies, en réponse à l'hyperthermie (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Bettaieb et Averill-Bates, 2005). En effet, il a été démontré que chez les cellules

thermotolérantes, l'activation de l'apoptose par la voie mitochondriale ainsi que par les récepteurs de mort à la surface cellulaire est diminuée en réponse à des chocs thermiques létaux (42 à 45 °C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Cet effet protecteur est dû partiellement à l'augmentation de l'expression des Hsp plus particulièrement la Hsp72, qui pourrait jouer un rôle important dans la diminution du stress du RE induit par l'hyperthermie (Bettaieb et Averill-Bates, 2015). L'expression de Hsp72 inhibe le stress du ER et l'apoptose, au niveau de ATF6, PERK/ eIF2- α et de IRE-1 α /XBP1 (Bettaieb et Averill-Bates, 2015; Kondo *et al.*, 2012). Les Hsp70 et 27 empêchent l'induction de l'apoptose par dysfonctionnement de la mitochondrie. En effet, les Hsp70 et 27 inhibent le clivage de Bid par la caspase-8 et sa translocation vers la mitochondrie, empêchant la libération du cytochrome c (Figure 1.5) (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Gabai *et al.*, 2002; Sreedhar et Csermely, 2004). Par conséquent, les Hsp semblent jouer un rôle important dans la régulation de l'apoptose surtout au niveau de la signalisation des récepteurs de mort suite aux chocs thermiques dans les cellules cancéreuses (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Bettaieb et Averill-Bates, 2005).

À des températures très élevées et brutales, le stress est tel que les cellules ne pourraient pas prendre le temps de s'engager dans une mort cellulaire contrôlée. Ainsi elles ne déclencheraient pas les mécanismes de l'apoptose mais entreraient directement en nécrose, autre un type de mort cellulaire (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Mambula et Calderwood, 2006). La nécrose est accidentelle et est accompagnée par une réponse inflammatoire *in vivo*, néfaste pour l'organisme. (Figure 1.4) (Chaabane *et al.*, 2013).

En conclusion, les cellules répondent à l'accumulation de protéines endommagées ou mal repliées par l'implication de plusieurs voies métaboliques. Ces voies conduisent soit à leur réparation par des chaperonnes et à leur dégradation par des protéases, soit à la mort cellulaire en cas de stress ingérable. En effet lors d'un stress (ex : stress oxydatif, manque de nutriments et d'oxygène), il y a agrégation de protéines nocives qui obligent la cellule à se sacrifier par apoptose (Calderwood *et al.*, 2009; Zhang et Calderwood, 2011). Ainsi, afin de se protéger contre ces conditions de stress qui ont le potentiel de causer un dommage, la cellule subit souvent des changements métaboliques lui permettant continuellement de s'y

adapter (Kroemer *et al.*, 2010). Un processus qui permettrait l'élimination des constituants cellulaires non fonctionnels et qui empêcherait la mort cellulaire serait l'autophagie (Lin et Baehrecke, 2015).

1.4. Autophagie

Le terme autophagie provient des mots grecs *Auto* (seul) et *Phagy* (manger) et définit une cellule qui mange soi-même. Pouvant être sélectives ou non sélectives, plusieurs formes d'autophagie sont décrites : la microautophagie (1), l'autophagie médiée par des chaperonnes (2) et la macroautophagie (3) (Figure 1.6) (Klionsky, 2010; Ryan, 2011; Schneider et Cuervo, 2014). Il existe également la mitophagie qui, par processus macroautophagique, élimine spécifiquement les mitochondries défectueuses dans la cellule (Youle et Narendra, 2011). Lors de la microautophagie, les lysosomes dégradent les composants cytosoliques par invagination directe [voir revue (Li *et al.*, 2012)]. Pendant l'autophagie médiée par des chaperonnes, comme le nom l'indique, des chaperonnes telles les « Heat shock cognate protein of 70 kDa » (Hsc70) sont utilisées afin de reconnaître les protéines cytosoliques contenant à leur surface un motif de type pentapeptide avec une séquence KFERQ (Kaushik *et al.*, 2012). L'Hsc70 transporte ces protéines spécifiques vers les lysosomes et lie le récepteur « Lysosomal-associated membrane protein-2a » (LAMP-2a) à la surface des membranes lysosomales [voir revue, (Kaushik *et al.*, 2012)]. Cette liaison provoque la translocation et la dégradation des protéines à l'intérieur des lysosomes. La macroautophagie est le type d'autophagie le plus étudié. Elle joue un rôle important dans la physiologie humaine. Chez les mammifères, la macroautophagie est caractérisée par un mécanisme cellulaire catabolique, impliquant la formation d'une vésicule délimitée par une double bicouche lipidique, appelée autophagosome, et la dégradation lysosomale (Lin et Baehrecke, 2015; Ravikumar, B. *et al.*, 2010). L'autophagosome se manifeste par la séquestration des macromolécules et des organelles cytoplasmiques. Une fois formé, il fusionne avec les lysosomes. Le contenu cellulaire englobé est alors dégradé par les hydrolases acides présentes à l'intérieur des lysosomes [voir revue (Feng *et al.*, 2014; Klionsky, 2010)]. Dans ce document, nous allons nous concentrer sur la macroautophagie dans les cellules eucaryotes qui dans la littérature est tout simplement appelée autophagie.

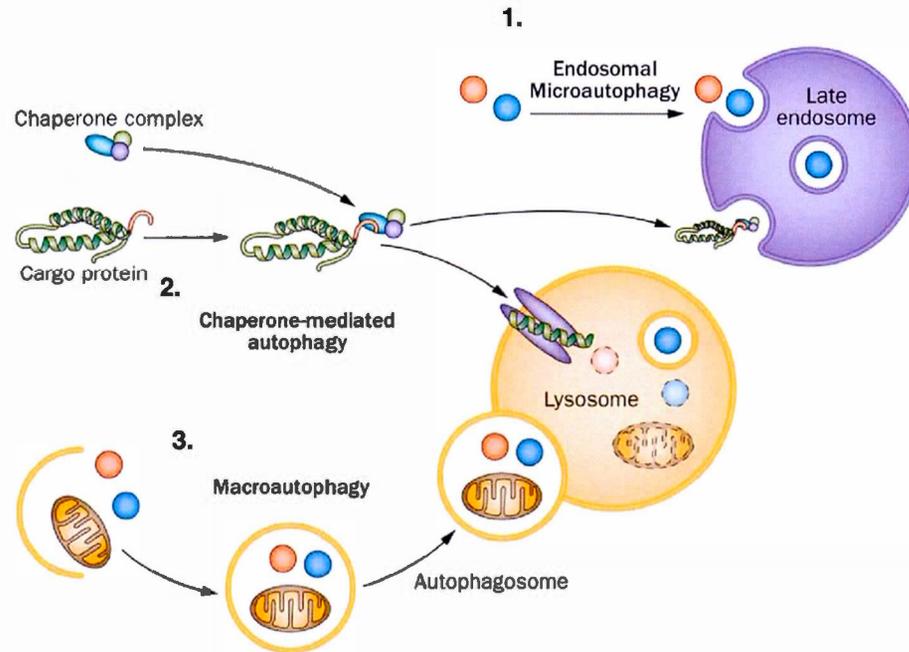


Figure 1.6. Les différents types d'autophagie. L'autophagie se présente généralement, sous trois formes distinctes : **1.** La microautophagie est une invagination de petites particules retrouvées à la surface de l'endosome tardive qui sont ensuite dégradées dans la lumière de l'endosome. **2.** Lors de l'autophagie médiée par des chaperonnes, les protéines altérées sont acheminées vers les lysosomes par des chaperonnes. Ensuite, les protéines traversent la membrane lysosomale à l'aide d'un complexe de translocation contenant la protéine LAMP-2a et sont dégradées. **3.** Dans la macroautophagie, les protéines, les organelles et tous matériels cytoplasmiques endommagés sont englobés à l'intérieur d'une vacuole de double membrane nommée autophagosome qui par la suite fusionne avec les lysosomes. Les éléments séquestrés sont dégradés par les hydrolases à l'intérieur des lysosomes. Tirée de (Schneider et Cuervo, 2014).

1.4.1. Mécanismes et régulation des voies de signalisation de l'autophagie

L'autophagie est un processus multifonctionnel hautement conservé entre la levure et les mammifères. Elle est nécessaire pour le fonctionnement continu de l'organisme (Gozaucik et Kimchi, 2004; Levine et Klionsky, 2004; Lin et Baehrecke, 2015). À un niveau

basal, l'autophagie est constitutivement active et essentielle pour maintenir la stabilité génomique, l'intégrité et l'homéostasie cellulaire. Elle est davantage induite en condition de stress, comme les stress extracellulaires dont la privation de nutriments, l'hypoxie, l'infection de pathogènes ou comme les stress intracellulaires dus à l'accumulation des protéines et organelles endommagées. Le mécanisme autophagique est aussi stimulé dans de nombreux processus physiologiques comme la sénescence, la différenciation, le développement embryonnaire, l'immunité et l'élimination de microorganismes (Klionsky, 2010). De ce fait, lorsqu'il y a un défaut dans l'autophagie, une variété de maladies peut être mise en place dont le cancer, les maladies auto-immunes et la neurodégénérescence dont les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Levine et Kroemer, 2008; Meijer et Codogno, 2006).

Les voies de signalisation moléculaire de l'autophagie gouvernent la formation de l'autophagosome par l'intermédiaire de plusieurs gènes « Autophagy related genes » (Atg). Ces gènes ont d'abord été identifiés par criblage génétique dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* et codent pour des protéines participant à différentes étapes du phénomène de l'autophagie : l'initiation, l'élongation et la maturation de l'autophagosome puis sa fusion avec les compartiments acides. Des homologues de la plupart de ces Atg ont été déterminés chez les mammifères et leurs implications dans l'autophagie sont décrites dans ce manuscrit.

1.4.1.1. Étape d'initiation de l'autophagie

L'autophagie est régulée principalement par la voie de « Mammalian target of rapamycin complexe 1 » (mTOR) (Figure 1.7) qui est retrouvée dans le contrôle de diverses actions cellulaires telles que la transduction du signal nutritif, la traduction et la prolifération cellulaire [voir revues (Rubinsztein *et al.*, 2007; Sarkar, 2013)]. La protéine mTOR est une kinase sérine/thréonine qui agit comme un suppresseur sur l'autophagie. Elle interagit avec la protéine sérine/thréonine kinase cible de la rapamycine (complexe 1) (mTORC-1) et conduit à la phosphorylation du complexe « Unc-51-like-kinase » (ULK), homologue d'Atg1 (Feng *et al.*, 2014) requis pour le début de la formation de l'autophagosome. Sous conditions de stress ou autres facteurs (ex : insuline, facteurs de croissance et acides aminés),

l'« Adenosine-monophosphate-activated protein kinase » (AMPK) est catalysée dans le complexe de facteurs de sclérose tubéreuse 1 et 2 (TSC1/TSC2) et inactive la protéine mTOR qui se dissocie du complexe multiprotéique ULK, engendrant l'autophagie [voir revues (Kroemer *et al.*, 2010; Nixon, 2013; Ravikumar *et al.*, 2009; Sarkar, 2013)]. L'activité kinase de mTOR peut être également inhibée par la rapamycine (sirolimus) (Figure 1.7), un antibiotique lipophile isolé du *streptomyces hygroscopicus* qui cible mTORC-1 [voir revues (Ravikumar, B. *et al.*, 2010; Sarkar, 2013)].

Les membres de la famille anti-apoptotique de Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-X_L) interviennent également dans le contrôle de l'autophagie et sont des régulateurs négatifs au niveau de Beclin-1 (homologue d'Atg6), un activateur clé de l'autophagie (Figure 1.7) [voir revue (Ariosa et Klionsky, 2016)]. L'interaction de Beclin-1 et Bcl-2 est primordiale dans l'équilibre entre la survie ou la mort cellulaire. En conditions normales, Bcl-2 lie et inactive Beclin-1 qui contient un domaine BH3, empêchant donc l'induction de l'autophagie. Cependant, des conditions de stress font que Bcl-2 est phosphorylée et se dissocie de Beclin-1 lui permettant alors d'enclencher le processus (Ariosa et Klionsky, 2016). Beclin-1 va interagir avec la kinase phosphatidylinositol 3 (PI3K) de classe III et Vps34, et va favoriser leur activation. Vps34 génère ensuite des domaines phosphoinositides phosphorylés (PI-3-P), permettant la construction du complexe de nucléation (phagophore) qui est une structure membranaire (Figure 1.7) (Furuya *et al.*, 2005). Le phagophore est nécessaire à la formation de l'autophagosome et est constitué de deux kinases sérine/thréonine ULK1 et ULK2, Beclin-1, des homologues d'Atg13, Atg101 et FIP200 (Ariosa et Klionsky, 2016; Chen *et al.*, 2011). Beclin-1 interagit et recrute également d'autres protéines qui régulent la formation de l'autophagosome telles que Atg14L, Vps15, gène associé à la résistance aux UV (UVRAG), « Molecule of Beclin-1 regulated autophagy » (AMBRA-1) et « Bax interacting factor-1 » (Bif-1), facilitant la courbure de l'autophagosome [voir revues (Liang *et al.*, 2006; Ravikumar, B. *et al.*, 2010; Sarkar, 2013; Takahashi *et al.*, 2007)].

L'autophagie peut être régulée également par des agents chimiques. Par exemple, le wortmannin et le 3-méthyladenine (3-MA), sont des inhibiteurs de l'activité de la PI3 kinase et comme empêchent l'initiation de l'autophagosome (Figure 1.7) (Seglen et Gordon, 1982; Wu *et al.*, 2010).

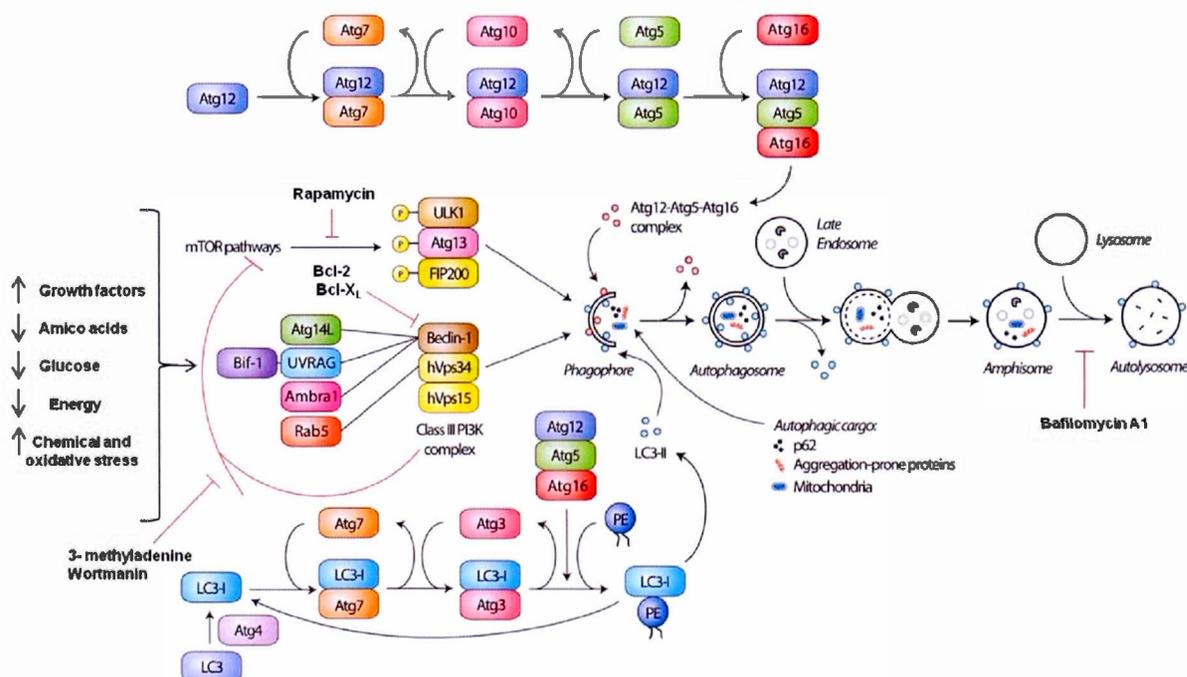


Figure 1.7. Régulation et signalisation du mécanisme d'autophagie chez les mammifères. Dans le cytoplasme, l'autophagie est initiée par la nucléation d'un phagophore. Elle est contrôlée par la voie de signalisation mTOR au niveau du complexe ULK1-ATG13-FIP200. La voie mTOR est inhibée en présence de facteurs de croissance, en manque d'acides aminés et de glucose, permettant l'activation de l'autophagie. En absence d'énergie et en cas de stress chimique ou oxydatif, Bcl-2 et Bcl-X_L se dissocient de Beclin-1 et forme le complexe PI3K de classe III qui peut inhiber mTOR. Plusieurs protéines (Ambra 1, Atg14, etc.) interagissent avec Beclin-1 et favorisent la formation de l'autophagosome. La conjugaison d'Atg5 avec Atg12 requière Atg7 et Atg10 alors que LC3-I-PE implique Atg3, Atg4 et Atg7. Atg5-Atg12 forme ensuite un complexe avec Atg16 et se dirige vers la membrane du phagophore. LC3-I-PE se transforme en LC3-II qui est retrouvée également sur la membrane. Ces deux complexes de conjugaison modulent l'élongation du phagophore et forme l'autophagosome. Les organelles et le matériel cytoplasmique constitué d'éléments non spécifiques comme la p62, sont séquestrés à l'intérieur de l'autophagosome. Une fois que l'autophagosome est formé et mature, il fusionne avec les endosomes et lysosomes dans lesquels le contenu cellulaire est dégradé. L'autophagie est régulée par des produits chimiques tels que la rapamycine qui inhibe mTORC-1, le 3-méthyladénine qui inhibe PI3K de classe III et la bafilomycine A1 qui interrompt la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes. Adaptée de (Sarkar, 2013).

1.4.1.1. Étape d'élongation de l'autophagie

L'autophagie est par la suite, régulée par deux réactions ubiquitine-like : les systèmes de conjugaison d'Atg5 avec Atg12 et de la « protein microtubule-associated protein 1 light chain 3 » (MAP-LC3 ou LC3) avec le phosphatidyléthanolamine (PE) (Figure 1.7) (Sarkar, 2013). À ce niveau, les deux voies sont réalisées en parallèle afin d'élargir le complexe de nucléation. D'un côté, la construction du complexe Atg5-Atg12 est catalysée par Atg7 et Atg10, deux protéines enzymatiques de type E1 et E2, respectivement. Atg12 est activée par Atg7 puis transportée par Atg10 et se lie à la lysine (K130) de l'Atg5 par son résidu glycine (Gly186) à l'extrémité carboxyle. Le dimère Atg12-Atg5 s'associe ensuite avec Atg16, formant un complexe de 800 kDa (Atg12-Atg5-Atg16) (Ravikumar, B. *et al.*, 2010; Shpilka *et al.*, 2012). Quatre complexes Atg12-Atg5-Atg16 se lient à la membrane de l'autophagosome et sont utiles pour son élongation. Ils se dissocient une fois que l'autophagosome est élaboré (Figure 1.7). De l'autre côté, la protéine LC3 (homologue d'Atg8) sous forme de précurseur est d'abord clivée par la protéase Atg4 à son extrémité carboxyle pour donner l'isoforme cytosolique LC3-I. Ce dernier va par la suite, être conjugué avec le PE en présence d'Atg7 et Atg3 pour former LC3-II qui va se lier à la membrane de l'autophagosome en élongation (Sarkar, 2013). LC3-II est une protéine spécifique au processus de l'autophagie et est observée au niveau externe de la membrane de l'autophagosome même après la fusion avec les lysosomes (Figure 1.7). LC3-II nécessite la présence du complexe Atg5-Atg12-Atg16 afin de se lier à l'autophagosome et d'allonger la membrane [voir revues (Chen *et al.*, 2011; Ravikumar *et al.*, 2009)].

1.4.1.2. Étape de maturation et fusion de l'autophagosome

Atg-9 génère quant à lui une membrane supplémentaire afin de définir la forme complète de l'autophagosome (Feng *et al.*, 2014; Rubinsztein *et al.*, 2007). S'ensuit une étape d'allongement et d'achèvement de l'autophagosome tout en emprisonnant le contenu cytosolique à dégrader. Une fois l'autophagosome formé, celui-ci est dirigé vers le lysosome afin que sa membrane fusionne avec ce dernier (Figure 1.7). Cette vésicule se déplace bidirectionnellement le long des microtubules vers le centrosome enrichi de lysosomes. Il s'assemble premièrement avec les endosomes formant un amphisome puis avec les lysosomes pour créer un autolysosome (Figure 1.7) (Sarkar, 2013). Cette fusion va entraîner une étape de dégradation du contenu de l'autophagosome par les hydrolases acides mais également une étape de recyclage en cas de carence alimentaire dans les cellules. Le matériel séquestré est dégradé et digéré en sous-unités élémentaires (acides aminés, acide gras, etc.) réutilisables dans le catabolisme énergétique ou l'anabolisme protéique (Lin et Baehrecke, 2015). Ces éléments sont libérés dans le cytosol par les perméases et peuvent servir pour construire de nouvelles protéines ou autres constituants intracellulaires (Chen *et al.*, 2011).

Le bon fonctionnement des lysosomes et de l'acidification lysosomale, sont essentiels afin que la fusion de l'autophagosome soit réussie. La dégradation du contenu cytoplasmique peut être empêchée par des agents chimiques comme la bafilomycine A1 ou la chloroquine (Figure 1.7) (Ravikumar. *et al.*, 2010; Yoshimori *et al.*, 1991).

1.4.2. Autophagie : une réponse de survie ou de mort cellulaire

Suite à de stress métaboliques (ex : stress oxydatif) non létaux, l'autophagie aurait lieu avant la mort cellulaire par apoptose (Marino *et al.*, 2014). Certaines études montrent que l'autophagie est une réponse adaptative que la cellule active afin d'empêcher sa mort contre les effets nocifs (Hu *et al.*, 2012; Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). L'autophagie modère les signaux pro-apoptotiques, la quantité de constituants abîmés de la mitochondrie et la cascade

de réactions classiques de l'apoptose (Levine *et al.*, 2008; Levine et Yuan, 2005; Marino *et al.*, 2014; Portt *et al.*, 2011). Ainsi, ce processus subcellulaire agit comme un mécanisme protecteur et sert de phénomène anti-apoptotique.

Lorsque la cellule n'est plus capable de gérer le stress métabolique, l'autophagie est prolongée et devient excessive ; il y a accumulation de vacuoles autophagosomales et les constituants cellulaires endommagés qui sont essentiels pour la survie cellulaire vont être dégradés. Ceci conduit éventuellement à la mort cellulaire autophagique du type II (PCD II), différente de l'apoptose et de la nécrose (Liu et Levine, 2015). Ainsi, l'autophagie aurait deux mécanismes différents, la survie cellulaire conservée chez les eucaryotes et la mort cellulaire programmée. PCD II est induite en présence de mutations qui inhibent les voies apoptotiques dépendantes des caspases (Liu et Levine, 2015; Zhang et Calderwood, 2011). Elle serait activée par la voie des récepteurs de mort ou via la voie du IRE-1 et de JNK-1 qui phosphoryle Beclin-1 (Deegan *et al.*, 2015). Cependant, PCD II est peu identifiée dans les tissus et cellules de mammifères; les caractères morphologiques cellulaires ne sont pas clairs (Liu et Levine, 2015). Par ailleurs, l'autophagie peut être inhibée par l'induction de l'apoptose (Marino *et al.*, 2014). En effet, lorsque l'intensité et la durée du stress imposé à la cellule atteignent la limite, l'apoptose est mis en place avec l'activation de plusieurs caspases. Ces caspases vont entraîner la digestion de plusieurs protéines autophagiques (ex : Atg4, Beclin-1 et Atg3), conduisant à l'inactivation de l'autophagie (Marino *et al.*, 2014; Oral *et al.*, 2012).

1.4.3. Autophagie et cancer

Le rôle de l'autophagie dans le cancer est considéré comme complexe et contradictoire. L'autophagie peut à la fois être impliquée dans les processus de prévention et de promotion d'un cancer dans une région saine de l'organisme (Choi, 2012; Zhi et Zhong, 2015). D'abord, chez les cellules précancéreuses, l'autophagie peut agir comme un suppresseur de tumeur, évitant l'accumulation des protéines mal repliées et/ou d'autres déchets toxiques pouvant promouvoir la formation de cellules cancéreuses (Figure 1.8) (Gozuacik et Kimchi, 2004; Shintani et Klionsky, 2004; Zhi et Zhong, 2015). Ainsi, lors des premières étapes d'une croissance tumorale, la perturbation ou l'inhibition de l'autophagie favorise le développement du cancer. Il a été démontré que Beclin-1 est supprimée dans environ 50% des cancers ovariens, de sein et de la prostate chez les souris (Aita *et al.*, 1999; Choi, 2012; Liang *et al.*, 1999). Diverses protéines suppresseuses de tumeurs sont également impliquée dans l'induction de l'autophagie dont l'Atg4, p53, AMPK et TCS [voir revue (Choi, 2012)]. De plus, en absence d'autophagie, la protéine chaperonne p62 ne peut se lier à la protéine LC3 et pénétrer dans l'autophagosome pour être dégradée (Figure 1.7) (Moscat *et al.*, 2009; Zhi et Zhong, 2015). La protéine p62 va alors s'accumuler dans le cytoplasme, entraînant un stress RE, l'endommagement de l'ADN et conduit à l'oncogenèse.

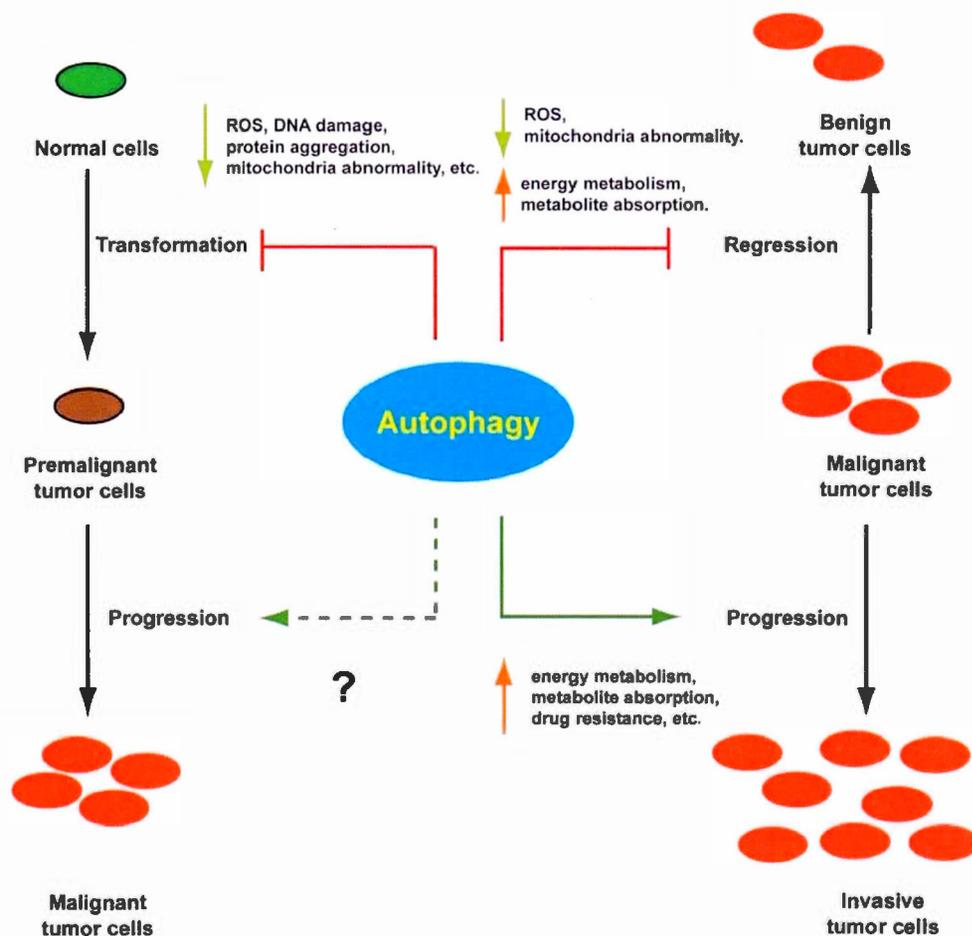


Figure 1.8. Le rôle de l'autophagie dans le cancer. Chez les cellules saines, l'autophagie inhibe leur transformation en cellules cancéreuses. Elle gère les changements anormaux que subissent les cellules. Ce processus diminue l'agrégation des protéines et la quantité d'ADN endommagé lorsque les cellules sont soumises à une augmentation des EROs. En croissance tumorale, les cellules cancéreuses activent l'autophagie comme un mécanisme de survie cellulaire, les protégeant contre des facteurs nocifs. L'autophagie favorise la résistance des cellules cancéreuses aux médicaments par l'absorption de métabolites et en présentant un bon métabolisme énergétique. Tirée de (Zhi et Zhong, 2015).

Plus tard dans la progression tumorale, l'autophagie joue un rôle dans la survie tumorale, notamment dans les régions faiblement vascularisées en hypoxie au sein d'une tumeur solide (Figure 1.8) (Ravikumar *et al.*, 2010). L'autophagie protège contre le processus d'apoptose et rend certains types de tumeurs malignes résistants aux agents anticancéreux (Jin *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2014). Par conséquent, l'autophagie pourrait avoir un rôle oncogénique ou comme suppresseur de tumeur durant le développement d'un cancer (Jin *et al.*, 2016). Ceci diffère selon le type de tumeur et le stade de développement tumoral. L'inhibition de l'autophagie serait une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement contre le cancer. L'absence d'autophagie diminuerait le potentiel de survie cellulaire et favoriserait également l'effet toxique des thérapies anticancéreuses (Choi, 2012; Ravikumar *et al.*, 2009). De ce fait, des études expérimentales spécifiques à la détermination des inhibiteurs de l'autophagie dans les traitements anticancéreux sont de plus en plus requises afin d'arrêter la prolifération tumorale (Choi, 2012; Levine et Kroemer, 2008).

1.4.4. Autophagie et hyperthermie

L'hyperthermie a été appliquée comme traitement contre le cancer dû à son effet principal qui est de tuer les cellules cancéreuses. Cependant, les cellules possèdent une réponse adaptative (la thermotolérance) à la chaleur dans laquelle les Hsp sont surexprimées et diminuent la mort cellulaire. Dans les cellules, l'hyperthermie entraîne l'accumulation de larges agrégats protéiques polyubiquitinylés qui sont insolubles et volumineux rendant donc difficile leur dégradation par le protéasome. Ces protéines polyubiquitinylés possèdent un site de liaison étant une chaîne de K-63 et elles sont ciblées et éliminées par l'autophagie (Zhang et Calderwood, 2011). Des études scientifiques ont démontré que des conditions hyperthermiques (ex : 43 °C) activent l'autophagie dans plusieurs types cellulaires permettant une augmentation de la survie cellulaire par diminution des agrégats de protéines intracellulaires (Dalby *et al.*, 2010; Dokladny *et al.*, 2015; Komata *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2009). Cependant, les mécanismes autophagiques induits par l'hyperthermie ne sont pas clairement démontrés. Selon Zhao, le facteur de transcription

HSF1, qui régule l'expression des chaperonnes, contrôlerait également l'autophagie (Dokladny *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2009). Les protéines Hsp et l'autophagie pourraient interagir afin de maintenir l'homéostasie cellulaire en réponse à l'hyperthermie. Il a été démontré que les Hsp27, 70, 72 et 90 possèdent un rôle dans la régulation de l'autophagie induite par un stress (Dokladny *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Elles activent l'autophagie via la protéine Beclin-1, la voie de signalisation de NF- κ B ou la voie mTOR.

L'autophagie jouerait un rôle pertinent dans la réponse des cellules cancéreuses contre l'hyperthermie (Komata *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'autophagie en combinaison avec l'hyperthermie pourrait optimiser l'effet cytotoxique du traitement en augmentant le taux la mort cellulaire telle que l'apoptose (Komata *et al.*, 2004). En conclusion, il est alors primordial de mieux comprendre ses mécanismes cellulaires induits par le stress thermique ainsi que d'étudier l'importance de l'autophagie dans la survie des cellules cancéreuses lors de la thermotolérance.

1.5. Présentation du projet

1.5.1. Introduction

En supplément des principaux traitements anticancéreux (la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie), l'hyperthermie est une thérapie alternative contre le cancer. Elle est définie par l'élévation de températures (42 à 45 °C) au sein d'une région tumorale. L'hyperthermie exerce une action cytotoxique directe et conduit à la destruction des cellules par apoptose et/ou nécrose (Wrzal *et al.*, 2008). Malgré son succès en clinique, les mécanismes biochimiques de l'hyperthermie ne restent pas entièrement compris.

Les cellules cancéreuses, notamment les cellules de carcinome du col de l'utérus humain (HeLa), ont tendance à développer des stratégies de survie afin de lutter contre des stimuli hostiles tels que les composés toxiques et les stress abiotiques. En effet, l'exposition des cellules à de faibles doses de stress (stress oxydatif, substances toxiques, stress thermique, etc.), entraîne une réponse adaptatrice de survie (Pallepati et Averill-Bates, 2010, 2011a, 2011b). Il a été démontré que l'exposition des cellules à de faibles doses de stress thermique met en place le phénomène de thermotolérance qui stimule l'accumulation des molécules de défense telles que les protéines de choc thermique et anti-apoptotiques. La thermotolérance protégerait les cellules contre la mort cellulaire induite par les trois voies principales en réponse à des chocs thermiques forts (42 à 45 °C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015; Bettaieb et Averill-Bates, 2005).

Il y a souvent une dérégulation de la mort par apoptose et de l'autophagie dans les cellules tumorales, favorisant leur survie. Étant donné que l'autophagie joue un rôle de défense cellulaire, elle pourrait être induite en conditions de thermotolérance (40°C, 3 à 24 h) ainsi qu'en conditions d'hyperthermie (42 à 45 °C) à des expositions plus courtes. Afin d'améliorer l'optimisation thérapeutique de l'hyperthermie en clinique, il serait pertinent de déterminer précisément la modalité idéale d'induction de l'autophagie et l'effet de son inhibition sur l'activation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses exposées davantage au

choc thermique. L'étude du rôle de l'autophagie dans l'effet protecteur de la thermotolérance serait également nécessaire afin d'évaluer par la suite si la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par choc thermique faible, augmente lorsque l'autophagie est inhibée. Cette étude apportera de nouvelles connaissances au niveau des mécanismes de défenses cellulaires permettant de résister aux agressions cytotoxiques de l'hyperthermique.

1.5.2. Hypothèses

De faibles doses d'hyperthermie à 42 °C induisent l'autophagie comme une réponse de survie cellulaire. L'autophagie est également activée en conditions de thermotolérance développée à 40 °C. L'inhibition de l'autophagie sensibilise davantage les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par un choc thermique fort à 42 °C. L'effet protecteur de la thermotolérance est partiellement maintenu en absence de l'autophagie lorsque les cellules subissent un stress thermique fort.

1.5.3. Objectifs du projet

Les objectifs généraux du projet sont de déterminer les modalités d'induction de l'autophagie par le choc thermique faible à 42 °C et lors de la thermotolérance à 40 °C ainsi que son implication dans la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par un choc thermique fort à 42 °C.

Les objectifs spécifiques établis dans le but de confirmer ou infirmer les hypothèses énoncées précédemment sont les suivants :

- 1- Déterminer le profil d'induction de l'autophagie en fonction du temps d'exposition au choc thermique à 42 °C, comparativement à l'induction de l'apoptose.
- 2- Évaluer si l'autophagie est activée en condition de thermotolérance développée à 40 °C.
- 3- Déterminer l'impact de l'inhibition de l'autophagie sur l'activation de l'apoptose induite par un choc thermique fort à 42 °C.
- 4- Évaluer l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur la capacité de la thermotolérance à protéger contre l'induction de l'apoptose par un choc thermique fort à 42 °C.

1.5.4. Choix de modèle

La lignée cellulaire HeLa provenant d'un carcinome du col de l'utérus humain, a été choisie comme modèle cellulaire pour ce projet. Ces cellules ont été mises en culture pour la première fois en 1951 par Georges Otto Gey. Depuis, les cellules HeLa sont très couramment utilisées dans les laboratoires de recherche en raison de leur caractère immortel et leur prolifération rapide. Elles ont été choisies comme modèle pour ce projet parce qu'il a été mis en évidence que l'hyperthermie fonctionne efficacement contre le cancer du col de l'utérus en clinique (Franckena *et al.*, 2009; Zee et González, 2002). De plus, les profils d'induction de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose en réponse au choc thermique, ont été élaborés sur ce type cellulaire notamment dans notre laboratoire. Cette lignée cancéreuse a été obtenue via « The American Type Culture Collection » (ATCC no. CCL-2).

CHAPITRE II

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

2.1. Préface

Ce chapitre est constitué d'un article scientifique, décrivant les résultats expérimentaux du projet effectué durant ma maîtrise dans le laboratoire du Dr Diana Averill-Bates. Cet article s'intitule « Mild thermotolerance induced at 40°C activates autophagy in HeLa cells: a protective effect against heat shock-induced apoptosis » et sera soumis au journal « Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research ». En tant que première auteure, j'ai contribué à l'exécution de la majorité des expérimentations relatives à cette étude ainsi qu'à l'analyse et l'interprétation des données. J'ai également réalisé la rédaction, les études statistiques, les recherches bibliographiques, la mise en forme de l'article et des figures. Dr Mélanie Grondin comme seconde auteure, s'est engagée dans l'expérimentation concernant l'immunofluorescence de la protéine LC3 en utilisant la microscopie confocale et a réalisé le montage des images à ce propos. Dr Diana Averill-Bates a contribué à la conception scientifique, la supervision et le suivi du projet ainsi qu'à la révision critique du contenu intellectuel de l'article. La bibliographie de l'article a été intégrée à la bibliographie du mémoire.

Dans le cadre de ma maîtrise, des expériences supplémentaires de ma part ont été effectuées pour l'article intitulé « Inhibition of autophagy sensitizes cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis : protective effect of mild thermotolerance acquired at 40°C », par Maureen Redza-Dutordoir (Premier auteur), Sarah Kassis, Hou Ve, Mélanie Grondin et Diana Averill-Bates (voir section Annexes). L'article est publié dans le journal « Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research ». Suite aux commentaires des évaluateurs sur l'article, j'ai réalisé

comme seconde auteure, toutes les expériences concernant la lignée cellulaire C33 A ainsi que les études statistiques et le montage des figures qui s'y rapportent. Maureen Redza-Dutordoir a effectué la majorité des expérimentations et des statistiques relatives aux données de l'article, la mise en forme de l'article et des figures avant la soumission. La rédaction et les recherches bibliographiques ont été également réalisées par Maureen Redza-Dutordoir. Hou Ve a contribué à la réalisation des expérimentations liées à l'évaluation de l'activité enzymatique des caspases-8, -4, -7 et de la calpaine. Dr Mélanie Grondin a procédé à la prise et le montage des photos microscopiques des cellules C33 A et a contribué à la mise en forme finale de l'article. Enfin, Dr Diana Averill-Bates a conçu et supervisé le projet, a réalisé des recherches bibliographiques pour l'étude, a rédigé le texte relatif aux cellules C33 A et a révisé l'article.

2.2. Article

Mild thermotolerance induced at 40°C activates autophagy in HeLa cells: a protective effect against heat shock-induced apoptosis

Sarah Kassis, Mélanie Grondin and Diana A. Averill-Bates*

*Département des sciences biologiques (TOXEN), Université du Québec À Montréal,
Montréal, Québec, Canada*

* Corresponding author:

Dr Diana A. Averill-Bates

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal

CP 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000 (4811); Fax: (514) 987-4647; Email:averill.diana@uqam.ca

Keywords: Thermal stress, Autophagy, Thermotolerance, Apoptosis

Abbreviations:

3-MA : 3-methyladenine; AFC : 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin; AMC : 7-amino-4-methylcoumarin; AMPK : AMP-activated protein kinase; Apaf-1 : apoptotic peptidase activating factor 1; ATF6 : activating transcription factor 6; Atg: autophagy related genes; ATPase : adenosine triphosphatase; AVO : acidic vesicular organelles; Baf.: bafilomycin A1; Bcl-2 : B-cell lymphoma protein 2; Bcl-X_L : B-cell lymphoma-extra large; BSA : bovine serum albumin; Caspases : cysteine-independent aspartate specific proteases; CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate; CO₂ : carbon dioxide; DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole; DEVD : Asp-Glu-Val-Asp; DISC: death inducing signaling complex; iDISC : intracellular death inducing signaling complex; DMEM : Dulbecco modified Eagle's medium; DNP : 2,4-dinitrophenol; DTT : dithiothreitol; eIF2 α : eukaryotic initiation factor 2; EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid; EITD : Ile-Glu-Thr-Asp; ER : endoplasmic reticulum; FADD : Fas-associated death domain; FasL : Fas ligand; FBS : fetal bovine serum; GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; H⁺ : proton; H₂O₂ : hydrogen peroxide; HeLa : cervical carcinoma cell line; Hsp : heat shock protein; I κ B : inhibitor of kappa-B; Inh. : inhibitor; IRE-1 α : serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease; JNK : c-jun N-terminal kinase; LC3 : light chain 3; LEHD : Leu-Glu-His-Asp; LEVH: Leu-Glu-Val-Asp; LTR : lysotracker; MCA : methoxycoumarin-acetyl; MOMP : mitochondria outer membrane permeabilization; MOPS : 3-morpholinopropane-1 sulfonic acid; mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1; N : non thermotolerant cells; NF- κ B : nuclear factor kappa-Beta; NRF2 : nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; PARP : poly-(ADP-ribose) polymerase; PBS : phosphate buffered saline; PE : phosphatidylethanolamine; PERK : protein kinase RNA-like ER kinase; PI : propidium iodide; PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase; PIPES : 1,4-piperazinediethanesulfonic acid; PMSF : phenylmethylsulfonyl; ROS : reactive oxygen species; STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3; SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; Suc-L Y : Suc-Leu-Tyr; TT : thermotolerant cells; UPR : unfolded protein response; XBP1 : X-Box binding protein.

2.2.1. Abstract

Hyperthermia is a promising anti-cancer treatment, particularly when combined with radiotherapy and chemotherapy. It exerts its cytotoxic action by targeting thermal stress to tumor regions. However, exposure to low dose heat stress (40 °C, 3 h) can increase defense systems in cells that protect them against subsequent anti-cancer treatments. This transient phenomenon, known as thermotolerance, involves increased expression of defense molecules such as heat shock proteins and antioxidants. Autophagy is a physiological survival process that can be induced by stress. It is often upregulated in cancer cells, allowing them to survive. The aim of this study is to evaluate whether autophagy is induced by low doses of heat shock and if inhibition of autophagy could sensitize tumor cells to heat-induced apoptosis. The increased labeling of acidic compartments and protein expression of Beclin-1 and LC3-I/II showed that autophagy was transiently (5 to 45 min) induced in HeLa cells exposed to heat shock at 42 °C. Autophagy was also increased in thermotolerant (40 °C, 3 h) cells and could be involved in their resistance to apoptosis induced by lethal heat shock (42 °C, 2-3 h). When autophagy was inhibited using 3-methyladenine, activation of apoptosis through the three main signaling pathways, involving mitochondria, death receptors and endoplasmic reticulum, was enhanced. Autophagy appears to play a protective role against hyperthermia-induced apoptosis in cancer cells. The improved understanding of autophagy in response to heat shock has potential to optimize the efficacy of hyperthermia in the clinic.

Keywords: Thermal stress, Autophagy, Thermotolerance, Apoptosis

2.2.2. Résumé

L'hyperthermie est un traitement anticancéreux prometteur, en particulier lorsque combiné avec la radiothérapie et la chimiothérapie. Elle exerce une action cytotoxique en imposant un stress thermique qui cible les régions tumorales. Cependant, l'exposition à de faibles doses de stress thermique (40 °C, 3 h) peut entraîner l'augmentation des systèmes de défense dans les cellules, les protégeant contre des traitements anticancéreux subséquents. Ce phénomène transitoire, appelé thermotolérance implique l'expression des molécules de défense comme les protéines de choc thermique et les antioxydants. L'autophagie est un processus physiologique de survie qui peut être induit par des stress. L'autophagie est souvent sur-régulée dans les cellules cancéreuses, leur permettant de survivre. Le but de cette étude est d'évaluer si l'autophagie est induite en réponse à un choc thermique faible et si l'inhibition de l'autophagie peut sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose activée en réponse au choc thermique. Le marquage de compartiments acides et l'expression des protéines spécifiques de l'autophagie, Beclin-1 et LC3-I/II, ont permis de démontrer que l'autophagie est induite de façon transitoire (5 à 45 min) chez les cellules HeLa exposées aux chocs thermiques à 42 °C. L'autophagie était davantage activée chez les cellules HeLa thermotolérantes (40 °C), et serait impliquée dans la résistance à l'apoptose induite aux chocs thermiques forts à 42 °C (2 à 3 h). Lorsque l'autophagie était inhibée par le 3-méthyladénine, l'induction de l'apoptose via les trois voies principales impliquant les mitochondries, les récepteurs de mort et le réticulum endoplasmique, était renforcée. L'autophagie pourrait jouer un rôle pertinent dans la réponse protectrice des cellules cancéreuses contre l'effet hyperthermique induisant l'apoptose dans les cellules cancéreuses. L'étude approfondie de l'autophagie en réponse au choc thermique est importante pour l'optimisation de l'efficacité de l'hyperthermie en clinique.

Mots clés : Stress thermique, Autophagie, Thermotolérance, Apoptose

2.2.3. Introduction

Since the ancient era, the human race has been constantly fighting cancer. Medical science has therefore developed several conventional therapies for the destruction of tumor tissues. However, these therapies are only partially successful in the treatment of certain types of cancer (Baronzio *et al.*, 2013). The development of new and improved treatment modalities has been the subject of intense investigation. One relatively new approach is the use of hyperthermia which can be applied as a powerful adjuvant to conventional anti-cancer therapies, like chemotherapy and radiotherapy, in order to enhance their efficacy (Datta *et al.*, 2015; Franckena *et al.*, 2008; Issels, 2008; Lutgens *et al.*, 2016). Hyperthermia sensitizes cells to radiation and chemotherapeutic drugs, eliminating resistant tumor cells (Horsman et Overgaard, 2007; Issels, 2008; Li *et al.*, 2014; Man *et al.*, 2015; van der Zee, 2002). This promising alternative approach has seen its clinical application improve over recent decades for cancer sites such as cervix, head, neck, pancreas, liver, recurrent breast cancer, melanoma, sarcomas and glioblastoma (Baronzio *et al.*, 2014; Dähring *et al.*, 2015; van der Zee, 2002).

Hyperthermia (42 °C to 45 °C) consists of increasing the temperature of a localized area of the body that has been invaded by a tumor (Wust *et al.*, 2002). Elevated temperatures cause direct cytotoxicity of cancer cells. Protein denaturation and dysfunction of DNA repair mechanisms occur, resulting in cancer cell killing by apoptosis and/or necrosis (Bettaieb *et al.*, 2013; Harnicek *et al.*, 2016; Lepock, 2005; Richter *et al.*, 2010). Hyperthermia modifies immune response, tumor microenvironment, oxygen supply, and causes vascular damages in solid tumor (Oei *et al.*, 2017). Despite its progress in the clinic, the basic understanding of molecular mechanisms underlying responses to lethal and non-lethal heat shock, in tumor cells, is still not entirely established (Milleron et Bratton, 2007; Velichko *et al.*, 2013).

When cells are exposed to hyperthermia (42 to 45 °C) for shorter times (e.g. 30 to 60 min) or to lower heat (39 to 40 °C) for longer times (e.g. 3 h to 24 h), they can develop transient resistance to subsequent toxic stress such as heat shock, environmental stress, insults such as oxidative stress, or chemotherapeutic agents (Bettaieb et Averill-Bates, 2008;

Pallepati et Averill-Bates, 2010; Singh et Hasday, 2013). This phenomenon, known as thermotolerance, is associated with the increase expression of cellular defenses such as heat shock proteins (Hsp) (Landry *et al.*, 1982; Singh et Hasday, 2013; Subjeck *et al.*, 1982) and antioxidants (Pallepati et Averill-Bates, 2010), diminishing pro-apoptotic effects of hyperthermia on cells. These protective factors enable cells to continue to function normally despite exposure to extreme stress and toxic aggressions.

Autophagy occurs during non-optimal nutritional and environmental conditions (hypoxia, nutrient deprivation, infections, etc.) (Pallepati et Averill-Bates, 2012). Autophagy is generally considered to be a survival mechanism and can be activated in response to different and hostile conditions such as oxidative stress and protein aggregation. It is thus conceivable that mild stress such as thermotolerance at 40 °C could activate autophagy. Autophagy is a highly conserved process that is characterized by the formation of autophagosomes, double membrane vesicles assembling cytoplasmic components as well as damaged organelles. Autophagosomes are transported and fused with acidic compartments, forming autolysosomes. Once inside the autolysosome, degradation and recycling of the cellular components occurs (Lin et Baehrecke, 2015). The regulation of autophagy involves several autophagy-related genes (Atg) and proteins. The mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is a central regulator of autophagy, which integrates under different nutrients, energy and stress signals (Wesselborg et Stork, 2015). The mTORC1 protein complex inhibits autophagy by phosphorylating ULK1 in the unc-51-like-kinase (ULK)-Arg13-FIP200-Atg101 complex and can be blocked by rapamycin (Jung *et al.*, 2009; Sarkar, 2013). A multiprotein complex composed of class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Vsp34, the adaptor Vsp15 (p150) and Beclin-1 (Atg6) is important for the formation of autophagosomes (He et Levine, 2010). Beclin-1 can be inhibited through binding to Bcl-2 (Wesselborg et Stork, 2015) and by chemical agents such as 3-methyladenine (3-MA) that act on PI3K (Wu *et al.*, 2010). Moreover, two conjugation systems are involved in the elongation of the autophagosome: the Atg5-Atg12 system and the Atg8/light chain 3 (LC3)-phosphatidylethanolamine (PE) system. LC3 is a protein specific to the mechanism of autophagy and is often studied as a marker of the autophagosome membrane (Chen *et al.*, 2011). LC3-I undergoes cleavage to form LC3-II, which conjugates with PE and associates

with the autophagosome membrane until its degradation in the lysosome. Atg5-Atg12 forms a complex with Atg16L1 and is mainly found at the pre-autophagosome, whereas LC3-PE is present at the autophagosomal membrane entirely throughout vesicle biogenesis (Wesselborg et Stork, 2015). The fusion of the autophagosome with lysosomes can be inhibited by bafilomycin A1 (Shacka *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 1998).

The exposure to lower doses of stressors such as heat shock can activate cell survival responses, whereas higher doses can trigger damage to cellular macromolecules and cytotoxicity. Apoptosis is a cell death process that can be promoted by lethal heat shock, through the three main pathways of apoptosis: the external death receptors pathway and the intrinsic pathways involving mitochondria or endoplasmic reticulum (ER) (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015; Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Milleron et Bratton, 2007; Shellman *et al.*, 2008). These apoptotic signals trigger the activation of cysteine-independent aspartate specific proteases (caspases) (Pallepati et Averill-Bates, 2012, 2012; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016; Shalini *et al.*, 2015). The death receptors pathway, involves the activation of the initiator caspase-8 or -10 (Pennarun *et al.*, 2010). In the ER-mediated apoptosis, a high calcium efflux from the ER allows cleavage and activation of the caspase-4/12 by m-calpain, a calcium-dependent cysteine protease (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016; Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). Caspase-4/12 can also be activated by caspase-7 translocated into the ER membrane in response to excess ER stress. Caspase-9 is involved in the mitochondrial pathway induced by the mitochondrial permeabilization from B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2) family and noxious stress (Glory *et al.*, 2014; Orrenius *et al.*, 2015; Würstle *et al.*, 2012). An active caspase recognizes a specific amino acid sequence in the polypeptide chain of their target and hydrolyses its peptide bond at the carboxyl end of the aspartate residue. Once activated, the initiated caspases elicit a caspase cascade by the cleavage of inactive zymogens (pro-caspase) into effector caspases (Salvesen et Riedl, 2008). These active effector caspases, particularly the terminal caspase-3, cleave in turn a number of structural protein such as actin, lamin A and poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), generating a variety of morphological features in the cell that results in the formation of apoptotic bodies (Pallepati et Averill-Bates, 2012; Wyllie, 2010). These bodies expose

phosphatidylserine on the outer layers of their plasma membrane and are eliminated via a rapid phagocytic recognition by macrophages (Bratton *et al.*, 1997).

A better understanding of the antagonistic pro-survival versus pro-death mechanisms is required to enable the optimization of hyperthermia treatments. This study aims to determine if autophagy is activated as a survival mechanism during relatively short exposure times to thermal stress at 42 °C, in HeLa cervical carcinoma cells. It will also determine if low dose of heat exposure during mild thermotolerance developed at 40 °C can induce autophagy as an adaptive survival response. We will verify whether autophagy protects cells against lethal heat shock at 42 °C. This study will further define if the inhibition of autophagy leads to induction of apoptosis by heat shock at 42 °C and which of the different apoptotic pathways is involved. The results of this study should improve the understanding of mechanistic aspects of autophagic and apoptotic pathways in relation to induction of adaptive survival and pro-apoptotic signals by low versus high doses of heat in some cells.

2.2.4. Materials and methods

Cell Culture

Human cervical adenocarcinoma HeLa cells (ATCC no. CCI-2) were cultured as monolayers in tissue culture flasks (Sarstedt, St Laurent, QC, Canada) containing Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Canada), penicillin (50 units/ml) and streptomycin (50 µg/ml) (Flow Laboratories, Mississauga, ON) and maintained in an incubator at 37 °C with a humidified atmosphere of 5% CO₂ (Glory *et al.*, 2014). Cell culture medium was replaced with fresh medium 24 h before experiments. To induce thermotolerance, cells confluent at 90% were transferred to an incubator at 40 °C for 3 h, following a period of 20 min to allow culture medium temperature to reach 40 °C (Glory *et al.*, 2014). Cells were then harvested using 0.5 mg/ml trypsin/0.2 mg/ml EDTA in phosphate buffered saline (PBS) and washed by centrifugation (1000 x g, 3 min).

Chemicals and heat treatments

Freshly harvested non-thermotolerant (3 h at 37 °C) and thermotolerant (3 h at 40 °C) HeLa cells were resuspended in DMEM/10% FBS at 1×10^6 cells/ml in a final volume of 1 ml. They were pretreated either with or without bafilomycin A1 (1 μ M) or 3-methyladenine (2 mM) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) for one hour in an incubator at 37 °C with humidified atmosphere of 5% CO₂ (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). Cells were then heated at 42 °C relative to controls (37 °C) for 5 min to 3 h in temperature-controlled precision waterbaths (± 0.02 C) (Haake D8, Fisher Scientific, Montreal, QC). One mL of cell suspension reached a temperature within 0.1 °C of the waterbath temperature within 3 min (Glory et Averill-Bates, 2016). Cells were also treated with rapamycin (1 μ M) (Invitrogen, Molecular Probes, OR, USA) for 3 h to induce autophagy as a positive control (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). Cells were then washed by centrifugation (1000 x g, 3 min) to remove chemicals, and analyzed for levels of acidic vesicular organelles (AVO), Beclin-1 and LC3 expression, Annexin V levels and caspase or calpain activities.

Fluorescence microscopy analysis of autophagy

Cells were suspended in PBS containing 50 nM LysoTracker Red DND 99 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and incubated for 30 min at 37 °C. Cells were then transferred onto a microscope slide using a cytocentrifuge (800 RPM, 1 min) (Wescor Cytopro 7620 Cytocentrifuge). Cells were visualized by fluorescence microscopy (100 X) (model Eclipse TI 3000 inverted microscope, Nikon, Montreal, QC, Canada) and photographs were taken by digital camera. Images were analyzed using Image J software (National Institutes of Health (NIH), Maryland, USA) (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016).

Western Blot analysis

Cells were washed by centrifugation (1000 x g, 3 min) in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM 3-(N-morpholino)propane sulfonic acid (MOPS), pH 7.4) (Samali *et al.*, 1999). The supernatant was discarded and pelleted cells were resuspended in lysis buffer (20 mM MOPS, 80 mM β -glycerolphosphate, 10% glycerol, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 20 mM Na₄P₂O₇, 1 mM NaF, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1% Triton X-100,

pH 7, and a cocktail of protease inhibitors containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM aprotinin, 10 μ M pepstatin A, 10 μ M leupeptin, 25 μ M calpain inhibitor (*Complete Mini*, Roche Mississauga, ON), pH 7.4) and frozen overnight. Following a period of thawing on ice for 30 min with constant vortexing and a 10 min centrifugation (2500 x g), whole cell lysates were collected, removing nuclei and unbroken cells. Proteins were quantified with the Bradford method (Bio-Rad protein assay Mississauga, ON) and 30 μ g were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (15%), immunodetection was carried out by Western blotting using rabbit primary antibodies recognizing Beclin-1 (D40C5) or LC3A/B (D3U4C) (1:1000) and horseradish peroxidase-conjugated polyclonal secondary antibody (1:5000) (Cell Signaling Technology, USA). Protein expression was analyzed relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) (D16H11) (1:5000) using a laser scanning densitometer (Fusion Fx7, MBI, Montreal, QC) and Quantity one software (Bio-Rad, Mississauga, ON) (Glory *et al.*, 2014).

Caspase and calpain activity

Cells were suspended in caspase buffer (10% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 20 mM 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES), 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.2) and then frozen at -80 °C overnight. Enzymatic activity was determined in cell lysates using the appropriate substrate (200 μ M): Ac-DEVD-AMC for caspase-3, Ac-LEHD-AFC for caspase-9, MCA-VDQVGWK-(DNP)-NH₂ for caspase-7 (Cayman Chemical), Z-IETD-AFC for caspase-8, Ac-LEVD-AFC for caspase-4 and Suc-LY-AMC for calpain activity (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) (Glory *et al.*, 2014; Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). The kinetic reactions to generate aminotrifluoromethylcoumarin (AFC) (excitation 400 nm, emission 505 nm), amino-methylcoumarin (AMC) (ex. 380 nm, em. 460 nm) or methoxycoumarin-acetyl (MCA) (ex. 325 nm, em. 392 nm) were detected by spectrofluorometry (Infinite M1000 PRO, Tecan, San Jose, CA, USA).

LC3 immunofluorescence

Prior to experiments, 0.5×10^6 cells/ml were attached in 35 mm petri dishes for 24 h

(Ibidi, Madison, WI, USA). Cells were heated for 5 to 60 min at 42 °C, then fixed using 3.7% formaldehyde for 15 min in the dark and then rendered permeable with blocking solution (PBS, 5% bovine serum albumin (BSA), 5% normal goat serum and 0.1% Triton X-100). Cells were then incubated overnight at 4 °C with primary antibody against LC3 (1:400) (Cell Signaling Technology) in blocking solution followed by a 2 h incubation with Alexa-488-conjugated anti-rabbit antibody (1:1000) (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at room temperature. Cells were then incubated with 50 nM LysoTracker Red DND 99 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in PBS for 30 min at 37 °C. Cell nuclei were labeled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (6.25 µg/ml) during 15 min (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). Cells were rinsed 3 times with PBS after each incubation procedure. Fluorescence observations were made by confocal microscopy (400X) (model MRC-1024ES, Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd. St Laurent, QC) and photographs were taken by digital camera. Images were analyzed using FIJI software (NIH, Maryland, USA). Fluorescence intensities were reported to the number of cells and compared between treated and untreated samples.

Measurement of cell death

Apoptotic and necrotic cells were analyzed by flow cytometry (Accuri C6, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using the FL-1 and FL-3 detectors, respectively, for Annexin V-FITC (1 µg/ml) (Molecular Probes) and propidium iodide (PI) (1 µg/ml). Measurements were made in 10,000 to 15,000 cells per condition (Glory et Averill-Bates, 2016).

Statistics

Data represent means \pm SEM from at least three independent experiments performed in duplicate. Comparisons among multiple groups were made by one-way or two-way ANOVA, which measures the linear contrast of means. The Bonferroni-Holmes adjustment was applied to control for the family-wise error rate at a desired level ($\alpha= 5\%$). The software used was GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For significant differences, $p < 0.05$.

2.2.5. Results

Activation of autophagy by heat shock at 42 °C

The induction of autophagy was first detected by levels of AVOs in non-thermotolerant cells (N, 37 °C, 3 h) after exposure to heat shock (42°C) for times from 15 to 60 min (Fig. 2.1a). AVOs are formed by the fusion of autophagosomes with lysosomes and were detected by fluorescence microscopy using LysoTracker red. In non-thermotolerant (N) cells, levels of AVOs increased gradually after 15 to 45 min of heating by 20 to 40%, relative to unheated control cells (N, 0 at 42 °C). Thereafter, the percentage of LysoTracker red fluorescence decreased at 60 min (Fig. 2.1a) and at longer times (data not shown). As a positive control, rapamycin, a common activator of autophagy (Thoreen et Sabatini, 2009), was used. Treatment with rapamycin at 37 °C significantly increased levels of AVOs in HeLa cells compared to the untreated control (Fig. 2.1b). Together, these results indicate that autophagy is transiently activated by a short exposure to heat shock at 42 °C.

The role of autophagy in the formation of AVOs at 42 °C was clarified by the use of two chemical inhibitors of autophagy, 3-methyladenine (3-MA) or bafilomycin A1 (Baf.). These two inhibitors act at different stages in the autophagy process: 3-MA inhibits PI3K involved in the formation of autophagosome and Baf. acts late in the process by inhibiting vacuolar H⁺ ATPase and preventing the degradation of cellular components (Bowman *et al.*, 1988; Redza-Dutordoir *et al.*, 2016; Seglen et Gordon, 1981). 3-MA decreased LysoTracker red fluorescence to basal control level in cells heated at 42 °C, whereas Baf. reduced fluorescence to about 25% of the control level (100%) (Fig. 2.1c). These results confirm the formation of AVOs and induction of autophagy by 42 °C heat shock in HeLa cells.

Subsequently, we verified whether activation of apoptosis or even necrosis occurred at 42 °C under conditions where autophagy was induced. During apoptosis, phosphatidylserine on the intracellular side of the plasma membrane bilayer become exposed at the outer surface of the membrane and can be labeled with Annexin V (Bratton *et al.*,

1997). Apoptosis and necrosis were detected by flow cytometry using Annexin V-FITC and PI, respectively (Fig. 2.1d and supplementary Fig.4.3). The percentage of live cells for non-thermotolerant cells remained constant at around 80%, when cells were heated at 42 °C, for up to 60 min (Fig. 2.1d). Death rates for apoptosis and necrosis in control cells were very low (< 10%) and did not change during heating for 60 min (Fig. 2.1d). Therefore, the formation of AVOs in cells that were exposed to heat shock at 42 °C for up to 60 min corresponds to induction of autophagy and not cell death.

Enhanced activation of autophagy by 42 °C heat shock in mild thermotolerant (40 °C) cells

The induction of autophagy at 42 °C was subsequently evaluated in cells for which mild thermotolerance was developed at 40 °C during 3 h (TT, 40 °C) (Fig. 2.1a). In thermotolerant (TT) cells, levels of AVOs were significantly enhanced by 40% after 15 min at 42 °C and continued to increase up to 60 min, compared to the control (100% N, 0 at 42 °C) (Fig. 2.1a). Nevertheless, the intensity of fluorescence was higher in thermotolerant cells relative to non-thermotolerant cells at each time point. There was no increase in cell death at 42 °C in TT cells under these conditions (Fig. 2.1d).

Heat shock (42 °C) increases expression of autophagy proteins Beclin-1 and LC3

The activation of autophagy by 42 °C heat shock was further evaluated through the expression of Beclin-1 and LC3 proteins (Fig. 2.2). Beclin-1 is important in the initiation of the autophagy process. It interacts with PI3K class III and is required for the localization of autophagic proteins to the pre-autophagosome (He et Levine, 2010). Beclin-1 expression increased during heat exposure in non-thermotolerant (N) cells, reaching a maximum level of 40% increase after 5 to 10 min (Fig. 2.2a). Thereafter, Beclin-1 expression gradually decreased, returning to the basal level (100%) by 60 min. When heated at 42 °C, the time-dependence for the expression profile of Beclin-1 in thermotolerant (TT) cells was similar to that in non-thermotolerant cells. However, Beclin-1 expression was 10 to 20% higher in thermotolerant cells throughout heating at 42 °C. In unheated controls (T = 0), Beclin-1 expression was 30% higher in thermotolerant compared to their non-thermotolerant counterparts (Fig. 2.2a).

The conversion of LC3-I to LC3-II is necessary for the elongation and maturation of autophagosomes (Kabeya *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012). Similar to Beclin-1, heat shock at 42 °C increased LC3-II protein expression in both non-thermotolerant (N) and thermotolerant (TT) HeLa cells (Fig. 2.2b). In non-thermotolerant cells, LC3-II expression increased after 5 min at 42 °C to a maximum increase of 70% at 15 min and then decreased to the control level after 30 min (N, 0 at 42 °C, 100%). In thermotolerant cells, LC3-II expression increased from 5 to 30 min and returned to the control level after 45 min (Fig. 2.2b). LC3-II expression tended to be higher in thermotolerant cells during exposure to 42 °C heat shock for 5 to 30 min, compared to non-thermotolerant cells (Fig. 2.2b). Hence, expression of Beclin-1 and LC3-II increased after relatively short (5 min to 15 min) heating time periods at 42 °C in HeLa cells.

Furthermore, LC3-I expression was higher in thermotolerant versus normal untreated controls (Fig. 2.2b). Heat shock treatment at 42°C increased the expression of LC3-I in both normal and thermotolerant cells. The kinetics of induction and maximum expression for LC3-I and LC3-II were different. In normal cells, maximum expression of LC3-II occurred after 15 min at 42°C. In thermotolerant cells, expression of LC3-I was maximal after 5 min at 42°C, whereas maximum expression of LC3-II occurred after 15 min.

Subsequently, during autophagic processes, LC3-II is localized on the outer and inner membrane of the autophagosome until it is degraded by the lysosomes (Ni *et al.*, 2011). The colocalisation of LC3 fluorescence with that of AVOs during 42 °C heat shock was evaluated by confocal microscopy, using an Alexa 488-coupled-LC3-targeted antibody (Fig. 2.3). LC3 immunofluorescence (Fig. 2.3a) and Lysotracker red fluorescence of AVOs (Fig. 2.3b) both increased at 42 °C in non-thermotolerant (N) cells and were higher in thermotolerant (TT) cells. The merged images (far right panels) show that LC3 colocalised with AVOs in both non-thermotolerant (Figs. 2.3c) and thermotolerant (Fig. 2.3d) cells. This indicates that heat shock caused LC3 to associate with autolysosomes, thus allowing the autophagic process.

Inhibition of autophagy sensitizes cells to lethal heat shock-induced apoptosis

Autophagy appears to act primarily as a survival mechanism to preserve cellular homeostasis under conditions of endogenous stress (Lin et Baehrecke, 2015). Toxic agents can also activate autophagy; however if the stress is too severe or prolonged, autophagy appears to engage cells in death processes (Orrenius *et al.*, 2013). It is unclear whether autophagy itself acts as a death mechanism and/or whether it synergizes with other modes of cell death such as apoptosis.

Therefore, we determined the impact of autophagy inhibition on apoptotic cell death in HeLa cells under conditions of exogenous toxic stress. Exposure to 42 °C heat shock for 3 h, in non-thermotolerant cells without inhibitors, caused a significant increase of 1.7-fold in apoptosis compared to unheated cells (Fig. 2.4a). Moreover, activity of the execution phase caspase-3 was significantly increased by 45% and 75% after 2 to 3 h of heat exposure, respectively, compared to unheated controls (N at 37 °C) (Fig. 2.4b).

Subsequently, the inhibition of autophagy with 3-MA caused a pronounced and significant 1.7-fold increase in apoptosis after 3 h of exposure to lethal heat shock at 42 °C. When cells were treated with the inhibitor Baf., there was a much smaller increase in heat shock-induced apoptosis compared to the effect of 3-MA (Fig. 2.4a). These results were confirmed by measuring caspase-3 activity (Fig. 2.4b); Inhibition of autophagy by 3-MA exacerbated heat shock-induced caspase-3 activation, with an approximately 2.2-fold increase after 2 to 3 h, compared to unheated controls (with inhibitors) (Fig. 2.4b). There were also smaller increases in caspase-3 activity in cells treated with Baf. (Fig. 2.4b). The two inhibitors caused significant increases in basal levels of apoptosis and caspase-3 activity in unheated controls showing that 3-MA and Baf. caused some toxicity (Figs. 2.4a and 2.4b). Despite this effect, inhibition of autophagy sensitized HeLa cells to 42 °C heat shock-induced apoptosis. This shows that autophagy plays a role in protecting cells against exogenous toxic stress.

Autophagy is partially responsible for the protective effect of thermotolerance against lethal heat shock-induced apoptosis

Mild thermotolerance developed at 40 °C was shown to protect HeLa cells against hyperthermia-induced apoptosis (Bettaieb et Averill-Bates, 2015; Bettaieb et Averill-Bates, 2005). The levels of apoptosis (Fig. 2.4a) and caspase-3 activation (Fig. 2.4b) were significantly reduced in mild thermotolerant (TT) cells after a 3 h exposure to 42 °C heat shock. Pre-conditioning of cells at 40 °C enhanced levels of autophagy in HeLa cells (Figs. 2.1 to 2.3) and this could be involved in alleviating cellular sensitivity towards lethal heat shock at 42 °C. Therefore, the role of autophagy in the protective effect of mild thermotolerance against apoptosis was evaluated. However, heat shock-induced apoptosis was enhanced in thermotolerant cells treated with autophagy inhibitors 3-MA or Baf., compared to unheated thermotolerant cells (with inhibitors) (Fig. 2.4a). The activation of caspase-3 also increased when thermotolerant (TT) cells were treated with inhibitors (Fig. 2.4b). Hence, inhibition of autophagy, particularly with 3-MA, rendered thermotolerant cells as well as non-thermotolerant cells more sensitive to apoptosis induced by lethal heat shock at 42 °C. Despite inhibition of autophagy, the activation of apoptosis in thermotolerant cells was lower than in non-thermotolerant cells, indicating a residual protective effect against toxic heat shock. Thus, the protective effect of mild thermotolerance against heat-shock-induced apoptosis was partially lost under conditions of autophagy inhibition.

Inhibition of autophagy sensitizes cells to 42 °C heat shock-induced apoptosis through the three main pathways

Hyperthermia causes apoptosis by three main signaling pathways involving death receptors, mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER), which entails the activation of specific caspases (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015; Bettaieb et Averill-Bates, 2005). To better understand the crosstalk between autophagy and apoptosis during stress induced by 42 °C heat shock, this study evaluated activation of different caspases in each of these three apoptotic pathways under conditions of autophagy inhibition.

Caspase-9 and caspase-8 are the initiator proteases of the mitochondrial and death receptors apoptotic pathways, respectively. The exposure of non-thermotolerant (N) cells to

heat shock at 42 °C for 1 h or 2 h increased the activation of caspase-9 (Fig. 2.5.a) and caspase-8 (Fig. 2.5b). The inhibition of autophagy with 3-MA significantly enhanced activation of caspase-9 (Fig. 2.5a) and caspase-8 (Fig. 2.5b), by 1.2 to 2-fold compared to unheated cells with inhibitors (N control). The inhibition of autophagy with Baf. led to a small increase in of caspase-9 activity (Fig. 2.5a), whereas no change occurred for caspase-8 (Fig. 2.5b). Mild thermotolerant (TT) cells underwent increases in activation of caspase-9 and caspase-8 under heat shock at 42 °C, both with or without inhibitors (Fig. 2.5). However, mild thermotolerance (40 °C) still provided partial protective effects against 42 °C-induced activation of caspase-9 and caspase-8, compared to non-thermotolerant cells (Fig 2.5a and 2.5b). Hence, inhibition of autophagy using 3-MA and Baf. renders HeLa cells more sensitive to heat-shock induced apoptosis mediated by the mitochondrial pathway, whereas only 3-MA enhanced death receptor-mediated apoptosis.

Activation of the ER pathway of apoptosis by heat shock involves multiple proteases such as calpain, caspase-4 and caspase-7 (Bettaieb et Averill-Bates, 2015). To investigate the impact of autophagy inhibition on the induction of ER-mediated apoptosis by 42 °C heat shock, the activation of these proteases was monitored. In non-thermotolerant (N) cells, heat shock triggered activation of caspase-4 by 20% (Fig. 2.6a), caspase-7 by 15% (Fig. 2.6b) and calpain by 15 to 50%, compared to unheated cells (Fig 2.6c). In thermotolerant (TT) cells, the activation of these three proteases by heat shock was diminished by 5 to 30%, compared to non-thermotolerant cells (Fig. 2.6). The inhibition of autophagy with 3-MA caused a significant 1.2 to 1.4-fold increase in the activation of caspase-4, caspase-7 and calpain, compared to unheated cells with inhibitors (Fig. 2.6). On the other hand, inhibition with Baf. had no effect on activation of these three in proteases (Fig. 2.6). In mild thermotolerant cells, autophagy inhibition with 3-MA led to enhanced activation of caspase-4, -7 and calpain but to lower levels than in non-thermotolerant cells. Hence, protective effect of mild thermotolerance against heat shock was only partially lost when autophagy was inhibited. Thus, the inhibition of autophagy enhanced hyperthermia induced-apoptosis through the ER.

2.2.6. Discussion

Activation of autophagy by heat shock

This study shows that autophagy was induced in HeLa cells immediately following exposure to heat shock at 42 °C for relatively short times from 5 to 60 min. Activation of autophagy was transient and was already diminishing by 60 min. The induction of autophagy at 42 °C was revealed by increased levels of acidic vesicular organelles (AVOs) and increased protein levels of Beclin-1 and LC3-II. The doses of heat shock that activated autophagy were lower than those required to trigger apoptosis. Autophagy was activated after shorter exposure times (< 60 min) at 42 °C, whereas apoptosis-associated initiator caspases (-8, -9, -4) were activated after longer times at 42 °C from 1 h to 2 h. End stage apoptotic events such as caspase-3 activation and nuclear chromatin condensation were activated after 3 h at 42 °C.

Heat shock can denature cellular proteins, as well as damaging other cellular targets (Bergs *et al.*, 2016; Bettaieb *et al.*, 2013; Hildebrandt *et al.*, 2002; Roti et Joseph, 2008). In addition, heat shock (40 to 43 °C) increases the generation of reactive oxygen species (ROS) in HeLa cells (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Glory *et al.*, 2014; Pallepati et Averill-Bates, 2010). This likely results from increased generation of superoxide in the mitochondrial respiratory chain; superoxide is then converted to hydrogen peroxide that can diffuse from mitochondria into the cytosol (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Bettaieb *et al.*, 2013). ROS cause damage to macromolecules such as proteins, lipids and nucleic acids, in addition to cellular targets such as membranes and organelles. ROS were shown to regulate autophagy as a survival mechanism in various cancer cells including HeLa cells (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). Thus, stress-induced damages to cellular targets can trigger autophagy as a survival response to ensure cellular homeostasis and survival. Autophagy allows the removal of damaged components and recycling of their degraded subunits for other purposes such as biosynthesis and ATP generation.

Autophagy was activated by 42 to 43 °C heat shock in several other cell types, but generally following recovery periods at 37 °C for 2 to 48 h. In human glioma cells, heat

shock (43 °C for 2 h) caused formation of vacuoles and AVOs, under conditions that did not induce apoptosis (Komata *et al.*, 2004). The conversion of LC3-I to LC3-II was reported in several cell types that were heated at 43 °C for 30 min and allowed to recover at 37 °C for 3 to 48 h (Zhao *et al.*, 2009). Heat shock (43 °C, 1 h) stimulated mitochondrial autophagy (mitophagy) in both ASTC-a-1 lung and HeLa cells after a recovery period (37 °C for 2-4 h) (Yang *et al.*, 2010). In a mouse spermatocyte cell line, conversion of LC3-I to LC3-II and upregulation of Atg7 occurred following heat stress (42 °C for 3 h) and recovery (37 °C for 3-24 h) (Zhang *et al.*, 2012).

The transcription factor NF- κ B was activated by heat shock (43 °C for 90 min) in HeLa cells and shown to play an important role in cell recovery from stress during 0 to 24 h (Kretz-Remy *et al.*, 2001; Nivon *et al.*, 2009). NF- κ B is activated through the degradation of its inhibitor κ -B (I κ B) (Dutta *et al.*, 2006; Karin, 2006; Kretz-Remy *et al.*, 2001; Nivon *et al.*, 2009). Once dissociated from I κ B, NF- κ B migrates into the nucleus and activates the transcription of numerous genes involved in physiological processes (e. g. cell proliferation, survival and death, inflammation and immune responses) (Pietrocola *et al.*, 2013). The activation of NF- κ B was triggered by the accumulation of unfolded or aggregated proteins after 43 °C heat shock (Nivon *et al.*, 2009). NF- κ B-activated autophagy appears to be essential for cell survival and likely acts as a mechanism to help the cell to cope with thermal stress through the clearance of damaged proteins (Nivon *et al.*, 2009). The Bcl2-associated athanogene 3 (BAG3)-Hsp22 complex was upregulated by NF- κ B and appeared to be involved in the clearance of toxic protein aggregates induced by heat shock (Nivon *et al.*, 2012). BAG3 is a member of the BAG family of co-chaperones that interact with the ATPase domain of Hsp70. Therefore, NF- κ B appears to work alongside Hsps in the degradation of heat shock-induced protein aggregation, thus promoting cell recovery (Nivon *et al.*, 2009).

Role of autophagy in the protective effect of mild thermotolerance (40 °C)

The levels of autophagy markers (Beclin-1, LC-II and AVOs) were also higher in mild thermotolerant HeLa cells immediately following preconditioning at a non-lethal temperature of 40 °C, compared to non-thermotolerant cells. Following exposure to heat shock at 42 °C, the levels of autophagy were further enhanced in mild thermotolerant cells to

levels above those obtained in heated non-thermotolerant cells. These mild thermotolerant cells were resistant to apoptosis and activation of caspases-3, -4, -8, -7 and -9 at 42 °C, suggesting that these higher levels of autophagy contribute to cellular protection against heat shock-induced apoptosis. Thus, the induction of autophagy at 40 °C appears to correspond to an adaptive cell survival response.

Mild thermotolerance developed at 40 °C can increase other cellular defense systems, involving chaperones such as Hsps 27, 32, 72, 90 and 110 (Bettaieb et Averill-Bates, 2008), and antioxidants such as catalase, glutathione and manganese superoxide dismutase (MnSOD) (Pallepati et Averill-Bates, 2010). Hsps can remove damaged and unfolded proteins and protein aggregates from cells, thus promoting cellular homeostasis and favoring survival (Dokladny *et al.*, 2015; Hartl et Hayer-Hartl, 2002; Klionsky et Codogno, 2013; Zhang et Calderwood, 2011). Antioxidants detoxify ROS and can prevent oxidative damage to cellular targets (Pallepati et Averill-Bates, 2010). MnSOD detoxifies superoxide, whereas catalase and glutathione detoxify peroxides. The overexpression of Hsp27, Hsp72 and Hsp90 has been implicated in cellular protection against apoptosis (Mao *et al.*, 2003; Mehlen *et al.*, 1996; Mosser *et al.*, 1997).

Mild thermotolerance induced by pre-conditioning HeLa cells at a non-lethal temperature of 40 °C protects cells against apoptosis induced by subsequent lethal heat shock at 42 °C (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015). Indeed, the activation of caspase-8, -9, calpain, caspase-4 and -7 at 42 °C was diminished in mild thermotolerant cells. This protective effect of mild thermotolerance against hyperthermia-induced apoptosis through the ER was shown to be mediated in part by Hsp72 (Bettaieb et Averill-Bates, 2015). ShRNA-mediated Hsp72 depletion diminished the protective effects of mild thermotolerance (40 °C) against heat shock and sensitized cells to ER-mediated apoptosis. Moreover, it was reported that autophagy is activated in response to ER stress and involves the IRE1/ α -JNK pathway (Ogata *et al.*, 2006). Autophagy appears to play a role in the protective effect of mild thermotolerance against heat shock-induced apoptosis in HeLa cells.

Autophagy and Hsps are distinct systems of cellular protein quality control that appear to coordinate to prevent cell death under conditions of stress (Dokladny *et al.*, 2015;

Zhao *et al.*, 2009). The heat shock response was shown to regulate autophagy. Heat shock factor-1 (Hsf-1) is the central regulator of Hsp gene expression. Deletion of Hsf-1 increased basal levels of autophagy (Dokladny *et al.*, 2013). Hsp70 over-expression inhibited the induction of autophagy by either starvation or rapamycin. On the other hand, a constitutively active Hsf-1 mutant inhibited the basal level of LC3-II protein and prevented induction of autophagy in heated cells (Zhao *et al.*, 2009).

Inhibition of autophagy sensitizes cells to heat shock-induced apoptosis

Autophagy was inhibited using 3-MA and Baf. in HeLa cells. 3-MA acts on the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) implicated in the activation of mTOR, a key regulator in the earlier stages of autophagy. 3-MA inhibits the class III PI3K, thus blocking autophagosome formation and inhibiting autophagy, but it can also suppress the class I PI3K, leading to activation of autophagy (Wu *et al.*, 2010). The 3-MA concentration (2 mM) used in our conditions suppressed autophagy. The inhibition of autophagy with 3-MA in HeLa cells caused a large increase in caspase activation and apoptosis during 42 °C heat shock in comparison to cells subjected to heat shock alone (no inhibitor). Baf. inhibits the vacuolar H⁺ ATPase, altering lysosomal acidification (Yamamoto *et al.*, 1998). Thus, it affects later stages of autophagy by blocking fusion between autophagosomes and lysosomes, preventing the maturation of autophagic vacuoles and degradation of cellular material in autophagosomes. Baf. had little effect on heat-induced apoptosis in HeLa cells, compared to 3-MA. When 43 °C heat shock was combined with 3-MA in ASTC-a-1 and HeLa cells, caspase-3 activation and apoptosis were increased (Yang *et al.*, 2010). The inhibition of autophagy in human glioma cells with Baf., but not 3-MA, increased 43 °C heat shock-induced cell death, detected using the trypan blue exclusion assay (Komata *et al.*, 2004). The results from our study and that of Komata's group suggest that the effect and toxicity of these autophagy inhibitors are dependent on the sensitivity of each different cell line. Together, these studies suggest that inhibition of autophagy increases cell death and could prove to be beneficial by increasing the anticancer efficacy of hyperthermia against certain types of tumors such as glioma and cervical carcinoma.

Hyperthermia can induce apoptosis through the three main signaling pathways involving death receptors, mitochondria and the ER pathway in HeLa cells (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015). Surprisingly, autophagy inhibition using 3-MA sensitized cells to 42 °C heat shock-induced apoptosis through all three of these pathways. Heat shock-induced activation of the death receptor pathway involves upregulation of Fas ligand (FasL) and caspase-8 activation (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Morlé *et al.*, 2015). Activation of the mitochondrial pathway of apoptosis by heat shock involves cytochrome c release from mitochondria and caspase-9 activation (Bettaieb et Averill-Bates, 2008). Furthermore, heat shock triggers activation of apoptosis through the ER pathway. This involves increased expression of the pro-apoptotic transcription factor CHOP, which mediates apoptosis by upregulation of pro-apoptotic genes (e.g. *Bim*, *PUMA* and *Bax*) and down-regulation of anti-apoptotic genes (e.g. *Bcl-2*) (Bettaieb et Averill-Bates, 2015; Malhotra et Kaufman, 2007). The ER proteases caspase-4, -7 and calpain are also involved in ER-mediated apoptosis during heat shock (Bettaieb et Averill-Bates, 2015). The inhibitory effect of 3-MA suggests that autophagy is able to protect HeLa cells against apoptosis induced through the main pathways of apoptosis during heat shock.

The interconnections between autophagy and apoptosis are complex and not entirely understood. Under more severe conditions of stress, which would likely overcome the protective capacity of cellular defenses, autophagy would need to be inhibited in order to allow apoptosis to occur. Several key molecules such as Bcl-2, calpain and caspases appear to be involved. Bcl-2 and B-cell lymphoma extra-large Bcl-X_L are anti-apoptotic proteins from the Bcl-2 family that are mainly found on the mitochondrial membrane, where they interact with and inhibit the function of pro-apoptotic proteins like Bax and Bak (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Bcl-2 and Bcl-X_L target proteins with BH3 domains. Beclin-1 possesses a BH3 domain and is thus a binding target for these anti-apoptotic proteins (He et Levine, 2010). When bound to Bcl-X_L and ER-localized Bcl-2, the involvement of Beclin-1 in the class III PI3K complex formation is abrogated, thus suppressing autophagy (Maiuri *et al.*, 2007). Moreover, in response to IL-3 depletion in Ba/F3 cells, caspases-8, -7 and -3 were shown to mediate Beclin-1 cleavage at specific sites (Djavaheri-Mergny *et al.*, 2010; Wirawan *et al.*, 2010). This not only resulted in inactivation

of Beclin-1 and compromised protective capacity of autophagy, but also in the formation of a Beclin-1-C fragment that localized to mitochondria, triggering cytochrome c release and apoptosis (Djavaheri-Mergny *et al.*, 2010; Wirawan *et al.*, 2010). Hence, Beclin-1 could play a role in mediating the conversion between autophagy and apoptosis.

Other autophagy-related proteins (Atg) were also implicated in the activation of apoptosis. Atg5 is required for the elongation of autophagosomes, however calpain-mediated Atg5 cleavage can trigger apoptosis. Cleaved Atg5 can associate directly with FADD, or translocate to mitochondria and interact with Bcl-X_L, thereby inducing apoptosis either through death receptors or by mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) (Yousefi *et al.*, 2006). Atg3 can be cleaved by caspase-8, thus inhibiting autophagy after activation of death receptor-mediated apoptosis (Oral *et al.*, 2012). In mouse embryonic fibroblasts, the autophagosomal membrane was shown to act as a platform for an intracellular death-inducing signaling complex (iDISC) that recruits procaspase-8, leading to caspase-8 activation (Young *et al.*, 2012). Moreover, Atg12 can bind directly to Bcl-2 and promote mitochondrial apoptosis (Rubinstein *et al.*, 2011). In addition to apoptosis-associated cleavage of Beclin-1 and Atg5, the cleavage of Atg4D by caspase-3 caused delipidation of LC3, which blocked autophagy and caused a cytotoxic effect (Betin et Lane, 2009). Consequently, it seems that once apoptosis is activated during more severe conditions of stress, pro-apoptotic molecules inactivate key autophagy-promoting molecules, leading to inhibition of autophagy and amplification of apoptosis.

2.2.7. Conclusion

This study provides new insights into the activation of autophagy and apoptosis by different doses of heat shock in HeLa cells. Autophagy was activated as a cellular survival response during shorter exposure times (< 60 min) to heat shock at 42 °C, whereas longer exposure times (1 to 3 h) triggered cell death by apoptosis. In mild thermotolerant cells at 40 °C, levels of autophagy were increased compared to non-thermotolerant cells. Levels of autophagy were also higher in mild thermotolerant cells during 42 °C heat shock under

conditions where they are resistant to 42 °C heat shock-induced apoptosis. The inhibition of autophagy triggered apoptosis at 42 °C through all of the three major signaling pathways, mitochondria, death receptors and the ER. This suggests that autophagy acts as cytoprotective mechanism during heat shock at 42 °C. Hence, autophagy could prove to be a therapeutic target to improve the antitumor effects of hyperthermia treatment. The improved understanding of autophagy in response to heat shock should help to optimize the efficacy of hyperthermia in the clinic.

2.2.8. Acknowledgments

The authors thank Mr. Denis Flipo (MSc) for assistance with confocal microscope and FACScan analyses and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (# 36725-11) (DAB) for financial support.

2.2.9. Figures

Figure legends

Fig. 2.1. Heat shock (42 °C) induces autophagy in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.

a. Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 °C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40 °C) cells were heated at 42 °C for 0 to 60 min then tracked for fluorescence of AVOs using Lysotracker Red. **b.** Non-thermotolerant cells were treated with 1 µM rapamycin for 3 h as a positive control and tracked for AVOs using Lysotracker red. **c.** Non-thermotolerant (N) cells were heated at 42 °C for 30 min, with or without inhibitors (inh.), 3-methyladenine (3-MA) or Bafilomycin A1 (Baf.) and analyzed for AVOs. **d.** Non-thermotolerant (N) and thermotolerant (TT) cells were heated at 42 °C for 0 to 60 min then labeled with Annexin V-FITC and Propidium Iodide to detect early and late apoptosis or necrosis by flow cytometry, relative to unheated

controls (N, 0 at 42 °C). A representative FACScan plot is provided to show the gating used for data analysis. FL3-H indicates PI fluorescence and FL1-H indicates Annexin V-FITC fluorescence. LL, LR, UR and UL represent living, early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells, respectively. For all images, scale bars are 100 μ m. Values for untreated controls (unheated or 0 μ M rapamycin) were normalized to 100%. Representative fluorescent microscope images (magnification 100 \times) are shown. Mean \pm SEM are from eight (a.) or four (b.-d.) independent experiments. $p < 0.05$ (*) or $p < 0.001$ (***) indicate a statistically significant difference between N and TT cells for each treatment. $p < 0.01$ (++) or $p < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between unheated and heated cells at 42 °C for either N or TT cells. $p < 0.001$ (###) indicates a significant difference between cells \pm inhibitor or rapamycin for non-thermotolerant cells.

Fig. 2.2. Heat shock (42 °C) enhances Beclin 1 and LC3 protein expression in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 °C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40 °C) cells were heated at 42 °C for 0 to 60 min and tracked for **a.** Beclin-1 and **b.** LC3-I and LC3-II. Protein expression was normalized to GAPDH loading controls and is relative to non-thermotolerant (N) controls (0 at 42 °C, 100 %). Representative Western blots are from three independent experiments (means \pm SEM). $p < 0.05$ (*) or $p < 0.001$ (***) indicate a significant difference between N and TT cells for each treatment. $p < 0.05$ (+), $p < 0.01$ (++) or $p < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between unheated and heated cells at 42 °C for either N or TT cells.

Fig. 2.3. LC3 protein expression is increased by heat shock (42 °C) in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 °C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40 °C) cells were heated at 42 °C for 0 to 60 min and analyzed for **a.** LC3 expression by immunofluorescence using confocal microscopy and for **b.** fluorescence of AVOs using Lysotracker Red, relative to the unheated control (N, 0 at 42 °C, 100%). **c.** Non-thermotolerant and **d.** thermotolerant cells were labeled with Alexa-488-anti-LC3 antibody (left panels), Lysotracker red (LTR) (middle left panels), DAPI (middle panels) and merges are in the two right panels. For all images,

scale bars are 100 μm . Representative images (magnification 400 \times) are from four independent experiments (mean \pm SEM). $p < 0.001$ (***) indicates a significant difference between N and TT cells for each treatment. $p < 0.01$ (++) or $p < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between unheated and heated cells at 42 $^{\circ}\text{C}$ for either N or TT cells.

Fig. 2.4. Inhibition of autophagy increases heat shock (42 $^{\circ}\text{C}$) induced apoptosis: protective effect of mild thermotolerant (40 $^{\circ}\text{C}$).

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 $^{\circ}\text{C}$) and thermotolerant (TT, 3 h, 40 $^{\circ}\text{C}$) cells were pretreated with or without the inhibitors Baf. or 3-MA at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h, then were exposed to lethal heat shock at 42 $^{\circ}\text{C}$ for 2 and 3 h. **a.** Levels of apoptosis were detected by flow cytometry using Annexin V-FITC and Propidium Iodide. **b.** Enzymatic activity of caspase-3 was determined relative to untreated cells (N, 0 at 42 $^{\circ}\text{C}$, 100%). Data represent means \pm SEM from four (a.) or five (b.) independent experiments. $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***) indicate a significant difference between N and TT cells for each treatment. $p < 0.01$ (+), $p < 0.01$ (++) or $p < 0.001$ (+++) indicate a significant difference between cells \pm inhibitor for either N or TT cells. $p < 0.05$ (#) or $p < 0.001$ (###) indicate a statistically significant difference between unheated and heated cells at 42 $^{\circ}\text{C}$ for either N or TT cells.

Fig. 2.5. Inhibition of autophagy increases heat shock (42 $^{\circ}\text{C}$) mediated activation of caspase-9 and caspase-8: protective effect of mild thermotolerance (40 $^{\circ}\text{C}$).

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 $^{\circ}\text{C}$) and thermotolerant (TT, 3 h, 40 $^{\circ}\text{C}$) cells were pretreated with or without the inhibitors Baf. or 3-MA at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h, then were exposed to lethal heat shock at 42 $^{\circ}\text{C}$ for 1 and 2 h **a.** Enzymatic activity of caspase-9 and **b.** caspase-8 (b) were determined relative to untreated cells (N, 0 at 42 $^{\circ}\text{C}$, 100%). Data represent mean \pm SEM from four independent experiments. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***) indicate a significant difference between N and TT cells for each treatment. $p < 0.05$ (+), $p < 0.01$ (++) or $p < 0.001$ (+++) indicate a significant difference between cells \pm inhibitor for either N or TT cells. $p < 0.05$ (#), $p < 0.01$ (##) or $p < 0.001$ (###) indicate a statistically significant difference between unheated and heated cells at 42 $^{\circ}\text{C}$ for either N or TT cells.

Fig. 2.6. Autophagy inhibition increases heat shock (42 °C) mediated activation of caspase-4, caspase-7 and calpain: protective effect of mild thermotolerance (40 °C).

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 °C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40 °C) cells were heated at 42 °C for 1 and 2 h, following pretreatment with or without the inhibitors Baf. or 3-MA at 37 °C for 1 h. **a.** Enzymatic activity of caspase-4, **b.** caspase-7 and **c.** calpain were determined relative to untreated cells (N, 0 at 42 °C, 100%). Data represent mean \pm SEM from three (a. and c.) or four (b.) independent experiments. $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***) indicate a significant difference between N and TT cells for each treatment. $p < 0.05$ (+), $p < 0.01$ (++) or $p < 0.001$ (+++) indicate a significant difference between cells \pm inhibitor for either N or TT cells. $p < 0.05$ (#), $p < 0.01$ (##) or $p < 0.001$ (###) indicate a statistically significant difference between unheated and heated cells at 42 °C for either N or TT cells.

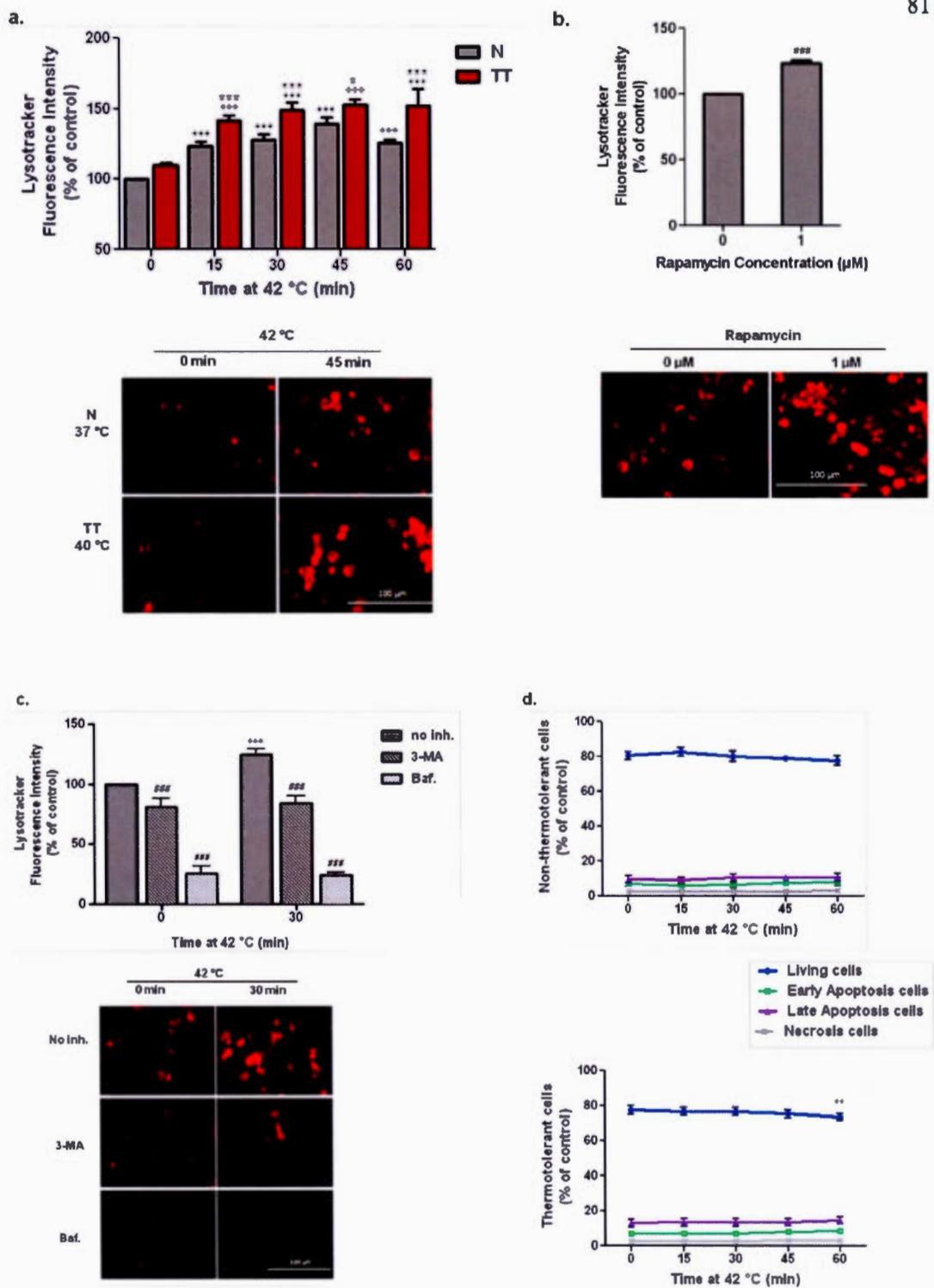


Figure 2.1. Heat shock (42 °C) induces autophagy in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.

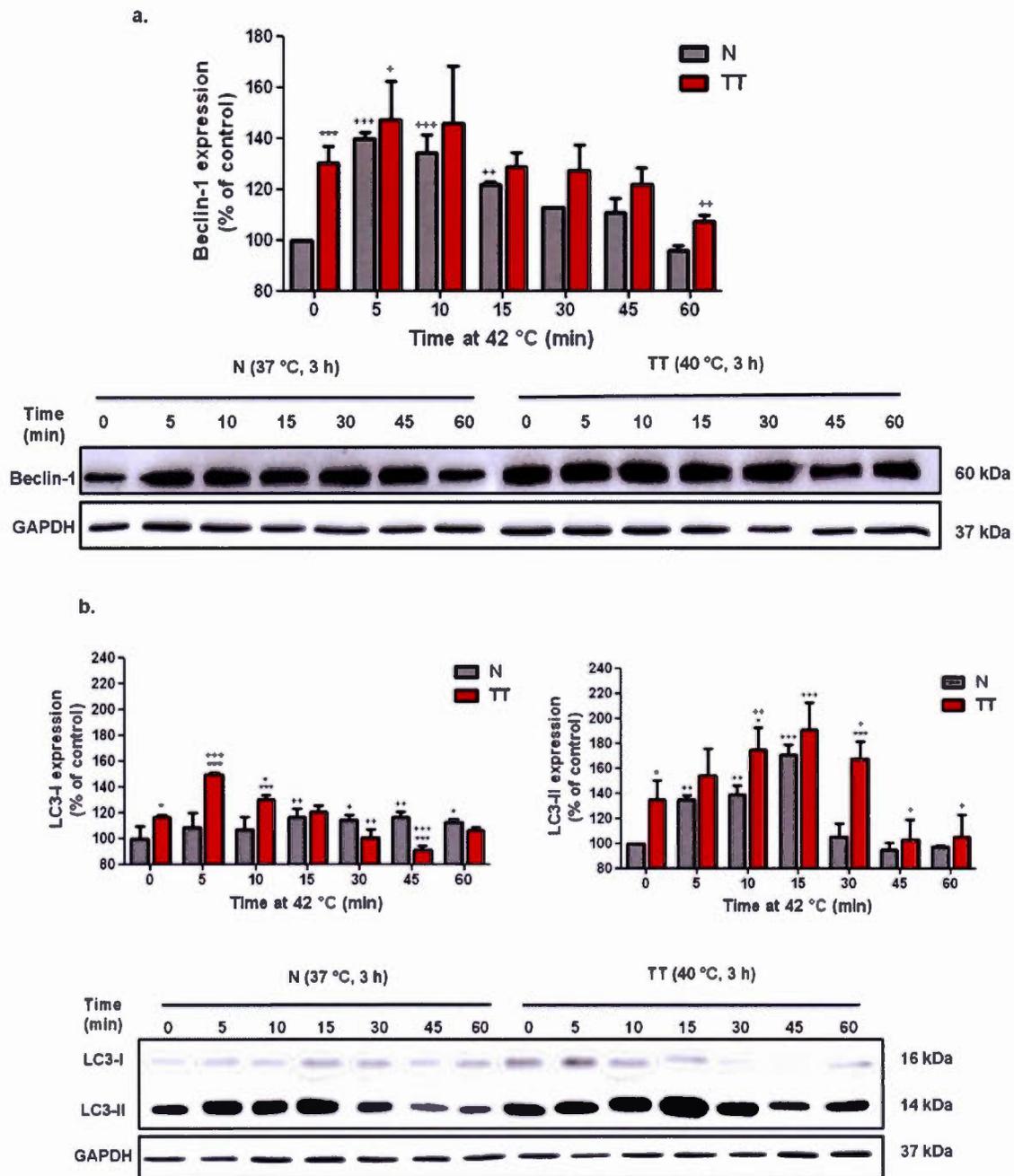


Figure 2.2. Heat shock (42 °C) enhances Beclin 1 and LC3 protein expression in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.

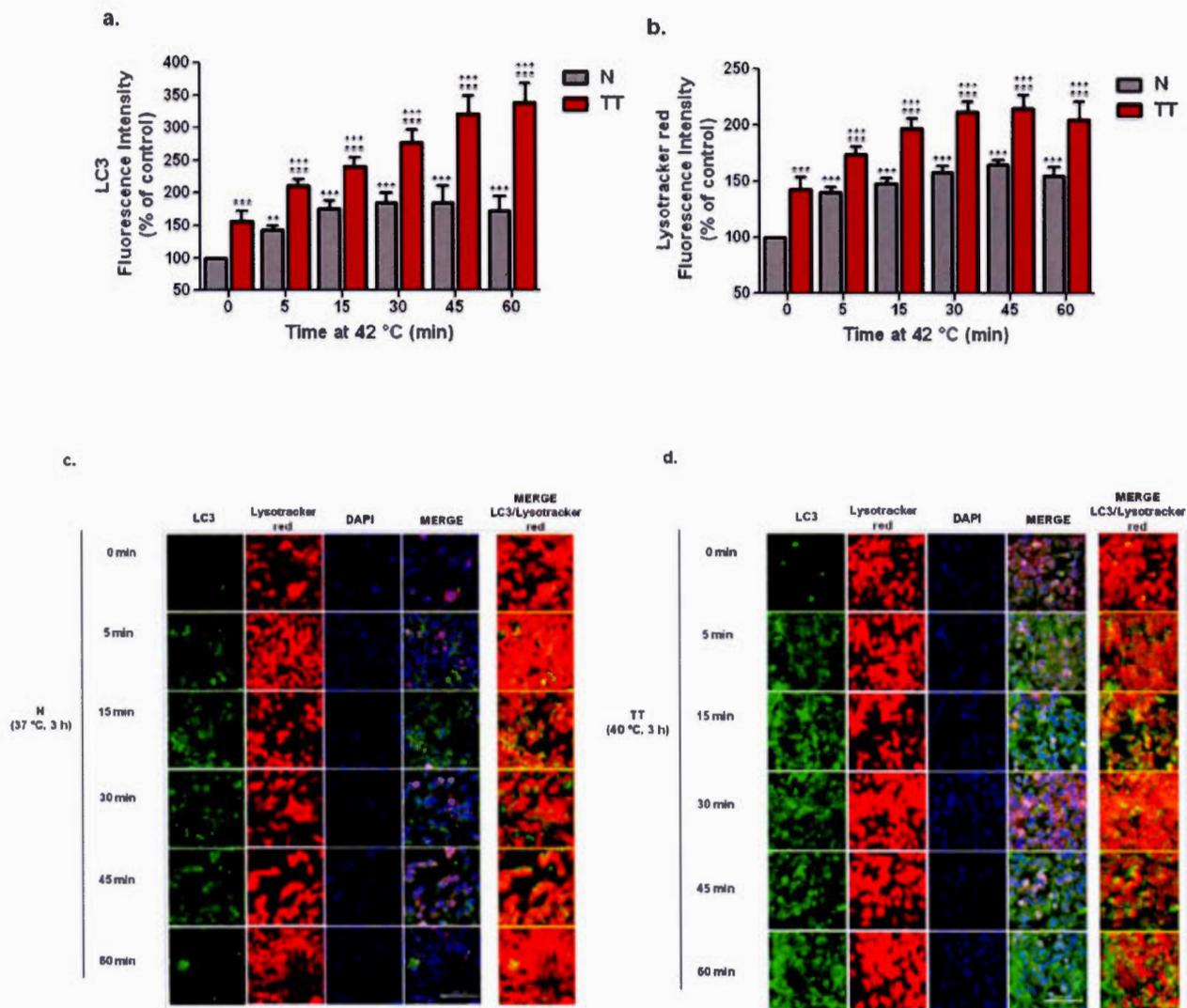


Figure 2.3. LC3 protein expression is increased by heat shock (42 °C) in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.

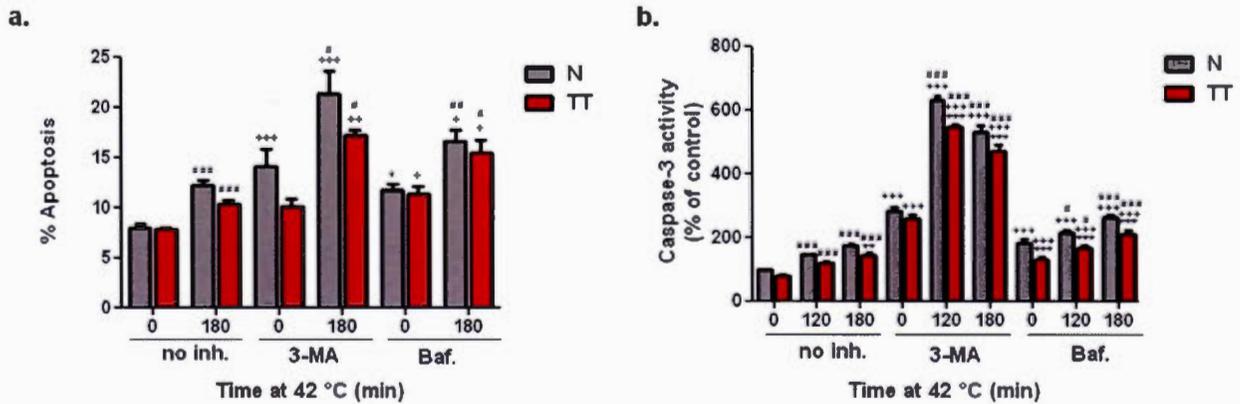


Figure 2.4. Inhibition of autophagy increases heat shock (42 °C) induced apoptosis: protective effect of mild thermotolerant (40°C).

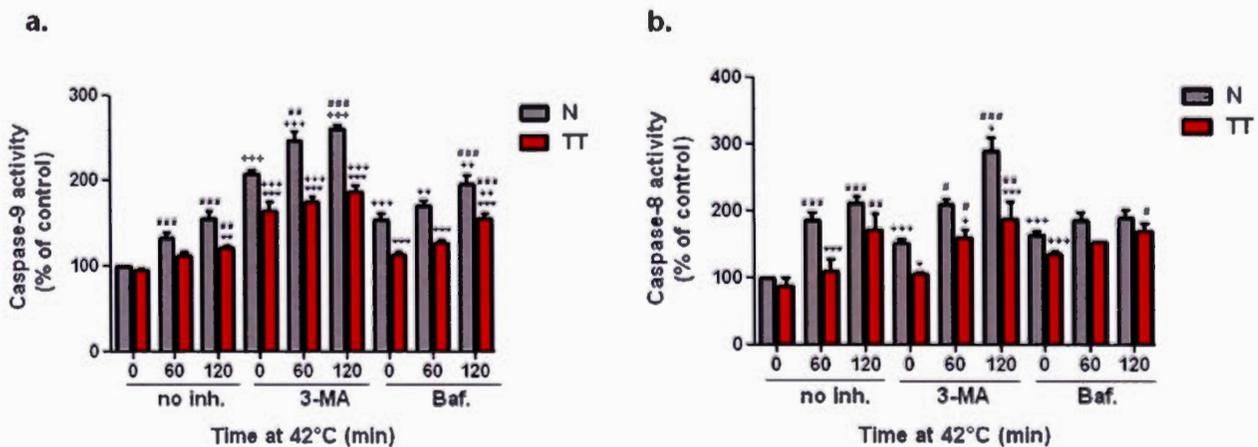


Figure 2.5. Inhibition of autophagy increases heat shock (42 °C) mediated activation of caspase-9 and caspase-8: protective effect of mild thermotolerance (40 °C).

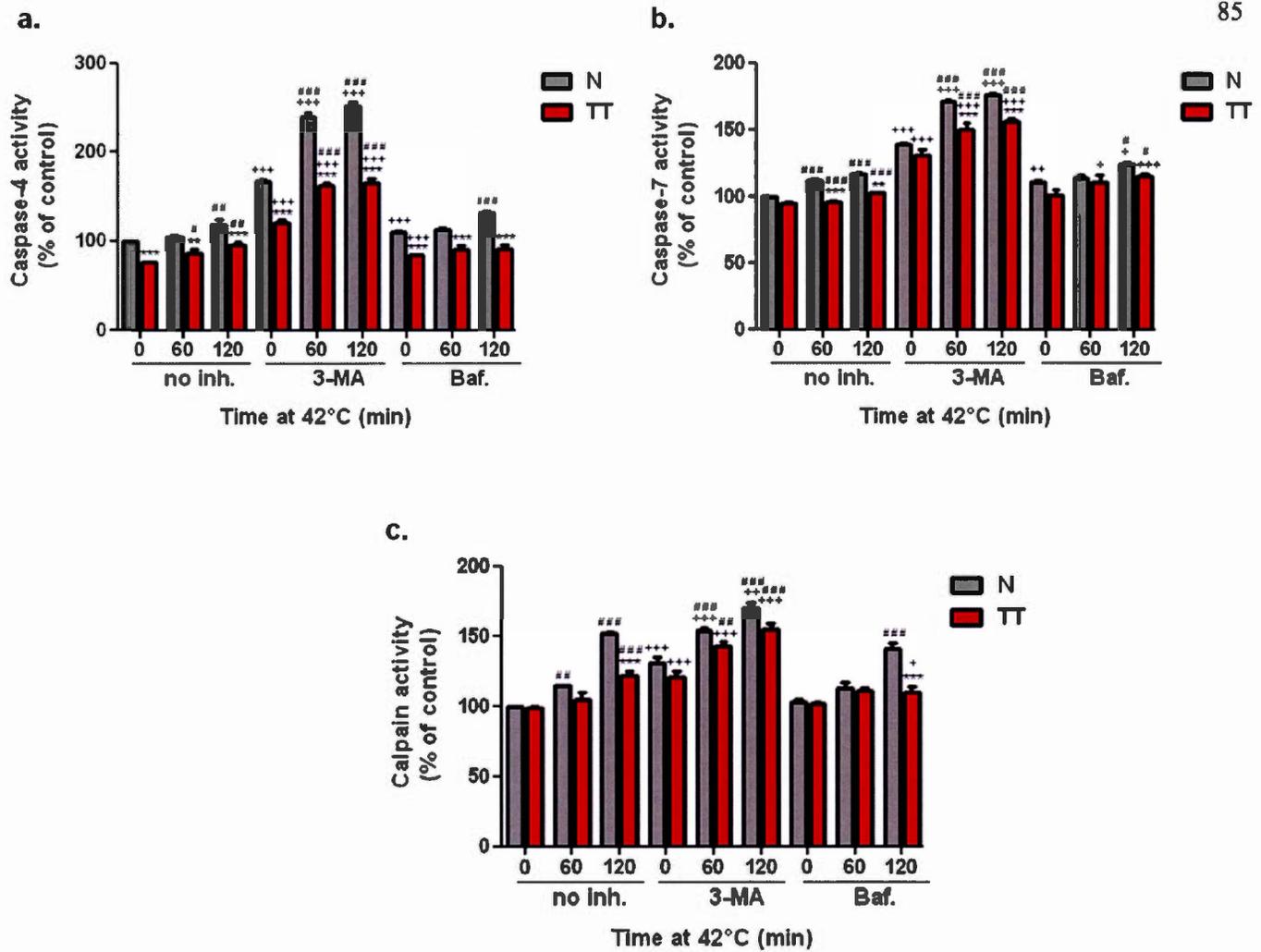


Figure 2.6. Autophagy inhibition increases heat shock (42 °C) mediated activation of caspase-4, caspase-7 and calpain: protective effect of mild thermotolerance (40 °C).

CHAPITRE III

CONCLUSION

De nombreuses thérapies continuent à émerger afin de lutter contre le cancer, une maladie souvent mortelle. Parmi ces thérapies, nous retrouvons l'hyperthermie qui a toujours existé en tant que possibilité de remède au cancer. Présentement, l'hyperthermie est souvent utilisée comme une modalité alternative aux thérapies anticancéreuses classiques couramment appliquées telles que la chimiothérapie et la radiothérapie (Baronzio *et al.*, 2014; Palazzi *et al.*, 2010). Cette combinaison permet d'améliorer le ciblage de la tumeur, donc l'efficacité des traitements et de diminuer les effets secondaires. En effet, l'action cytotoxique et directe de l'hyperthermie augmente la distribution des médicaments anticancéreux au sein de la tumeur et thermo-sensibilise les cellules cancéreuses à la radiothérapie. L'hyperthermie emploie des radiations non ionisantes ciblant particulièrement les cellules cancéreuses qui sont plus susceptibles aux chocs thermiques que les cellules saines à cause de leur microenvironnement. Plusieurs études cliniques ont confirmé les résultats démontrés par les études expérimentales faisant de l'hyperthermie un traitement très prometteur (Blanco-Andujar *et al.*, 2016; Issels *et al.*, 2016; Lutgens *et al.*, 2016). Cependant, l'hyperthermie demeure une modalité avec divers obstacles notamment au niveau des techniques de chauffage, empêchant son utilisation optimale. Il est ainsi primordial de poursuivre les recherches sur l'hyperthermie afin d'aboutir à une compréhension complète des mécanismes biochimiques et moléculaires causés par la toxicité de l'hyperthermie dans les cellules, et par conséquent, d'améliorer le développement fondamental de l'hyperthermie.

La thermotolérance est acquise par un stress thermique faible. Elle est une réponse adaptatrice de survie protégeant les cellules contre l'apoptose induite lors des stress ultérieurs tels que le stress oxydatif ou thermique (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Palapati et Averill-Bates, 2010). En effet, il a été démontré que la thermotolérance, acquise à 40 °C en 3 h, protège les cellules de carcinome cervical humain (HeLa) contre le déclenchement de l'apoptose par ses trois voies de signalisation en réponse à un stress thermique fort (≥ 42 °C,

3 h) (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015). Cette thermotolérance entraîne une augmentation de l'expression des molécules de défense telles que les protéines de choc thermique (Hsp27, 32, 60, 70, 72, 90 et 110) et les défenses antioxydantes (catalase, MnSOD, GSH et Nrf2) (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Glory et Averill-Bates, 2016; Pallepati et Averill-Bates, 2010) ainsi que l'activation des protéines de défense du RE (Bip, ATF6, PERK et eIF2- α) (Bettaieb et Averill-Bates, 2015; Pallepati et Averill-Bates, 2011a). Les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-X_L sont également impliquées dans l'effet protecteur de la thermotolérance (Glory *et al.*, 2014). Ainsi la thermotolérance pourrait rendre les cellules cancéreuses résistantes aux traitements hyperthermiques, mais ce phénomène est transitoire et l'hyperthermie en clinique s'applique souvent aux intervalles de temps pour éviter cette résistance.

Dans ce projet, nous avons émis comme hypothèse que l'autophagie pourrait être induite comme une réponse de survie, lors de la thermotolérance développée par des chocs thermiques faibles à long terme (40 °C, 3 h) ou par des chocs thermiques forts sur de courtes durées (42 °C, \leq 60 min). Premièrement, l'autophagie a été immédiatement et transitoirement induite en réponse à un choc thermique à 42 °C après 5 à 45 min d'exposition. À partir de 60 min d'exposition à 42 °C, le niveau d'induction de l'autophagie diminue. De plus, l'autophagie a été activée davantage chez les cellules HeLa thermotolérantes (40 °C, 3 h) exposées au choc thermique à 42°C sur des courtes périodes. L'induction de l'autophagie a été suivie par l'évaluation de l'expression de Beclin-1 et de la forme LC3-II par immunobuvardage (Western Blot). En outre, l'expression de LC3 a été analysée par immunofluorescence et la présence d'autolysosomes a été identifiée en utilisant la sonde fluorescente LysoTracker Red. L'absence de cellules en apoptose ou en nécrose, déterminée par cytométrie en flux, a confirmé que l'autophagie était activée en réponse à un stress thermique faible, sans causer de mort cellulaire. Il serait intéressant d'observer par Western Blot l'expression de certaines protéines Atg telles que Atg5, Atg12 et Atg7, dont le profil d'expression est montré en annexes (données préliminaires), ou encore de déterminer l'expression d'Atg4 dans l'induction de l'autophagie par hyperthermie. En effet, Atg4 joue un rôle dans la conversion de la protéine LC3-I en LC3-II et est donc important dans l'association de LC3-II au niveau de la membrane de l'autophagosome. Par ailleurs, il a été

démontré qu'une faible quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) entraîne une réponse de survie et active l'autophagie dans les cellules HeLa (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). Les EROs sont produites lors d'un stress et causent des dommages à l'intérieur des cellules (Pallepati et Averill-Bates, 2010). Il serait alors pertinent d'évaluer le niveau de génération des EROs en parallèle à l'induction de l'autophagie afin d'identifier si l'augmentation des EROs conduirait à une augmentation de l'autophagie dans les cellules HeLa et si l'autophagie est induite en réponse au stress thermique faible par l'intermédiaire des EROs.

Deuxièmement, nous avons évalué l'impact de l'inhibition de l'autophagie sur l'induction de l'apoptose par un stress thermique fort à 42 °C. En effet, il a été prouvé que le traitement de l'hyperthermie cause la mort cellulaire par nécrose ou apoptose selon la dose et la durée d'exposition au choc thermique (Bettaieb *et al.*, 2013). Par exemple, l'exposition des cellules HeLa à des températures létales (≥ 42 °C) pour 3 h déclenchait l'apoptose à partir des trois voies majeures de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort, la voie mitochondriale et la voie du réticulum endoplasmique (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015). Dans un premier temps, nous avons examiné l'activité enzymatique des caspases (-8,-9,-7 et -4) et nous avons confirmé que l'apoptose est effectivement induite par ces trois voies principales en réponse à des chocs thermiques forts (42 °C, 1 à 3 h) chez les cellules HeLa. En outre, le niveau d'apoptose induite montrait une diminution dans les cellules HeLa thermotolérantes (40 °C, 3 h) exposées ultérieurement aux chocs thermiques forts à 42 °C. Ensuite, deux agents chimiques ont été utilisés pour inhiber l'autophagie dans les cellules HeLa thermotolérantes ou non thermotolérantes: le 3 méthyladénine (3-MA) et la Bafilomycine A1 (Baf.). Le 3-MA est un inhibiteur sélectif de l'activité de PI3K de classe III nécessaire pour l'initiation de l'autophagie. La bafilomycine A1 est un inhibiteur qui agit au stade tardif de l'autophagie. Il perturbe le fonctionnement de la pompe à protons ATPasique vacuolaire empêchant la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Yamamoto *et al.*, 1998). Nous avons montré ici que l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA augmentait le niveau d'apoptose dans les cellules HeLa exposées aux chocs thermiques forts alors que par la bafilomycine A1, nous avons observé peu ou pas de différence d'induction de l'apoptose. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la conversion entre l'apoptose et l'autophagie implique les protéines initiatrices des

processus (ex : Beclin-1 et Bcl-2) et étant donné que le 3-MA bloque les étapes précoces de l'autophagie, il assurerait le transfert vers l'induction de l'apoptose. En outre, la bafilomycine A1 affecte également les processus de dégradation lysosomale qui ont lieu pendant l'apoptose, diminuant ainsi l'apoptose (Yoshimori *et al.*, 1991). Cependant, cette possibilité a été exclue parce que le signal de LysoTracker a été bloqué par les inhibiteurs d'autophagie, 3-MA et Baf. (Figure 2.1c). Afin de confirmer que l'arrêt de l'autophagie sensibilise davantage les cellules à l'apoptose induite par la chaleur, il serait intéressant d'utiliser des méthodes plus spécifiques de l'inhibition du processus autophagique (Arcaro et Wymann, 1993). Par exemple, l'inhibition de l'autophagie par un petit ARN en épingle à cheveux (shRNA) ou un ARN interférant (siRNA) ciblant Beclin-1 ou une protéine de la famille des Atg telle que Atg7 qui est importante pour l'élongation de l'autophagosome en assurant les conjugaisons d'Ag5-Atg12 et de LC3-PE pour former LC3-II. Il a été démontré que l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA ou par un ARN interférant ciblant les protéines d'autophagie (Beclin-1, Atg5, Atg7 et Atg12), augmente l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses de carcinome cervical humain (HeLa) ou de prostate (LNCaP et PC3) (Boya *et al.*, 2005; Liou *et al.*, 2014; Redza-Dutordoir *et al.*, 2016; Ringer *et al.*, 2014), mais ces résultats n'ont pas été encore montrés en réponse aux chocs thermiques.

Parallèlement, nous avons démontré que l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA ou la bafilomycine A1 conduit à une augmentation partielle du niveau d'apoptose dans les cellules thermotolérantes (40 °C) lors de chocs thermiques forts à 42 °C. Ainsi, durant la thermotolérance, l'autophagie protégerait en partie les cellules cancéreuses contre l'apoptose médiée par les trois voies déclencheuses, en réponse à un stress thermique fort. Néanmoins, nous pouvons affirmer que les chocs thermiques faibles induiraient l'autophagie comme mécanisme de défense cellulaire qui protège les cellules contre l'apoptose. Étant donné que plusieurs voies de survie sont activées pendant la thermotolérance, telles que la voie des protéines du choc thermique ou de réponse aux protéines non repliées (UPR) ou l'activation de Nrf2, il serait pertinent de déterminer si elles sont impliquées dans la régulation de l'autophagie lors d'un stress thermique (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Glory et Averill-Bates, 2016; Palapati et Averill-Bates, 2011a). Effectivement, il a été démontré que les protéines de choc thermique Hsp27, 72 et 90 étaient également activées lors de la

thermotolérance et régulaient l'induction de l'autophagie (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Jiang *et al.*, 2011; Kumano *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011). Il serait intéressant de déterminer si ces protéines seraient à l'origine de l'augmentation de l'autophagie en condition de thermotolérance. Par ailleurs, la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a été mise en évidence lors de la thermotolérance et est connue pour réguler l'autophagie en s'associant à Beclin-1 (Glory *et al.*, 2014). Il serait pertinent d'évaluer si cette protéine pouvait être impliquée dans l'activation de l'autophagie suite à un choc thermique.

L'apoptose et l'autophagie sont interconnectées en faisant intervenir plusieurs protéines communes, comme Beclin-1, Atg5 et Atg4 D (Betin et Lane, 2009; Wirawan *et al.*, 2010; Yousefi *et al.*, 2006). Ces dernières peuvent être clivées par les caspases en cas de stress sévère conduisant au blocage du processus d'autophagie et à l'induction de l'apoptose. Il serait important d'investiguer si ces protéines d'autophagie sont particulièrement clivées en réponse à un stress thermique fort chez les cellules thermotolérantes ou non. Un suivi des cinétiques de clivage de ces protéines lors d'un choc thermique permettrait de déterminer les conditions de stress entraînant le passage de l'induction de l'autophagie à celle de l'apoptose. Une autre protéine qui joue un rôle dans la régulation de l'autophagie ainsi que l'apoptose est la p53. Ce facteur de transcription stimule l'expression des gènes liés à l'autophagie et est activé dans les cellules thermotolérantes, mais entraîne la mort par apoptose après 1 h d'exposition à un choc thermique à 42 °C (Oei *et al.*, 2015; Palapati et Averill-Bates, 2010). L'interconnexion entre l'autophagie et l'apoptose devrait être approfondi par la suite, en étudiant le rôle de la p53 suite à un choc thermique dans la survie ou la mort cellulaire.

Cette étude a permis d'approfondir nos notions sur les mécanismes cellulaires engagés en réponse au stress thermique, au sein des cellules HeLa lors du traitement de l'hyperthermie. Pour la suite de ce projet, il serait intéressant de vérifier si nos résultats sont également observés sur d'autres lignées cellulaires comme celles provenant également d'un cancer cervical humain telles que les C33 A car il existe beaucoup de variabilité entre les différents types cellulaires ainsi que types de cancer. En conséquence, nous pourrions conclure si nos conditions expérimentales sont spécifiques au type cellulaire étudié ou si elles s'appliquent à certains autres types de cellules humaines cancéreuses. Pour l'hyperthermie en clinique, ce projet a apporté des informations sur le contrôle de la survie cellulaire en réponse

au stress thermique faible et a permis d'envisager de nouvelles stratégies d'optimisation du traitement hyperthermique, comme par exemple le ciblage de l'autophagie en combinaison avec de plus faible dose de chaleur.

ANNEXES

DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES

Supplementary

Heat shock (42 °C) increases expression of autophagy protein Atg7 and conjugated Atg5-Atg12

The activation of autophagy by heat shock at 42 °C was further verified through the expression of Atg7 protein and the Atg5-Atg12 complex (Fig. 2.2). Atg7 is important in the elongation of the autophagosome in autophagy. It is an E1-like enzyme involved in the activation of the Atg5-Atg12 ubiquitin-like conjugate and LC3-PE conjugate (Huang et Brumell, 2014). Atg7 expression increased significantly during heat exposure in non-thermotolerant (N) cells, reaching a maximum level of a 2-fold increase after 10 to 15 min (Fig. 4.1a). Throughout heating period at 42 °C, the expression of Atg7 in thermotolerant (TT) cells was 25 to 50% higher than that in non-thermotolerant cells. In unheated controls (T = 0) and in cells heated for 5 min at 42 °C, Atg7 expression was 2.0 to 2.5-fold higher in thermotolerant (TT) compared to their non-thermotolerant (N) counterparts (Fig. 4.1a).

Conjugated Atg5-Atg12 is necessary for autophagosome formation during autophagic processes and allows the binding of LC3-II to the autophagosomal membrane (Kabeya *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012). Similar to Atg7, heat shock at 42 °C increased the formation of the Atg5-Atg12 in both non-thermotolerant (N) and thermotolerant (TT) HeLa cells (Fig. 4.1b). In non-thermotolerant cells, the Atg5-Atg12 conjugate increased after 5 min at 42 °C to a maximum of 50% at 15 min and then returned to the control level after 30 min

(N, 0 at 42 °C, 100%). When heated at 42 °C, the time-dependence for the conjugation profile of Atg5-Atg12 in thermotolerant cells was similar to that in non-thermotolerant cells. However, expression of the Atg5-Atg12 conjugate was 20 to 40% higher in thermotolerant cells throughout the heating period at 42 °C. In unheated controls (T = 0), the Atg5-Atg12 conjugate was 45% higher in thermotolerant (TT) compared to their non-thermotolerant (N) counterparts (Fig. 4.1b). Hence, expression of Atg7 and the Atg5-Atg12 conjugate increased after relatively short (5 min to 15 min) heating times at 42 °C in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells.

Activation of autophagy by heat shock at 45 °C in mild thermotolerant (40 °C) and non-thermotolerant cells

Autophagy was activated at 45 °C for 30 min (Fig. 4.2). The profile of induction of autophagy was similar to that at 42 °C. Since the temperature is higher, autophagy was activated with a 50% increase after a shorter time exposure (15 min) to heat in non-thermotolerant cells and diminished at 30 min (Fig. 4.2). The intensity of fluorescence was also higher in thermotolerant (TT) than in non-thermotolerant (N) cells after exposure to 45 °C heat for 30 min (Fig. 4.2a). Levels of AVOs diminished in cells treated with autophagy inhibitors, 3-MA and Baf., after 15 min exposure to 45 °C heat shock (Fig. 4.2b). The increase in AVOs, after 45 °C heat shock from 0 to 30 min, was attributed to autophagy due to the absence of apoptosis or necrosis in thermotolerant or non-thermotolerant cells (Fig. 4.2c). Thereafter, the percentage of live cells started to diminish in non-thermotolerant cells whereas in thermotolerant cells, the number of live cells did not change much after 45 min of heat shock. Thus, autophagy is a process transiently activated that could depend on the dose and duration of heat. It is clear that autophagy is induced at higher levels in thermotolerant cells, demonstrating a better resistance to thermal stress than in non-thermotolerant cells.

Figures and legends

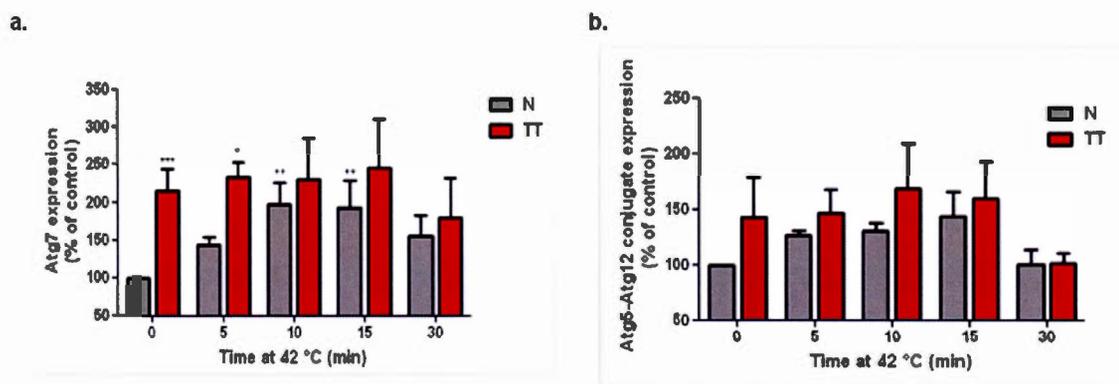


Figure 4.1. Heat shock (42 °C) enhances protein expression Atg7 and the Atg5-Atg12 conjugate in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells. Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 °C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40 °C) cells were heated at 42 °C for 0 to 30 min and tracked for **a.** Atg7 and **b.** the Atg5-Atg12 conjugate. Protein expression was normalized to GAPDH loading controls and is relative to non-thermotolerant controls (0 at 42 °C, 100 %). Means \pm SEM are from three independent experiments. $p < 0.05$ (*) or $p < 0.001$ (***) indicate a significant difference between N and TT cells for each treatment. $p < 0.01$ (++) indicates a statistically significant difference between unheated and heated cells at 42 °C for either N or TT cells.

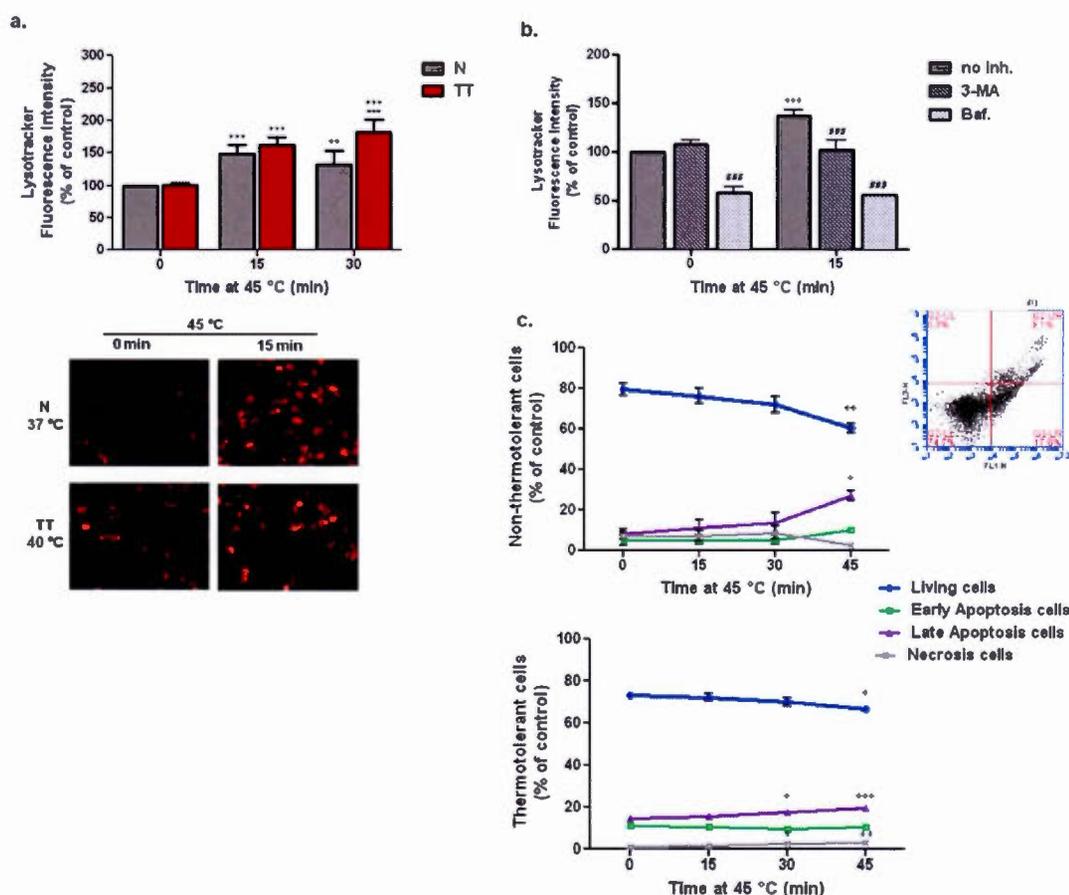


Figure 4.2. Short exposure to lethal heat shock (45 °C) induces autophagy in thermotolerant and non-thermotolerant HeLa cells. **a.** Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 °C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40 °C) cells were heated at 45 °C for 0 to 30 or 45 min then tracked for fluorescence of AVOs using Lysotracker Red. **b.** Non-thermotolerant cells were heated at 45 °C for 30 min, with or without inhibitors (inh.), 3-methyladenine (3-MA) or Bafilomycin A1 (Baf.) and analyzed for AVOs. **c.** Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 °C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40 °C) cells were heated at 45 °C for 0 to 45 min and then labeled with Annexin V-FITC and Propidium Iodide for detection of early and late apoptosis or necrosis by flow cytometry, relative to unheated controls (0 at 45 °C). FL3-H indicates PI fluorescence and FL1-H indicates Annexin V-FITC fluorescence. A representative FACS plot is provided to show the gating used for data analysis. FL3-H indicates PI fluorescence and FL1-H indicates Annexin V-FITC fluorescence. LL, LR, UR and UL represent living, early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells, respectively. Values for untreated controls (unheated or 0 μ M rapamycin) were normalized to 100 %. For all the images, scale bars are 100 μ m. Fluorescent microscope images (magnification 100 \times) represent mean \pm SEM from three (a.) or four (b. and c.) independent experiments. $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***) indicate a significant difference between N and TT cells for each treatment. $p < 0.01$ (++) or $p < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between unheated and heated cells at 45°C cells for either N or TT cells. $p < 0.001$ (###) indicates a significant difference between cells \pm inhibitor for non-thermotolerant cells.

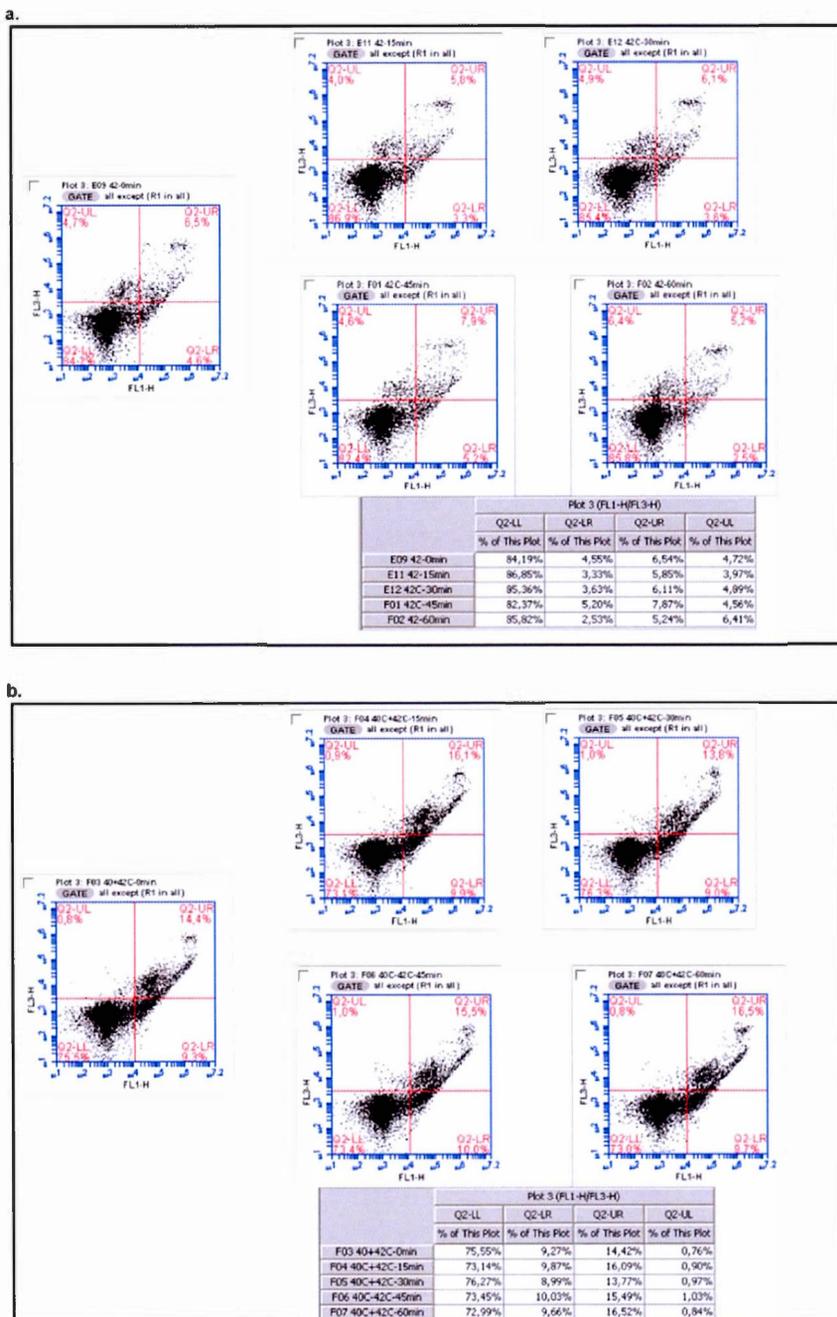


Figure 4.3. Representative FACSscan plots and statistical table for detection of apoptosis and necrosis in non-thermotolerant and thermotolerant cells exposed 42 °C. a. Non-thermotolerant (N, 3 h, 37 °C) and **b.** thermotolerant (TT, 3 h, 40 °C) cells were heated at 42 °C for 0 to 60 min and then labeled with Annexin V-FITC and Propidium Iodide for detection of early and late apoptosis or necrosis by flow cytometry, relative to unheated controls (0 at 42 °C). FL3-H indicates PI fluorescence and FL1-H indicates Annexin V-FITC fluorescence. LL, LR, UR and UL represent living, early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells, respectively.

ARTICLE EN COLLABORATION

INHIBITION OF AUTOPHAGY SENSITIZES CELLS TO HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED APOPTOSIS: PROTECTIVE EFFECT OF MILD THERMOTOLERANCE ACQUIRED AT 40°C

Maureen Redza-Dutordoir, Sarah Kassis, Hou Ve, Mélanie Grondin, Diana A. Averill-Bates*

Département des sciences biologiques (TOXEN, BIOMED), Université du Québec À Montréal, Montréal, Québec, Canada

* Corresponding author:

Dr Diana A. Averill-Bates

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal

CP 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000 (4811); Fax: (514) 987-4647; Email: averill.diana@uqam.ca

Keywords: oxidative stress, thermotolerance, hormesis, caspases, autophagy

Abstract

Various toxic compounds produce reactive oxygen species, resulting in oxidative stress that threatens cellular homeostasis. Yet, lower doses of stress can stimulate defence systems allowing cell survival, whereas intense stress activates cell death pathways such as apoptosis. Mild thermal stress (40 °C, 3 h) induces thermotolerance, an adaptive survival response that renders cells less sensitive to subsequent toxic stress, by activating defence systems like heat shock proteins, antioxidants, anti-apoptotic and ER-stress factors. This study aims to understand how autophagy and apoptosis are regulated in response to different doses of H₂O₂, and whether mild thermotolerance can protect cervical carcinoma cells against apoptosis by stimulating autophagy. Autophagy was monitored through Beclin-1 and LC3 expression and acid compartment activity, whereas apoptosis was tracked by caspase activity and chromatin condensation. Exposure of HeLa and C33 A cells to H₂O₂ for shorter times (15–30 min) transiently induced autophagy; apoptosis was activated after longer times (1–3 h). Mild thermotolerance at 40 °C enhanced activation of autophagy by H₂O₂. Disruption of autophagy using bafilomycin A1 and 3-methyladenine sensitised cells to apoptosis induced by H₂O₂, in non-thermotolerant cells and, to a lesser extent, in thermotolerant cells. Inhibition of autophagy enhanced apoptosis through the mitochondrial, death receptor and endoplasmic reticulum pathways. Autophagy was activated by lower doses of stress and protects cells against apoptosis induced by higher doses of H₂O₂. This work improves understanding of mechanisms that might be involved in toxicity of various compounds and could eventually lead to protective strategies against deleterious effects of toxic compounds.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

Inhibition of autophagy sensitises cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis: Protective effect of mild thermotolerance acquired at 40 °C



Maureen Redza-Dutordoir, Sarah Kassis, Hou Ve, Mélanie Grondin, Diana A. Averill-Bates *

Département des sciences biologiques (TOXEN, BDMED), Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 March 2016
Received in revised form 15 September 2016
Accepted 21 September 2016
Available online 22 September 2016

Keywords:
Oxidative stress
Thermotolerance
Homesis
Caspase
Autophagy

ABSTRACT

Various toxic compounds produce reactive oxygen species, resulting in oxidative stress that threatens cellular homeostasis. Yet, lower doses of stress can stimulate defence systems allowing cell survival, whereas intense stress activates cell death pathways such as apoptosis. Mild thermal stress (40 °C, 3 h) induces thermotolerance, an adaptive survival response that renders cells less sensitive to subsequent toxic stress, by activating defence systems like heat shock proteins, antioxidants, anti-apoptotic and ER-stress factors. This study aims to understand how autophagy and apoptosis are regulated in response to different doses of H₂O₂, and whether mild thermotolerance can protect cervical carcinoma cells against apoptosis by stimulating autophagy. Autophagy was monitored through Beclin-1 and LC3 expression and acid compartment activity, whereas apoptosis was tracked by caspase activity and chromatin condensation. Exposure of HeLa and C33 A cells to H₂O₂ for shorter times (15–30 min) transiently induced autophagy; apoptosis was activated after longer times (1–3 h). Mild thermotolerance at 40 °C enhanced activation of autophagy by H₂O₂. Disruption of autophagy using bafilomycin A1 and 3-methyladenine sensitised cells to apoptosis induced by H₂O₂ in non-thermotolerant cells and, to a lesser extent, in thermotolerant cells. Inhibition of autophagy enhanced apoptosis through the mitochondrial, death receptor and endoplasmic reticulum pathways. Autophagy was activated by lower doses of stress and protects cells against apoptosis induced by higher doses of H₂O₂. This work improves understanding of mechanisms that might be involved in toxicity of various compounds and could eventually lead to protective strategies against deleterious effects of toxic compounds.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide (O₂^{•-}) and the hydroxyl radical (•OH), can be generated as by-products of metabolism, or by exposure to toxic stresses like UV and ionizing radiations [1], tobacco smoke [2], heavy metals [3], environmental pollutants and chemotherapeutic pharmaceuticals [4]. At low levels, ROS intervene in the regulation of cellular functions such as proliferation, growth and differentiation [5]. However, at higher levels, their oxidative potential is a threat to cellular redox homeostasis. Therefore, cellular ROS levels are tightly regulated by the antioxidant system composed of both enzymatic (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, etc.) and non-enzymatic (vitamins E and C, carotenoids, glutathione, etc.) molecules [6]. When the antioxidant system becomes overwhelmed, a redox imbalance known as oxidative stress occurs, and excess levels of ROS can then target DNA, proteins

and lipids, resulting in senescence or cell death, mainly through a poptosis and/or necrosis [7].

Apoptosis is a cell death process that is characterised by cell shrinking, chromatin condensation, formation of apoptotic bodies and the subsequent digestion of cellular fragments by macrophages [8]. Most of the pathways leading to apoptosis involve the activation of cysteine-dependent proteases named caspases. Apoptotic caspases are comprised of initiators, such as caspases-8, -9 and -4/-12, and effectors, like caspases-3, -6 and -7. Caspases are synthesised as inactive zymogens, which are recruited to protein complexes where they are processed and activated after a death stimulus [9]. Active caspases recognise a specific amino acid sequence on their targets and hydrolyse a peptide bond at the carboxyl end of an aspartate residue. Caspase substrates, beyond other caspases, include structural proteins, such as actin, lamin A, gelsolin and fodrin; proteins involved in DNA repair, like poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) and cell cycle-related proteins such as p53, and inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) [10]. The cleavage of these substrates culminates in the morphological characteristics of apoptosis and dismantlement of the cell [11].

Caspase-mediated apoptosis can be triggered by three main pathways: two intrinsic pathways involving mitochondria and the

* Corresponding author at: Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada. E-mail address: averill@dana.uqam.ca (D.A. Averill-Bates).

RÉFÉRENCES

- Aita, Vincent M, Liang, X.H., Murty, V., Pincus, D.L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., G., T.C. et Levine, B. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 59(1), 59-65.
- Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q. et Urbatsch, I.L. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 323(5922), 1718-1722.
- Aouali, N., Eddabra, L., Macadré, J. et Morjani, H. (2005). Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 56(1), 61-70.
- Arcaro, A. et Wymann, M.P. (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochemical Journal*, 296(2), 297-301.
- Ariosa, A.R. et Klionsky, D.J. (2016). Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons. *Journal of Molecular Medicine*, 94(11), 1217-1227.
- Baird, R. et Kaye, S. (2003). Drug resistance reversal—are we getting closer? *European Journal of Cancer*, 39(17), 2450-2461.
- Baronzio, G. F., Gramaglia, A., Baronzio, A. et Freitas, I. (2006). Influence of Tumor Microenvironment on Thermoresponse. Dans *Hyperthermia in Cancer Treatment: A Primer* (p. 67-91) : Springer Science & Business Media.
- Baronzio, G. F., Jackson, M., Lee, D. et Szász, A. (2013). Conference of the International Clinical Hyperthermia Society 2012. Conference Papers in Science. : Hindawi Publishing Corporation
- Baronzio, G. F., Parmar, G., Ballerini, M., Szasz, A., Baronzio, M. et Cassutti, V. (2014). A brief overview of hyperthermia in cancer treatment. *Journal of Integrative Oncology*, 3(1), 1-10.

- Baronzio, G. F., Parmar, G., Ballerini, M., Szasz, A., Baronzio, M. et Cassutti, V. (2014). A brief overview of hyperthermia in cancer treatment. *Journal of Integrative Oncology*, 3(1), 1-10.
- Bergs, W J, Oei, A.L., Ten, C., R., Rodermond, H.M., Stalpers, L.J., Barendsen, G.W. et Franken, N.A.P. (2016). Dynamics of chromosomal aberrations, induction of apoptosis, BRCA2 degradation and sensitization to radiation by hyperthermia. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(1), 243-250.
- Betin, V.M. et Lane, J.D. (2009). Atg4D at the interface between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 5(7), 1057-1059.
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2008). Thermotolerance induced at a fever temperature of 40 °C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signalling. *Biochemistry and Cell Biology*, 86(6), 521-538.
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2015). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 °C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1853(1), 52-62.
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2005). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 °C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 205(1), 47-57.
- Bettaieb, A., Wrzal, P.K. et Averill-Bates, D.A. (2013). Hyperthermia: Cancer treatment and beyond. Dans *Cancer Treatment—Conventional and Innovative Approaches* (InTech éd.). Rijeka : Leticia Range.
- Blanco-Andujar, C., Ortega, D., Southern, P., Nesbitt, S.A., Thanh, N.T.K. et Pankhurst, Q.A. (2016). Real-time tracking of delayed-onset cellular apoptosis induced by intracellular magnetic hyperthermia. *Nanomedicine*, 11(2), 121-136.
- Bouhadjari, N., Gabato, W., Calabrese, D., Msika, S. et Keita, H. (2016). Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with cisplatin: Amifostine prevents acute severe renal impairment. *European Journal of Surgical Oncology*, 42(2), 219-223.

- Bowman, E.J., Siebers, A. et Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(21), 7972-7976.
- Boya, P., González-Polo, R.-A., Casares, N., Perfettini, J.-L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S. et Yoshimori, T. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 25(3), 1025-1040.
- Boyle, J.M., Tandberg, D.J., Chino, J.P., D'Amico, T.A., Ready, N.E. et Kelsey, C.R. (2015). Smoking history predicts for increased risk of second primary lung cancer: a comprehensive analysis. *Cancer*, 121(4), 598-604.
- Brannon-Peppas, L. et Blanchette, J.O. (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(11), 1649-1659.
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A. et Henson, P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26159-26165.
- Brush, M.H., Weiser, D.C. et Shenolikar, S. (2003). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Molecular and Cellular Biology*, 23(4), 1292-1303.
- Cairns, R.A., Harris, I.S. et Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(2), 85-95.
- Calderwood, S.K., Murshid, A. et Prince, T. (2009). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging—a mini-review. *Gerontology*, 55(5), 550-558.
- Cao, S.S. et Kaufman, R.J. (2012). Unfolded protein response. *Current Biology*, 22(16), R622-R626.

- Causey, M.W., Steele, S.R., Maykel, J., Champagne, B. et Johnson, E.K. (2012). Surgical therapy for epidermoid carcinoma of the anal canal: an NSQIP assessment of short-term outcomes. *Journal of Surgical Research*, 177(2), 235-240.
- Chaabane, W., User, S.D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J. et Łos, M.J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 43-58.
- Chen, Y. et Klionsky, D.J. (2011). The regulation of autophagy—unanswered questions. *Journal of Cell Science*, 124(2), 161-170.
- Chicheł, A., Skowronek, J., Kubaszewska, M. et Kanikowski, M. (2007). Hyperthermia—description of a method and a review of clinical applications. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 12(5), 267-275.
- Choi, K.S. (2012). Autophagy and cancer. *Experimental and Molecular Medicine*, 44(2), 109-120.
- Circu, M.L. et Aw, T.Y. (2012). Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1823(10), 1767-1777.
- Coley, W.B. (1893). I. The Treatment of malignant tumors by repeated inoculations of Erysipelas. *Annals of Surgery*, 18, 68-76.
- Crawford, E.D. et Wells, J.A. (2011). Caspase substrates and cellular remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 1055-1087.
- Creagh, E.M. (2014). Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends in Immunology*, 35(12), 631-640.
- Crezee, J., van Leeuwen, C., Oei, A., van Heerden, L., Bel, A., Stalpers, L., Ghadjar, P., Franken, N. et Kok, H. (2016). Biological modelling of the radiation dose escalation effect of regional hyperthermia in cervical cancer. *Radiation Oncology*, 11(1), 14-16.
- Cutler, D.M. (2008). Are we finally winning the war on cancer? *The Journal of Economic Perspectives*, 22(4), 3-26.

- Dahl, O. et Overgaard, J. (1995). A century with hyperthermic oncology in Scandinavia. *Acta Oncologica*, 34(8), 1075-1083.
- Dähring, H., Grandke, J., Teichgräber, U. et Hilger, I. (2015). Improved hyperthermia treatment of tumors under consideration of magnetic nanoparticle distribution using micro-CT imaging. *Molecular Imaging and Biology*, 17(6), 763-769.
- Dalby, K., Tekedereli, I., Lopez-Berestein, G. et Ozpolat, B. (2010). Targeting the pro-death and pro-survival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy*, 6(3), 322-329.
- Datta, N., Ordóñez, S.G., Gaip, U., Paulides, M., Crezee, H., Gellermann, J., Marder, D., Puric, E. et Bodis, S. (2015). Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. *Cancer Treatment Reviews*, 41(9), 742-753.
- Decker, W.K. et Safdar, A. (2009). Bioimmunoadjuvants for the treatment of neoplastic and infectious disease: Coley's legacy revisited. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(4), 271-281.
- Deegan, S., Koryga, I., Glynn, S.A., Gupta, S., Gorman, A.M. et Samali, A. (2015). A close connection between the PERK and IRE arms of the UPR and the transcriptional regulation of autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1), 305-311.
- Djavaheri-Mergny, M., Maiuri, M. et Kroemer, G. (2010). Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene*, 29(12), 1717-1719.
- Dokladny, K., Myers, O.B. et Moseley, P.L. (2015). Heat shock response and autophagy-cooperative and control. *Autophagy*, 11(2), 200-213.
- Dokladny, K., Zuhl, M.N., Mandell, M., Bhattacharya, D., Schneider, S., Deretic, V. et Moseley, P.L. (2013). Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 14959-14972.
- Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G. et Gelinas, C. (2006). Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Oncogene*, 25(51), 6800-6816.

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- Feng et Chien, S. (2003). Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science*, 58(18), 4087-4114.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z. et Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, 24(1), 24-41.
- Franckena, M., Fatehi, D., de Bruijne, M., Canters, R.A., van Norden, Y., Mens, J.W., van Rhoon, G.C. et van der Zee, J. (2009). Hyperthermia dose-effect relationship in 420 patients with cervical cancer treated with combined radiotherapy and hyperthermia. *European Journal of Cancer*, 45(11), 1969-1978.
- Franckena, M., Stalpers, L.J., Koper, P.C., Wiggenraad, R.G., Hoogenraad, W.J., van Dijk, J.D., Wárlám-Rodenhuis, C.C., Jobsen, J.J., van Rhoon, G.C. et van der Zee, J. (2008). Long-term improvement in treatment outcome after radiotherapy and hyperthermia in locoregionally advanced cervix cancer: an update of the Dutch Deep Hyperthermia Trial. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 70(4), 1176-1182.
- Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O. et Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 1-23.
- Furuya, N., Yu, J., Byfield, M., Pattingre, S. et Levine, B. (2005). The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy, and tumor suppressor function. *Autophagy*, 1(1), 46-52.
- Gabai, V.L., Mabuchi, K., Mosser, D.D. et Sherman, M.Y. (2002). Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 22(10), 3415-3424.
- Genet, S.C., Fujii, Y., Maeda, J., Kaneko, M., Genet, M.D., Miyagawa, K. et Kato, T.A. (2013). Hyperthermia inhibits homologous recombination repair and sensitizes cells to ionizing radiation in a time- and temperature-dependent manner. *Journal of Cellular Physiology*, 228(7), 1473-1481.

- Glory, A. et Averill-Bates, D.A. (2016). The antioxidant transcription factor Nrf2 contributes to the protective effect of mild thermotolerance (40° C) against heat shock-induced apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 99, 485-497.
- Glory, A., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2014). Mild thermotolerance induced at 40 °C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins. *International Journal of Hyperthermia*, 30(7), 502-512.
- Gozuacik, D. et Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16), 2891-2906.
- Green, D.R. et Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), a006080.
- Gupta, S., Kass, G.E., Szegezdi, E. et Joseph, B. (2009). The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(6), 1004-1033.
- Hainfeld, J.F., Lin, L., Slatkin, D.N., Dilmanian, F.A., Vadas, T.M. et Smilowitz, H.M. (2014). Gold nanoparticle hyperthermia reduces radiotherapy dose. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(8), 1609-1617.
- Halestrap, A.P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(6), 821-831.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harnicek, D., Kampmann, E., Lauber, K., Hennel, R., Cardoso Martins, A.S., Guo, Y., Belka, C., Mörtl, S., Gallmeier, E. et Kanaar, R. (2016). Hyperthermia adds to trabectedin effectiveness and thermal enhancement is associated with BRCA2 degradation and impairment of DNA homologous recombination repair. *International Journal of Cancer*, 139(2), 467-479.
- Hartl, F.U. et Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852-1858.

- He, C. et Levine, B. (2010). The beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 140-149.
- Hegyí, G., Szigeti, G.P. et Szász, A. (2013). Hyperthermia versus oncothermia: cellular effects in complementary cancer therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-12.
- Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R. et Riess, H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 43(1), 33-56.
- Horsman, M.R. et Overgaard, J. (2007). Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy. *Clinical Oncology*, 19(6), 418-426.
- Hu, Y.-L., DeLay, M., Jahangiri, A., Molinaro, A.M., Rose, S.D., Carbonell, W.S. et Aghi, M.K. (2012). Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Research*, 72(7), 1773-1783.
- Huang et Brumell, J.H. (2014). Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nature Reviews in Microbiology*, 12(2), 101-114.
- Huang, Z., Zhou, X., He, Y., Ke, X., Wen, Y., Zou, F. et Chen, X. (2016). Hyperthermia enhances 17-DMAG efficacy in hepatocellular carcinoma cells with aggravated DNA damage and impaired G2/M transition. *Scientific Reports*, 6, 38072-38083.
- Igney, F.H. et Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews in Cancer*, 2(4), 277-288.
- Ismail-zade, R.S., Zhavrid, E.A. et Potapnev, M.P. (2005). Whole body hyperthermia in adjuvant therapy of children with renal cell carcinoma. *Pediatric Blood and Cancer*, 44(7), 679-681.
- Issels, R. (2006). High-risk soft tissue sarcoma: Clinical trial and hyperthermia combined chemotherapy. *International Journal of Hyperthermia*, 22(3), 235-239.

- Issels, R. (2008). Hyperthermia adds to chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 44(17), 2546-2554.
- Issels, R., Kampmann, E., Kanaar, R. et Lindner, L.H. (2016). Hallmarks of hyperthermia in driving the future of clinical hyperthermia as targeted therapy: translation into clinical application. *International Journal of Hyperthermia*, 32(1), 89-95.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706), 58-62.
- Jego, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R. et Garrido, C. (2013). Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters*, 332(2), 275-285.
- Jiang, Q., Wang, Y., Li, T., Shi, K., Li, Z., Ma, Y., Li, F., Luo, H., Yang, Y. et Xu, C. (2011). Heat shock protein 90-mediated inactivation of nuclear factor- κ B switches autophagy to apoptosis through becn1 transcriptional inhibition in selenite-induced NB4 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22(8), 1167-1180.
- Jin, H.-O., Hong, S.-E., Park, J.-A., Chang, Y.H., Hong, Y.J., Park, I.-C. et Lee, J.K. (2016). Inhibition of JNK-mediated autophagy enhances NSCLC cell sensitivity to mTORC1/2 inhibitors. *Scientific Reports*, 6, 28945-28956.
- Jones, E.L., Oleson, J.R., Prosnitz, L.R., Samulski, T.V., Vujaskovic, Z., Yu, D., Sanders, L.L. et Dewhirst, M.W. (2005). Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 23(13), 3079-3085.
- Jung, C. H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M. et Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1992-2003.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. et Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21), 5720-5728.
- Kafrouni, L. et Savadogo, O. (2016). Recent progress on magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Progress in Biomaterials*, 5(3-4), 147-160.

- Kampinga, H. et Dikomey, E. (2001). Hyperthermic radiosensitization: mode of action and clinical relevance. *International Journal of Radiation Biology*, 77(4), 399-408.
- Kantari, C. et Walczak, H. (2011). Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1813(4), 558-563.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092), 431-436.
- Kaur, P., Hurwitz, M.D., Krishnan, S. et Asea, A. (2011). Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer. *Cancer*, 3(4), 3799-3823.
- Kaushik, S., et Cuervo, A.M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in Cell Biology*, 22(8), 407-417.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. et Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Klionsky, D.J. (2010). The autophagy connection. *Developmental Cell*, 19(1), 11-12.
- Klionsky, D.J. et Codogno, P. (2013). The mechanism and physiological function of macroautophagy. *Journal of Innate Immunity*, 5(5), 427-433.
- Komata, T., Kanzawa, T., Nashimoto, T., Aoki, H., Endo, S., Nameta, M., Takahashi, H., Yamamoto, T., Kondo, S. et Tanaka, R. (2004). Mild heat shock induces autophagic growth arrest, but not apoptosis in U251-MG and U87-MG human malignant glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 68(2), 101-111.
- Kondo, T., Sasaki, K., Matsuyama, R., Morino-Koga, S., Adachi, H., Suico, M.A., Kawashima, J., Motoshima, H., Furukawa, N. et Kai, H. (2012). Hyperthermia with mild electrical stimulation protects pancreatic β -cells from cell stresses and apoptosis. *Diabetes*, 61(4), 838-847.

- Kossatz, S., Grandke, J., Couleaud, P., Latorre, A., Aires, A., Crosbie-Staunton, K., Ludwig, R., Dähring, H., Ettelt, V. et Lazaro-Carrillo, A. (2015). Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast Cancer Research*, *17*(1), 66-83.
- Kraybill, W., Olenki, T., Evans, S., Ostberg, J., O'Leary, K., Gibbs, J. et Repasky, E. (2002). A phase I study of fever-range whole body hyperthermia (FR-WBH) in patients with advanced solid tumours: correlation with mouse models. *International Journal of Hyperthermia*, *18*(3), 253-266.
- Kretz-Remy, C., Munsch, B. et Arrigo, A.-P. (2001). NF κ B-dependent transcriptional activation during heat shock recovery. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(47), 43723-43733.
- Kroemer, G., Mariño, G. et Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, *40*(2), 280-293.
- Kumano, M., Furukawa, J., Shiota, M., Zardan, A., Zhang, F., Beraldi, E., Wiedmann, R.M., Fazli, L., Zoubeydi, A. et Gleave, M.E. (2012). Cotargeting stress-activated Hsp27 and autophagy as a combinatorial strategy to amplify endoplasmic reticular stress in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*(8), 1661-1671.
- Kup, P.G., Nieder, C., Geinitz, H., Henkenberens, C., Besserer, A., Oechsner, M., Schill, S., Mücke, R., Scherer, V. et Combs, S.E. (2015). The prognostic value of irradiated lung volumes on the prediction of intra-/post-operative mortality in patients after neoadjuvant radiochemotherapy for esophageal cancer. A retrospective multicenter study. *Journal of Cancer*, *6*(3), 254-260.
- Labbe, K. et Saleh, M. (2008). Cell death in the host response to infection. *Cell Death and Differentiation*, *15*(9), 1339-1349.
- Landry, J., Bernier, D., Chrétien, P., Nicole, L.M., Tanguay, R.M. et Marceau, N. (1982). Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Research*, *42*(6), 2457-2461.
- Lee, J., Giordano, S. et Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal*, *441*(2), 523-540.

- Lepock. (2004). Role of nuclear protein denaturation and aggregation in thermal radiosensitization. *International Journal of Hyperthermia*, 20(2), 115-130.
- Lepock. (2005). How do cells respond to their thermal environment? *International Journal of Hyperthermia*, 21(8), 681-687.
- Levine, B. et Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, 6(4), 463-477.
- Levine, B. et Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42.
- Levine, B., Sinha, S.C. et Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5), 600-606.
- Levine, B. et Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2679-2688.
- Li, S., Zhou, Y., Fan, J., Cao, S., Cao, T., Huang, F., Zhuang, S., Wang, Y., Yu, X. et Mao, H. (2011). Heat shock protein 72 enhances autophagy as a protective mechanism in lipopolysaccharide-induced peritonitis in rats. *The American Journal of Pathology*, 179(6), 2822-2834.
- Li, T. H., T.L., Haeri, A., Soullié, T., Scholten, C., Seynhaeve, A.L., Eggermont, A.M. et Koning, G.A. (2014). A novel two-step mild hyperthermia for advanced liposomal chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 174, 202-208.
- Li, W.-W., Li, J. et Bao, J.-k. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(7), 1125-1136.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H. et Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature Cell Biology*, 8(7), 688-698.

- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. et Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), 672-676.
- Lin, L. et Baehrecke, E.H. (2015). Autophagy, cell death, and cancer. *Molecular and Cellular Oncology*, 2(3), e985913.
- Ling, V. (1997). Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 40(1), S3-S8.
- Liou, J.-S., Wu, Y.-C., Yen, W.-Y., Tang, Y.-S., Kakadiya, R.B., Su, T.-L. et Yih, L.-H. (2014). Inhibition of autophagy enhances DNA damage-induced apoptosis by disrupting CHK1-dependent S phase arrest. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278(3), 249-258.
- Liu et Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 367-376.
- Liu, Y., Sakamoto, H., Adachi, M., Zhao, S., Ukai, W., Hashimoto, E., Hareyama, M., Ishida, T., Imai, K. et Shinomura, Y. (2012). Heat stress activates ER stress signals which suppress the heat shock response, an effect occurring preferentially in the cortex in rats. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 3987-3993.
- Lutgens, L.C., Koper, P.C., Jobsen, J.J., van der Steen-Banasik, E.M., Creutzberg, C.L., van den Berg, H.A., Ottevanger, P.B., van Rhoon, G.C., van Doorn, H.C. et Houben, R. (2016). Radiation therapy combined with hyperthermia versus cisplatin for locally advanced cervical cancer: Results of the randomized RADCHOC trial. *Radiotherapy and Oncology*, 120(3), 378-382.
- Maiuri, M. C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O. et Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-XL. *Autophagy*, 3(4), 374-376.
- Malhotra, J.D. et Kaufman, R.J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18(6), 716-731.

- Mallory, M., Gogineni, E., Jones, G.C., Greer, L. et Simone, C.B. (2016). Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 97, 56-64.
- Mambula, S.S. et Calderwood, S.K. (2006). Heat induced release of Hsp70 from prostate carcinoma cells involves both active secretion and passive release from necrotic cells. *International Journal of Hyperthermia*, 22(7), 575-585.
- Man, J., Shoemake, J.D., Ma, T., Rizzo, A.E., Godley, A.R., Wu, Q., Mohammadi, A.M., Bao, S., Rich, J.N. et Jennifer, S.Y. (2015). Hyperthermia sensitizes glioma stem-like cells to radiation by inhibiting AKT signaling. *Cancer Research*, 75(8), 1760-1769.
- Mao, H., Li, F., Ruchalski, K., Mosser, D.D., Schwartz, J.H., Wang, Y. et Borkan, S.C. (2003). Hsp72 inhibits focal adhesion kinase degradation in ATP-depleted renal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18214-18220.
- Marino, C. et Cividalli, A. (1992). Combined radiation and hyperthermia: effects of the number of heat fractions and their interval on normal and tumour tissues. *International Journal of Hyperthermia*, 8(6), 771-781.
- Marino, Guillermo, Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H. et Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 15(2), 81-94.
- Martindale, J.L. et Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 1-15.
- Mayer, B. et Oberbauer, R. (2003). Mitochondrial regulation of apoptosis. *Physiology*, 18(3), 89-94.
- Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K. et Arrigo, A.-P. (1996). Small stress proteins as novel regulators of apoptosis heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1-and staurosporine-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16510-16514.
- Meijer, A.J. et Codogno, P. (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(5), 411-425.

- Mercié, P. et Belloc, F. (2001). Mécanismes physiopathologiques et méthodes d'analyse de l'apoptose cellulaire. *La Revue de Médecine Interne*, 22(1), 90-96.
- Milleron, R. et Bratton, S. (2007). 'Heated' debates in apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(18), 2329-2333.
- Momoi, T. (2004). Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28(1), 101-105.
- Mondal, P.K. et Dutta, S. (2014). Review on apoptosis and its role in cancer. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 713-728.
- Monteiro, A., Silva, C.G. et Carrodeguas Villar, J. (2015). Cell spotting--let's fight cancer together!. *Science in School*, 31, 46-52.
- Morlé, A., Garrido, C. et Micheau, O. (2015). Hyperthermia restores apoptosis induced by death receptors through aggregation-induced c-FLIP cytosolic depletion. *Cell Death and Disease*, 6(2), 1633-1643.
- Moscat, J. et Diaz-Meco, M.T. (2009). p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*, 137(6), 1001-1004.
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Denis-Larose, C. et Massie, B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5317-5327.
- Naidu, S.D., Sutherland, C., Zhang, Y., Risco, A., de la Vega, L., Caunt, C.J., Hastie, C.J., Lamont, D.J., Torrente, L. et Chowdhry, S. (2016). Heat Shock Factor 1 Is a Substrate for p38 Mitogen-Activated Protein Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 36(18), 2403-2417.
- Nakahata, K., Miyakoda, M., Suzuki, K., Kodama, S. et Watanabe, M. (2002). Heat shock induces centrosomal dysfunction, and causes non-apoptotic mitotic catastrophe in human tumour cells. *International Journal of Hyperthermia*, 18(4), 332-343.
- Negróni, A., Cucchiara, S. et Stronati, L. (2015). Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediators of Inflammation*, 2015, 250762.

- Ni, H.-M., Bockus, A., Wozniak, A.L., Jones, K., Weinman, S., Yin, X.-M. et Ding, W.-X. (2011). Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. *Autophagy*, 7(2), 188-204.
- Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Arrigo, A.-P. et Kretz-Remy, C. (2009). Autophagy activation by NF κ B is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy*, 5(6), 766-783.
- Nivon, M., Abou-Samra, M., Richet, E., Guyot, B., Arrigo, A.-P. et Kretz-Remy, C. (2012). NF- κ B regulates protein quality control after heat stress through modulation of the BAG3-HspB8 complex. *Journal of Cell Science*, 125(5), 1141-1151.
- Nixon, R.A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 19(8), 983-997.
- Oei, A. L., Vriend, L.E.M., Krawczyk, P.M., Horsman, M.R., Franken, N.A.P. et Crezee, J. (2017). Targeting therapy-resistant cancer stem cells by hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 10, 1464-1476.
- Oei, A. L., van Leeuwen, C.M., ten Cate, R., Rodermond, H.M., Buist, M.R., Stalpers, L.J., Crezee, J., Kok, H.P., Medema, J.P. et Franken, N.A. (2015). Hyperthermia selectively targets human papillomavirus in cervical tumors via p53-dependent apoptosis. *Cancer Research*, 75(23), 5120-5129.
- Ogata, M., Hino, S.-i., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I. et Yoshinaga, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9220-9231.
- Ohguri, T. (2016). Combination by Hyperthermia and Radiation (and Chemotherapy): Lung Cancer. Dans Kokura (dir.), *Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside* (Springer éd., p. 193-200). Singapour : Kokura, Satoshi, Yoshikawa, Toshikazu, Ohnishi, Takeo.
- Ola, M.S., Nawaz, M. et Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 351(1-2), 41-58.

- Oral, O., Oz-Arslan, D., Itah, Z., Naghavi, A., Deveci, R., Karacali, S. et Gozuacik, D. (2012). Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis*, 17(8), 810-820.
- Orrenius, S., Gogvadze, V. et Zhivotovsky, B. (2015). Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(1), 72-81.
- Orrenius, S., Kaminsky, V.O. et Zhivotovsky, B. (2013). Autophagy in toxicology: cause or consequence? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 275-297.
- Overgaard, J. (2013). The heat is (still) on—the past and future of hyperthermic radiation oncology. *Radiotherapy and Oncology*, 109(2), 185-187.
- Owusu, R.A., Abern, M.R. et Inman, B.A. (2013). Hyperthermia as adjunct to intravesical chemotherapy for bladder cancer. *BioMed Research International*, 2013, 1-12.
- Palazzi, M., Maluta, S., Dall'Oglio, S. et Romano, M. (2010). The role of hyperthermia in the battle against cancer. *Tumori*, 96(6), 902.
- Palazzi, M., Maluta, S., Dall'Oglio, S. et Romano, M. (2009). Le Quatrième Mousquetaire dans la lutte contre le Cancer: l'Hyperthermie.
- Pallepati et Averill-Bates. (2010). Mild thermotolerance induced at 40° C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495(2), 97-111.
- Pallepati et Averill-Bates. (2011a). Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: protective role of mild heat preconditioning at 40 C. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1813(12), 1987-1999.
- Pallepati et Averill-Bates. (2011b). Mild thermotolerance induced at 40 C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(6), 667-679.

- Pallepati et Averill-Bates. (2012). Reactive Oxygen Species, Cell Death Signaling and Apoptosis. Dans Pantopoulos, K. et H. Schipper (dir.). *Principles of Free Radical Biomedicine*(Montreal, QC : Nova Science Publishers, Inc.), 513-546.
- Pan, H., Wang, Z., Jiang, L., Sui, X., You, L., Shou, J., Jing, Z., Xie, J., Ge, W. et Cai, X. (2014). Autophagy inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma to the multikinase inhibitor linifanib. *Scientific Reports*, 4, 6683-6693.
- Peer, A.J., Grimm, M.J., Zynda, E.R. et Repasky, E.A. (2010). Diverse immune mechanisms may contribute to the survival benefit seen in cancer patients receiving hyperthermia. *Immunologic Research*, 46(1-3), 137-154.
- Pennarun, B., Meijer, A., de Vries, E.G., Kleibeuker, J.H., Kruyt, F. et de Jong, S. (2010). Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1805(2), 123-140.
- Perera, Y., Del Toro, N., Gorovaya, L., Fernandez-De-Cossio, J., Farina, H.G. et Perea, S.E. (2014). Synergistic interactions of the anti-casein kinase 2 CIGB-300 peptide and chemotherapeutic agents in lung and cervical preclinical cancer models. *Molecular and Clinical Oncology*, 2(6), 935-944.
- Pietrocola, F., Izzo, V., Niso-Santano, M., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Maiuri, M.C. et Kroemer, G. (2013). Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Seminars in Cancer Biology*, 23(5), 310-322.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. et Greenwood, M.T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1813(1), 238-259.
- Rai, N.K., Tripathi, K., Sharma, D. et Shukla, V.K. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 4(3), 138-144.
- Rastrelli, M., Campana, L.G., Valpione, S., Tropea, S., Zanon, A. et Rossi, C.R. (2016). Hyperthermic isolated limb perfusion in locally advanced limb soft tissue sarcoma: A 24-year single-centre experience. *International Journal of Hyperthermia*, 32(2), 165-172.

- Ravikumar, Brinda, Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D.C., Menzies, F.M., Narayanan, U. et Renna, M. (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(11), 1707-1711.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M. et Luo, S. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 90(4), 1383-1435.
- Redza-Dutordoir, M. et Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992.
- Redza-Dutordoir, M., Kassis, S., Ve, H., Grondin, M. et Averill-Bates, D.A. (2016). Inhibition of autophagy sensitizes cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis: protective effect of mild thermotolerance acquired at 40° C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 3050-3064.
- Ren, Y., Zhang, H., Chen, B., Cheng, J., Cai, X., Liu, R., Xia, G., Wu, W., Wang, S. et Ding, J. (2012). Multifunctional magnetic Fe. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2261-2269.
- Richter, K., Haslbeck, M. et Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*, 40(2), 253-266.
- Ringer, L., Sirajuddin, P., Tricoli, L., Wayne, S., Choudhry, M.U., Parasido, E., Sivakumar, A., Heckler, M., Naeem, A. et Abdelgawad, I. (2014). The induction of the p53 tumor suppressor protein bridges the apoptotic and autophagic signaling pathways to regulate cell death in prostate cancer cells. *Jefferson Digital Commons*, 5(21), 10678-10691.
- Ritossa, F. (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress and Chaperones*, 1(2), 97-98.
- Roti J.L., (2008). Cellular responses to hyperthermia (40–46 C): Cell killing and molecular events. *International Journal of hyperthermia*, 24(1), 3-15.

- Rubinstein, A.D., Eisenstein, M., Ber, Y., Bialik, S. et Kimchi, A. (2011). The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, 44(5), 698-709.
- Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O. et Klionsky, D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(4), 304-312.
- Ryan, K.M. (2011). p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *European Journal of Cancer*, 47(1), 44-50.
- Sakaguchi, Y., Stephens, L.C., Makino, M., Kaneko, T., Strebel, F.R., Danhauser, L.L., Jenkins, G.N. et Bull, J.M. (1995). Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia in rats. *Cancer Research*, 55(22), 5459-5464.
- Salvesen, G.S. et Riedl, S.J. (2008). Caspase mechanisms. Dans *Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy* (Springer éd., p. 13-23). Boston : Khosravi-Far, Roy, White, Eileen.
- Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S. et Orrenius, S. (1999). Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death and Differentiation*, 6(6), 495-496.
- Sano, R. et Reed, J.C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1833(12), 3460-3470.
- Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society Transactions*, 41(5), 1103-1130.
- Savitskaya, M. et Onishchenko, G. (2015). Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 80(11), 1393-1405.
- Schaaf, L., Van Der Kuip, H., Mürdter, T.E., Ulmer, C. et Aulitzky, W.E. (2014). Effects of hyperthermia on DNA repair capacity and long term survival in ovarian and colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 74(19), 22-27.

- Schneider, J.L. et Cuervo, A.M. (2014). Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(3), 187-200.
- Seegenschmiedt, M. et Vernon, C. (1995). A historical perspective on hyperthermia in oncology. Dans *Thermoradiotherapy and Thermochemotherapy* (Springer éd., p. 3-44). Verlag : Seegenschmiedt, M.Heinrich, Fessenden, Peter, Vernon, Clare C. .
- Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T.R., Matsuda, F. et Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*, 344(6188), 1164-1168.
- Seglen et Gordon, P.B. (1981). Vanadate inhibits protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 256(15), 7699-7701.
- Seglen et Gordon, P.B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(6), 1889-1892.
- Seifert, G., Budach, V., Keilholz, U., Wust, P., Eggert, A. et Ghadjar, P. (2016). Regional hyperthermia combined with chemotherapy in paediatric, adolescent and young adult patients: current and future perspectives. *Radiation Oncology*, 11(1), 65-72.
- Shacka, J.J., Klocke, B.J., Shibata, M., Uchiyama, Y., Datta, G., Schmidt, R.E. et Roth, K.A. (2006). Bafilomycin A1 inhibits chloroquine-induced death of cerebellar granule neurons. *Molecular Pharmacology*, 69(4), 1125-1136.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. et Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22(4), 526-539.
- Shellman, Y.G., Howe, W.R., Miller, L.A., Goldstein, N.B., Pacheco, T.R., Mahajan, R.L., LaRue, S.M. et Norris, D.A. (2008). Hyperthermia induces endoplasmic reticulum-mediated apoptosis in melanoma and non-melanoma skin cancer cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(4), 949-956.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*, 9(3), 459-470.

- Shintani, T. et Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698), 990-995.
- Shore, G.C., Papa, F.R. et Oakes, S.A. (2011). Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(2), 143-149.
- Shpilka, T., Mizushima, N. et Elazar, Z. (2012). Ubiquitin-like proteins and autophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(10), 2343-2348.
- Singh, I.S. et Hasday, J.D. (2013). Fever, hyperthermia and the heat shock response. *International Journal of Hyperthermia*, 29(5), 423-435.
- Skibba, J., Jones, F. et Condon, R. (1982). Altered hepatic disposition of doxorubicin in the perfused rat liver at hyperthermic temperatures. *Cancer Treatment Reports*, 66(6), 1357-1363.
- Song, C., Park, H., Lee, C. et Griffin, R. (2005). Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *International Journal of Hyperthermia*, 21(8), 761-767.
- Souslova, T. et Averill-Bates, D.A. (2004). Multidrug-resistant hela cells overexpressing MRP1 exhibit sensitivity to cell killing by hyperthermia: interactions with etoposide. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 60(5), 1538-1551.
- Sprick, M.R. et Walczak, H. (2004). The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1644(2), 125-132.
- Sreedhar, A.S. et Csermely, P. (2004). Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 101(3), 227-257.
- Subject, J., Sciandra, J. et Johnson, R. (1982). Heat shock proteins and thermotolerance; a comparison of induction kinetics. *The British Journal of Radiology*, 55(656), 579-584.

- Sugahara, T., Van Der Zee, J., Kampinga, H.H., Vujaskovic, Z., Kondo, M., Ohnishi, T., Li, G., Park, H.J., Leeper, D.B. et Ostapenko, V. (2008). Kadota fund international forum 2004. Application of thermal stress for the improvement of health, 15–18 June 2004, Awaji Yumebutai international conference center, Awaji Island, Hyogo, Japan. Final report. *International Journal of Hyperthermia*, 24(2), 123-140.
- Sulyok, I., Fleischmann, E., Stift, A., Roth, G., Lebherz-Eichinger, D., Kasper, D., Spittler, A. et Kimberger, O. (2012). Effect of preoperative fever-range whole-body hyperthermia on immunological markers in patients undergoing colorectal cancer surgery. *British Journal of Anaesthesia*, 109(5), 754-761.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H.D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J.U., Cheng, J.Q. et Mul, J.J. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1142-1151.
- Thoreen, C.C. et Sabatini, D.M. (2009). Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy*, 5(5), 725-726.
- Tilly, W., Wust, P., Rau, B., Harder, C., Gellermann, J., Schlag, P., Budach, V. et Felix, R. (2001). Temperature data and specific absorption rates in pelvic tumours: predictive factors and correlations. *International Journal of Hyperthermia*, 17(2), 172-188.
- Tilly, W., Gellermann, J., Graf, R., Hildebrandt, B., Weißbach, L., Budach, V., Felix, R. et Wust, P. (2005). Regional hyperthermia in conjunction with definitive radiotherapy against recurrent or locally advanced prostate cancer T3 pN0 M0. *Strahlentherapie und Onkologie*, 181(1), 35-41.
- Toraya-Brown, S. et Fiering, S. (2014). Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. *International Journal of Hyperthermia*, 30(8), 531-539.
- Twombly, R. (2010). International study of hyperthermia spurs hope in US advocates. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(2), 79-81.
- Valdagni, R. et Amichetti, M. (1994). Report of long-term follow-up in a randomized trial comparing radiation therapy and radiation therapy plus hyperthermia to metastatic lymphnodes in stage IV head and neck patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 28(1), 163-169.

- van der Zee, J. (2002). Heating the patient: a promising approach? *Annals of Oncology*, 13(8), 1173-1184.
- van der-Zee, J. et González, D.G. (2002). The Dutch deep hyperthermia trial: results in cervical cancer. *International Journal of Hyperthermia*, 18(1), 1-12.
- van der Zee, J., González, D., van Rhoon, G.C., van Dijk, J.D., van Putten, W.L. et Hart, A.A. (2000). Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. *The Lancet*, 355(9210), 1119-1125.
- van der Zee, J. et van Rhoon, G.C. (2006). Hyperthermia is effective in improving clinical radiotherapy results. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 66(2), 633-634.
- van der Zee, J., Vujaskovic, Z., Kondo, M. et Sugahara, T. (2008). The Kadota fund international forum 2004—Clinical group consensus. *International Journal of Hyperthermia*, 24(2), 111-122.
- Vanneman, M. et Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature Reviews in Cancer*, 12(4), 237-251.
- Vaupel, P., Kallinowski, F. et Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Research*, 49(23), 6449-6465.
- Velichko, A.K., Markova, E.N., Petrova, N.V., Razin, S.V. et Kantidze, O.L. (2013). Mechanisms of heat shock response in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(22), 4229-4241.
- Vertrees, R.A., Leeth, A., Girouard, M., Roach, J.D. et Zwischenberger, J.B. (2002). Whole-body hyperthermia: a review of theory, design and application. *Perfusion*, 17(4), 279-290.
- Walter, P. et Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086.

- Wang et Kaufman, R.J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529(7586), 326-335.
- Wesselborg, S. et Stork, B. (2015). Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(24), 4721-4757.
- Westermann, A.M., Jones, E.L., Schem, B.C., van der Steen-Banasik, E.M., Koper, P., Mella, O., Uitterhoeve, A.L., de Wit, R., van der Velden, J. et Burger, C. (2005). First results of triple-modality treatment combining radiotherapy, chemotherapy, and hyperthermia for the treatment of patients with Stage IIB, III, and IVA cervical carcinoma. *Cancer*, 104(4), 763-770.
- Westermark. (1898). Über die behandlung des ulceration cervix-carcinoma mittels konstanter warme. 22, 1335-1339.
- Wirawan, E., Walle, L.V., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J. et Declercq, W. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death and Disease*, 1(1), e18.
- Wrzal, P.K., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2008). Molecular mechanisms of apoptosis activation by heat shock in multidrug-resistant Chinese hamster cells. *Radiation Research*, 170(4), 498-511.
- Wu, Y.-T., Tan, H.-L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M.R., Ong, C.-N., Codogno, P. et Shen, H.-M. (2010). Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), 10850-10861.
- Würstle, M.L., Laussmann, M.A. et Rehm, M. (2012). The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Experimental Cell Research*, 318(11), 1213-1220.
- Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R. et Schlag, P. (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology*, 3(8), 487-497.

- Wyllie, A.H. (2010). "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Molecular Neurobiology*, 42(1), 4-9.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R. et Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Structure and Function*, 23(1), 33-42.
- Yamamuro, A., Kishino, T., Ohshima, Y., Yoshioka, Y., Kimura, T., Kasai, A. et Maeda, S. (2011). Caspase-4 Directly Activates Caspase-9 in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 115(2), 239-243.
- Yang, Y., Xing, D., Zhou, F. et Chen, Q. (2010). Mitochondrial autophagy protects against heat shock-induced apoptosis through reducing cytosolic cytochrome c release and downstream caspase-3 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395(2), 190-195.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. et Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H (+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17707-17712.
- Youle, R.J. et Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 12(1), 9-14.
- Young, M. M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A.K., Amin, S., Hu, C.-D. et Zhang, J. (2012). Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 12455-12468.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T. et Simon, H.-U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*, 8(10), 1124-1132.
- Zager, J.S. (2014). The Role of Regional Perfusion for Locoregionally Metastatic Melanoma. *CME*, 10(2), 13-17.

- Zhang, M. et Calderwood, S.K. (2011). Autophagy, protein aggregation and hyperthermia: a mini-review. *International Journal of Hyperthermia*, 27(5), 409-414.
- Zhang, M., Jiang, M., Bi, Y., Zhu, H., Zhou, Z. et Sha, J. (2012). Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice. *PloS One*, 7(7), e41412.
- Zhao, Y., Gong, S., Shunmei, E. et Zou, J. (2009). Induction of macroautophagy by heat. *Molecular Biology Reports*, 36(8), 2323-2327.
- Zhi, X. et Zhong, Q. (2015). Autophagy in cancer. *F1000prime reports*, 7, 18-30.
- Zhivotovsky, B. et Orrenius, S. (2010). Cell death mechanisms: cross-talk and role in disease. *Experimental Cell Research*, 316(8), 1374-1383.