

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE MÉCANISTIQUE DES PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA TRANSITION ENTRE AUTOPHAGIE
ET APOPTOSE LORS D'UN CHOC THERMIQUE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

JOANNA AUGUSTIN

FÉVRIER 2024

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.12-2023). 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.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser toute ma gratitude à ma directrice, Dre Diana Averill, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je veux la remercier d'autant plus pour ses conseils et son soutien au cours de ces deux dernières années. Son aide et sa patience envers moi se sont révélées très précieuses durant le projet.

Je souhaite aussi souligner le soutien et l'aide que m'ont apportés mes collègues de laboratoire. Je remercie la Dre Mélanie Grondin pour le soutien et les conseils fournis lors de ce projet. Je voudrais souligner ma reconnaissance envers William Bouard et le Pr François Ouellet pour leurs aides, leurs idées et pour avoir maintenu une ambiance de travail conviviale.

Je remercie Khadija Rezki, sans qui ces deux années auraient été des plus monotones. Tu as mis de la bonne humeur dans cette période de pandémie et tu as été une personne de confiance et de réconfort. Je te remercie pour tous nos fous rires et nos discussions aussi tard le soir que tôt le matin.

Je suis reconnaissante à Roxanne Ricard de m'avoir écoutée et permis de me changer les idées dans les périodes difficiles. Malgré la distance, tu as toujours été là pour m'encourager et me maintenir à l'ordre.

Je termine en remerciant mes amis et ma famille pour leur soutien, mais particulièrement mon conjoint qui m'a soutenue et épaulée au travers de ces années d'études et incitée à continuer pour l'atteinte de ce mémoire. J'exprime également un énorme merci à mon père pour son soutien de toujours, de m'avoir conseillée, de m'avoir guidée lors de moments difficiles et d'avoir été une oreille attentive durant toutes ces années.

DÉDICACE

À mon grand-père, pour qu'un jour on trouve un
traitement contre le diabète.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
DÉDICACE.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	viii
RÉSUMÉ.....	xi
CHAPITRE 1 Introduction.....	1
1.1 Hyperthermie.....	1
1.1.1 Mécanismes biologiques.....	2
1.2 La thermotolérance.....	4
1.2.1 Implications biochimiques.....	4
1.3 Survie cellulaire à l'aide de l'activation de l'autophagie.....	5
1.3.1 Macro-autophagie.....	6
1.3.1.1 L'initiation.....	6
1.3.1.2 La nucléation.....	7
1.3.1.3 L'élongation.....	8
1.3.1.4 La maturation et fusion.....	9
1.4 La mort cellulaire par apoptose.....	11
1.4.1 Voie extrinsèque de l'apoptose.....	12
1.4.2 Apoptose via la mitochondrie.....	12
1.4.3 Apoptose via la voie du réticulum endoplasmique.....	15
1.4.4 La phase exécutive de l'apoptose.....	16
1.5 Interrelation entre la survie et la mort cellulaire.....	17
1.5.1 L'inter inhibition entre l'apoptose et l'autophagie.....	17
1.5.2 La bivalence de complexe ou protéines.....	19
1.5.2.1 Sérine/thréonine kinase.....	19
1.5.2.2 Autophagosome.....	20
1.6 Protéines d'intérêts.....	21
1.6.1 Bécline-1.....	21
1.6.1.1 Implication dans l'autophagie.....	21
1.6.1.2 Inhibition de la protéine Bécline-1.....	22
1.6.1.3 L'importance de la version clivée de Bécline-1 dans la cellule.....	22
1.6.2 ATG5.....	23
1.6.2.1 L'importance d'ATG5 dans l'autophagie.....	24
1.6.2.2 L'implication d'ATG5 dans la cellule.....	24
1.6.2.3 Impact de la version clivée d'ATG5 sur la cellule.....	25

1.7	Présentation du projet	25
1.7.1	Introduction	25
1.7.2	Hypothèses	27
1.7.3	L'objectif et la démarche.....	27
CHAPITRE 2 Matériel et Méthodes.....		28
2.1	Culture des cellules HeLa.....	28
2.2	Choc thermique à 42 °C.....	28
2.3	Fractionnement subcellulaire : mitochondries et cytosol.....	28
2.4	Immunobuvardage du type Western.....	29
2.5	Anticorps pour l'immunobuvardage de type Western.....	29
2.6	Analyse cinétique du potentiel membranaire mitochondriale par microscopie confocale.....	29
2.7	Activité des caspases	30
2.8	Inhibition de l'activité des caspases.....	30
2.9	Microscopie confocale.....	31
2.10	Analyses statistiques.....	31
CHAPITRE 3 Résultats		32
3.1	Augmentation de protéines liées à l'autophagie et l'apoptose lors d'un traitement thermique à 42°C.....	32
3.2	Le choc thermique génère le clivage d'ATG5.....	32
3.3	Translocation d'ATG5 clivée du cytosol vers la mitochondrie	33
3.4	Interaction entre ATG5 clivée avec la protéine BCL-xL.....	35
3.5	Clivage d'ATG5 par les caspases 4, 9 et calpaine.	35
3.6	Activation de l'apoptose via la mitochondrie par l'influence d'ATG5 clivée	39
3.7	L'inhibition d'ATG5 clivée causée par la thermotolérance.....	40
3.8	La protéine Bécline-1	43
3.8.1	Implication de Bécline-1 lors d'un choc thermique.....	43
3.8.2	Implication de Bécline-1 chez les cellules thermotolérantes.....	43
CHAPITRE 4 Discussion		47
4.1	Récapitulatif de l'objectif.....	47
4.2	Retour des résultats.....	47
4.3	Transition de l'autophagie vers l'apoptose.....	48
4.4	La transition vers l'apoptose : la protéine ATG5.....	51
4.4.1	Les effets de l'hyperthermie sur l'expression et le clivage d'ATG5	51
4.4.2	L'incidence d'ATG5 clivée sur la protéine anti-apoptotique BCL-xL et sur la mitochondrie ...	52
4.4.3	Perspectives d'avenir.....	54

4.5	Le passage vers l'activité apoptotique de Bécline-1	55
4.5.1	L'influence de l'hyperthermie sur Bécline-1	55
4.5.2	Perspectives d'avenir.....	57
4.6	L'incidence de la thermotolérance sur les protéines ATG5 et Bécline-1.....	58
	CONCLUSION	60
	BIBLIOGRAPHIE.....	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Aperçue des étapes de la macro-autophagie.	8
Figure 1.2 Les protéines impliquées dans la fusion de l'autophagosome au lysosome.	10
Figure 1.3 Voies d'activation de l'apoptose par la voie extrinsèque et les voies intrinsèques.....	14
Figure 3.1 Augmentation d'expression des protéines liées à l'autophagie et l'apoptose lors d'un choc thermique à 42°C.	33
Figure 3.2 Clivage de l'ATG5 lors d'un choc thermique à 42 °C.	34
Figure 3.3 Expression d'ATG5 clivée dans la partie cytosolique et mitochondriale lors d'un choc thermique à 42 °C chez des cellules normales et thermotolérantes (TT).	36
Figure 3.4 Colocalisation d'ATG5 clivée à la mitochondrie lors d'un choc thermique à 42 °C.	37
Figure 3.5 Interaction d'ATG5 avec la protéine anti-apoptotique BCL-xL lors d'un choc thermique.	38
Figure 3.6 Inhibition du clivage d'ATG5 par les inhibiteurs de protéases lors d'un choc thermique.	41
Figure 3.7 Diminution de l'intégrité mitochondriale lors d'un choc thermique à 42 °C.	42
Figure 3.8 Augmentation de l'expression de Bécline-1 lors d'un choc thermique à 42 °C chez des cellules normales et thermotolérantes [TT].	44
Figure 3.9 Influence du choc thermique sur l'expression et la colocalisation de Bécline-1 à la mitochondrie à la suite d'un choc thermique à 42 °C.....	45
Figure 4.1 Mécanistique d'ATG5 et Bécline-1 lors d'un choc thermique à 42 °C	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

A1	BCL-2A1
AIF	« Apoptosis-inducing factor »
AKT	« Protein kinase B »
AMBRA	« Activating molecule in BECN1-Regulated Autophagy »
AMPK	« Adenosine monophosphate-activated protein kinase »
Apaf-1	« Apoptotic peptidase activating factor 1 »
ASK1	« Apoptosis signal-regulating kinase 1 »
ATF4	« Activating transcription factor 4 »
ATG	« Autophagy-related protein »
ATM	« Ataxia-telangiectasia mutated »
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	« Ataxia-telangiectasia and Rad3 related »
BAD	« BCL2 associated agonist of cell death »
BAK	« BCL-2 homologous antagonist/killer »
Bap31	« B-cell receptor-associated protein 31 »
BAX	« BCL-2-associated X protein »
BCL2	« B-cell lymphoma 2 »
BCL-B	« BCL-2-like-10 »
BCL-W	« B-cell lymphoma-w »
BCL-xL	« B-cell lymphoma-extra large »
BCN1	Bécline-1
BH	Domaine d'homologie de BCL2
BID	« BH3 interacting-domain death agonist »
BIF1	« B1/Bax-interacting factor 1 »
BIK	« BCL2 Interacting Killer »
BIM	« BCL-2-like-11 »
BIMel	« BIM extra long »
BIMl	« BIM-long »
BIMs	« BIM-short »
BMF	« BCL-2-modifying factor »
BOK	« BCL2-related ovarian killer »
BSA	« Bovine serum albumin »
Ca ²⁺	Calcium (II)
CAD	ADNase activé par les caspases
CARD	« Caspase activation and recruitment domains »
Caspase	« Cysteine-dependent, aspartate-specific peptidases »
CCD	« Coiled-coiled domain »
CD8	« Cluster de différenciation 8 »
cFLICE	« Cellular FLICE-like inhibitory protein »
CHO	Cellules d'ovaire de hamster : Cricetulus griseus
CHOP	« C/EBP homologous protein »
Cyt C	Cytochrome C
DAPK	Protéine kinase associée à la mort

DFFA	« DNA fragmentation factor subunit alpha »
DFFB	« DNA fragmentation factor beta »
DISC	« Death-inducing signaling complex »
DLC1	« Dynein light chain 1 »
eIF2alpha	« Eukaryotic translation initiation factor 2A »
EPG5	« Ectopic P-granules 5 autophagy »
ERAD	« Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation »
ERO	Espèce réactive à l'oxygène
ESCRTs	« Endosomal sorting complexes required for transport »
FADD	« FAS-associated death domain protein »
Fas-L	Ligand du récepteur Fas
FIP200	« Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD »
FYCO1	« Coiled-Coil Domain Autophagy Adaptor 2 »
FYVE	« FYVE zinc finger domain »
GABARAP	« g-aminobutyric acid (GABA) type A receptor associated protein »
HOPS	« Homotypic fusion and protein sorting »
HRK	« Activator of apoptosis harakiri »
HSF1	« Heat shock factor 1 »
HSP	« Heat Shock Protein »
HTRA2	« Serine protease HTRA2 »
IAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose
IRE-1alpha	« Inositol-requiring protein 1 alpha »
JNK	« c-Jun N-terminal kinase »
LC3	« Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A »
MAPK	« Mitogen-activated protein kinase »
MCL-1	« Myeloid cell leukaemia sequence 1 »
MST1	« Macrophage Stimulating 1 »
mTORC1	« Mammalian target of rapamycin »
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NOXA	« Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein1 »
NRBF2	« Nuclear receptor-binding factor 2 »
Nrf2	« Nuclear Factor erythroid 2-related factor 2 »
PE	Phosphatidylethanolamine
PERK	« Protein Kinase RNA-Like ER Kinase »
PI3K III	Phosphoinositide 3-kinase de classe 3
PKD	« Protein kinase D »
PLEKHM1	« Pleckstrin homology domain-containing family M member 1 »
PUMA	« BCL-2-binding component-3 »
RAB7	« Ras-related protein Rab-7a »
RE	Réticulum endoplasmique
RILP	« Rab-interacting lysosomal protein »
ROCK1	« Rho kinase 1 »
SMAC	« Second mitochondria-derived activator of caspases »
SNAP29	« Synaptosomal-associated protein 29 »
STX17	Syntaxin 17
TNF	« Tumor necrosis factors »
TOM	« Translocon of the outer membrane »

Traf-2	« TNF receptor-associated factor 1 »
TRAIL	« Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand »
TSC1/2	« Tuberous sclerosis complex »
ULK1	« Unc-51 like autophagy activating kinase »
UPR	« Unfolded Protein Response »
UVRAG	« UV resistance-associated gene »
VAMP8	« Vesicle-associated membrane protein 8 »
VPS34	« Vacuolar protein sorting 34 »
XBP-1	Protéine de liaison à la X-box 1

RÉSUMÉ

L'hyperthermie se définit comme étant une augmentation de la température corporelle. Elle est actuellement utilisée contre le cancer comme traitement complémentaire à la chimiothérapie, à la radiothérapie ou à la chirurgie. Cette méthode est employée comme traitement en raison de ses effets cytotoxiques sur les cellules. L'hyperthermie affecte entre autres l'altération des protéines, la réparation de l'ADN, la redistribution vasculaire et le système immunitaire. Toutes ces modifications dépendent de l'intensité et la durée de l'hyperthermie. En fonction du type d'hyperthermie, différentes voies de signalisation se feront activer telles que l'autophagie ou l'apoptose. La compréhension individuelle de chacun de ces mécanismes a grandement avancé au cours des dernières années ; cependant, la transition entre ces deux mécanismes est moins étudiée dans le contexte de l'hyperthermie. Certaines recherches ont permis de dévoiler les prémices concernant la transition entre l'autophagie et l'apoptose. Il a été stipulé que les protéines ATG5 et Bécline-1 auraient une implication lors de cette transition. Plus précisément, les deux protéines seraient clivées et activeraient l'apoptose. Pour ce projet, il y a deux hypothèses. D'abord, le choc thermique, sur des cellules HeLa, engendre le clivage d'ATG5 et Bécline-1 suivi de leurs translocations vers la mitochondrie où ces protéines peuvent stimuler la mort via la mitochondrie. Concernant la seconde hypothèse, nous supposons que le clivage d'ATG5 et Bécline-1 sera altéré, chez les cellules thermotolérantes, en raison de l'acquisition d'une résistance thermique. L'objectif de cette étude est de mieux comprendre l'implication de ces deux protéines dans l'activation de l'apoptose à la suite de l'activation de l'autophagie lors d'hyperthermie. L'étude du mécanisme s'effectue par l'analyse des protéines à la suite d'hyperthermie. Les résultats ont montré que lors de l'hyperthermie, ATG5 et Bécline-1 sont clivées et cela serait causé probablement par des protéines pro-apoptotiques. Ensuite, les protéines ATG5 et Bécline-1 migrent du cytosol vers la mitochondrie. Parallèlement à la translocation, on observe la déstabilisation du potentiel membranaire mitochondrial et le relâchement de protéines pro-apoptotiques telles que cytochrome C. Enfin, pour accentuer l'apoptose, ATG5 clivée se lie avec la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. L'ensemble de résultats suppose que la protéine clivée favorise l'apoptose. Une meilleure compréhension de ce mécanisme permettrait de mieux cibler les cellules lors de maladies (cancers, maladies auto-immunes) où l'apoptose est réprimée.

Mots clés : Hyperthermie, ATG5, Bécline-1, Autophagie, Apoptose

CHAPITRE 1

Introduction

1.1 Hyperthermie

Chez l'humain, l'hyperthermie se définit comme étant une augmentation de la température corporelle qui se situe à 37 °C. À la suite de l'augmentation de la température, le corps éprouve de la difficulté à réguler sa température interne. En règle générale, l'hyperthermie est causée par l'exposition du corps dans un environnement chaud, tel que des canicules, ou à la suite de la prise de médicaments, comme les antipsychotiques (Zonnenberg *et al.*, 2017), qui génèrent un coup de chaleur à l'organisme.

Dans l'histoire de l'humanité, certains récits racontent l'utilisation de l'hyperthermie comme traitement de différentes maladies. Un papyrus de l'époque égyptienne a été retrouvé. Ce dernier raconte l'histoire d'un Égyptien voulant utiliser des « Heat stick » pour traiter un cancer du sein (Bettaieb *et al.*, 2013; Habash, 2018). On trouve d'autres traces dans l'histoire de l'humanité de l'utilisation de la chaleur comme traitement pour des maladies chez différents peuples : les Romains, les Japonais, les Indiens et les Chinois. Vers la fin du 19^e siècle, le Dr Coley a développé un traitement contre le cancer appelé « La toxine de Coley » (Decker et Safdar, 2009; Nauts *et al.*, 1953). Ce traitement avait recours à l'hyperthermie. Le traitement consistait à utiliser des bactéries pour induire la fièvre chez des patients atteints d'un cancer. Cependant, le manque d'efficacité prédictible et d'exactitude concernant le traitement a mené à l'abandon de la recherche sur l'hyperthermie durant quelques décennies. Ce n'est que durant les années 1960 et 1970, lors des nouvelles découvertes, qu'il a connu un regain d'intérêt. Effectivement, des chercheurs ont constaté que l'impact cytotoxique variait chez les cellules en fonction du type cellulaire, de l'intensité et de la durée de l'hyperthermie (Crile, 1963). En outre, ils ont aussi découvert que l'hyperthermie affecte davantage les cellules cancéreuses en comparaison aux cellules saines. L'intention était de pouvoir utiliser cette méthode comme traitement contre le cancer. Dans la société occidentale actuelle, l'hyperthermie est utilisée comme traitement complémentaire à la chirurgie et à la radiothérapie contre le cancer (Crezee *et al.*, 2021).

Actuellement, il existe deux grands niveaux d'hyperthermie. Il y a la condition modérée (non létale) où les dommages peuvent être réversibles et la condition sévère (létale) où les dommages sont irréversibles (Bettaieb *et al.*, 2013). Les distinctions entre les deux conditions, c'est-à-dire modérée ou sévère, dépendent de la durée et de l'intensité de l'hyperthermie. Les cellules sont en condition modérée lorsqu'elles sont exposées à des températures situées entre 39 à 41 °C alors que les cellules sont en condition sévère lorsqu'elles sont exposées à des températures supérieures à 42 °C (Bettaieb *et al.*, 2013).

1.1.1 Mécanismes biologiques

L'hyperthermie engendre différentes altérations de fonctions dans les cellules. L'impact des changements sur les cellules sera influencé par le type cellulaire, l'intensité d'exposition et la durée d'exposition. Par exemple, lors d'un stress de courte durée (moins d'une heure) d'un niveau modéré, situé entre 39-41 °C, on favorise l'activation de la voie pour la survie cellulaire telle que le mécanisme d'autophagie. En revanche, si le stress est d'intensité élevée, on favorise la mort cellulaire. On peut distinguer deux types de morts cellulaires dépendant de l'intensité de l'hyperthermie, soit l'apoptose ou la nécrose (Bettaieb *et al.*, 2013).

L'une de ces modifications cellulaires est l'altération de la quantité de protéines mal repliées. À la suite du stress, on observe une augmentation des protéines mal repliées ; cette accumulation engendre l'activation de la voie UPR (« Unfolded Protein Response ») pour résister au choc thermique (Ahmed *et al.*, 2020; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Les protéines nucléaires sont davantage assujetties à des altérations par l'hyperthermie ; cela peut causer l'arrêt du cycle cellulaire lors de leur accumulation (Sugahara *et al.*, 2008). Outre l'aspect du repliement, les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation ou l'ubiquitination sont altérées (Bettaieb *et al.*, 2013). En plus de l'influence sur les protéines lors d'hyperthermie, on observe une augmentation de la production des espèces réactives à l'oxygène (EROs). À la suite de l'augmentation des EROs, ces derniers vont affecter l'intégrité mitochondriale, ce qui va pouvoir mener à une mort cellulaire (Bettaieb *et al.*, 2013).

Sur le plan nucléaire, plusieurs voies ou processus sont affectés. Concernant le cycle cellulaire, l'impact est variable. Les cellules en phase mitotique sont les plus affectées par l'hyperthermie.

L'impact de l'hyperthermie sur le cycle cellulaire s'expliquerait par l'altération du fonctionnement des protéines « Ataxia-telangiectasia mutated » (ATM) et « Ataxia-telangiectasia and Rad3 related » (ATR) (Oei *et al.*, 2015). Ces protéines seraient les cibles de l'hyperthermie et elles affecteraient le cycle cellulaire, car elles seraient impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire. D'autres recherches ont montré l'impact négatif de l'hyperthermie sur la recombinaison homologue. Pour ce faire, l'hyperthermie inhibe le recrutement de la protéine RAD51 (protéine impliquée dans la réparation de l'ADN) (Raouf *et al.*, 2014) et cela influence négativement la réparation dans la fourche de réplication. En effet, on observe une hausse de cassures du double brin d'ADN. En outre, le mécanisme de séparation des chromosomes est altéré (Bettaieb *et al.*, 2013).

Sur le plan physiologique, l'hyperthermie joue un rôle sur la fluidité et la perméabilité de la membrane plasmique à la suite d'un changement au niveau des phospholipides (Bettaieb *et al.*, 2013). La modification dans la membrane cellulaire influence les pompes à ion de sodium-potassium. Les modifications dans les pompes ioniques affectent négativement la production de l'ATP (Adénosine triphosphate). En plus de la structure cellulaire, l'hyperthermie altère la distribution sanguine. Le changement de la vascularisation dépend de l'intensité du stress thermique. L'hyperthermie modérée génère la vasodilatation qui favorise la diffusion de la chaleur dans la tumeur et permet d'augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux ou la radiation. Cependant, une hyperthermie dite sévère cause la vasoconstriction menant à la diminution de l'apport d'oxygène et stimulant la mort cellulaire (Bettaieb *et al.*, 2013; Bull, 2018).

Hormis des mécanismes menant à la mort cellulaire (dommage nucléaire), l'hyperthermie peut stimuler le système immunitaire. De manière similaire à la fièvre lors d'une infection, l'augmentation de température permet de stimuler l'activation de la réponse immunitaire. La hausse de température génère l'incitation à localiser les lymphocytes et à détruire les pathogènes (Mikucki *et al.*, 2013), lors d'infections ou en présence de cellules cancéreuses, au site de localisation. De plus, la hausse de température accroît la vitesse de développement des CD8 (cluster de différenciation 8) immatures en CD8 compétents (Bettaieb *et al.*, 2013; Bull, 2018).

L'ensemble des changements dans les différents processus à différents niveaux : physiologique, cellulaire ou moléculaire permettent de favoriser la mort cellulaire ou d'accroître l'efficacité

d'autres traitements tels que la radiothérapie. Le fait d'avoir une meilleure compréhension de l'implication de l'hyperthermie sur la cellule permettra d'augmenter l'utilisation de cette technique comme traitement complémentaire à la chirurgie, la radiothérapie ou l'immunothérapie contre le cancer.

1.2 La thermotolérance

La thermotolérance se définit comme l'acquisition de la résistance à des températures élevées. Cette résistance est acquise comme mécanisme de survie cellulaire à la suite d'un choc thermique modéré ou sévère qui est dépendant de la durée d'exposition. Il est possible d'engendrer la thermotolérance avec deux types d'hyperthermie. La thermotolérance s'acquiert en condition modérée par l'exposition de cellules à des températures situées entre 39 et 41,5 °C durant une période prolongée, soit entre 3 et 24 heures. Cependant, pour la condition sévère, les cellules doivent être exposées durant une période allant d'une dizaine à une trentaine de minutes à des températures plus élevées, soit entre 43 et 45 °C (Bettaieb *et al.*, 2013).

1.2.1 Implications biochimiques

Une méthode de protection lors d'hyperthermie non toxique implique la protéine « Nuclear Factor erythroid 2-related factor 2 » (Nrf2). La protéine Nrf2 est un facteur de transcription ; elle va réguler l'expression des protéines antioxydantes. Plus précisément, cette protéine est surexprimée à 40 °C à la suite de l'augmentation des pro-oxydants ou signaux émis par p53 (Glory et Averill-Bates, 2016). Par la suite, Nrf2 va transloquer dans le noyau où elle lie les régions promotrices des gènes d'élément de réponse antioxydante pour favoriser l'expression de protéines antioxydantes et détoxification (Glory et Averill-Bates, 2016). La production d'antioxydant aide à réduire l'impact toxique du stress oxydatif et les électrophiles (molécules ayant une charge électrique) présents dans les cellules.

Outre la protéine Nrf2, une voie parallèle aide à la thermotolérance. L'acquisition d'une résistance au choc thermique est grandement due aux protéines de la famille « Heat Shock Protein » (HSP) (Ahmed *et al.*, 2020). Ces protéines sont impliquées dans une variété de réactions au stress chez la cellule. Ainsi, elles peuvent être stimulées par un stress oxydatif, les métaux lourds, l'éthanol et les toxines, ce qui fait d'elles des protéines de réponse au stress. L'expression des protéines HSP est

régulée par le facteur de transcription « Heat shock factor 1 » (HSF1). Lors d'un stress, cette dernière forme un complexe trimère dans le noyau pour réguler le gène *HSP* (Bettaieb *et al.*, 2013).

À la suite d'un choc thermique modéré (39 et 41,5 °C), on observe l'augmentation de l'expression des protéines HSP27, 32, 60, 70, 90 et 110. Cette augmentation pourrait s'expliquer par le rôle de chacun dans la résistance au choc (Ahmed *et al.*, 2020; Bettaieb *et al.*, 2013).

Globalement, les protéines HSP27, 70 et 90 vont jouer un rôle dans la diminution de l'apoptose mitochondriale, interférer dans la formation de l'apoptosome et dans l'activation des caspases. Pour ce faire, les protéines HSP27 et HSP70 ont un impact sur l'inhibition du recrutement de la protéine t-Bid (« BH3 interacting-domain death agonist ») à la mitochondrie alors qu'HSP90 régule négativement la caspase 2. Certaines HSP aident en ce qui concerne le réticulum endoplasmique. Plus précisément, HSP70 et HSP110 préviennent la formation d'agrégats de protéines réduisant l'activation de la voie UPR. Les protéines HSP40, HSP70 et HSP110 permettent la restauration des protéines sous leurs formes natives lorsqu'elles sont agrégées (Bettaieb *et al.*, 2013).

Ensemble, les HSP permettent la survie cellulaire en réduisant la mort par les deux voies intrinsèques (le réticulum endoplasmique et la mitochondrie), en inhibant l'apoptose par les récepteurs de la mort, en inhibant la production de EROs et en conférant une protection contre la mort cellulaire.

1.3 Survie cellulaire à l'aide de l'activation de l'autophagie

L'autophagie est un mécanisme d'homéostasie de régulation des constituants désuets des cellules. En condition normale, le mécanisme d'autophagie est présent pour la dégradation des protéines ou d'organelles désuètes dans les cellules. Toutefois, lors d'une anomalie telle que la présence d'une toxine, d'un traitement toxique, d'un choc thermique, l'absence de nutriments et autres, ces anomalies peuvent activer l'autophagie pour que la cellule puisse survivre au stress (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2021).

Il existe trois types d'autophagie ; la macro-autophagie, la microautophagie et l'autophagie impliquant des chaperonnes (Parzych et Klionsky, 2014). Dans la microautophagie, une vacuole contenant les constituants à dégrader sera formée et menée au lysosome pour être invaginée par la

bicouche de phospholipide (Parzych et Klionsky, 2014). Pour ce faire, certaines protéines de la famille des « endosomal sorting complexes required for transport » (ESCRTs) vont permettre la fission de la membrane du lysosome pour fusionner avec la vacuole qui contiendra les constituants devant être dégradés (Parzych et Klionsky, 2014; Schuck, 2020).

L'autophagie impliquant des chaperonnes est un type d'autophagie ciblant les protéines contenant la séquence protéique KFERQ. Pour ce faire, des protéines chaperonnes, dont HSP70, reconnaissent la séquence pour permettre de diriger la protéine d'intérêt vers un lysosome et ainsi assurer la dégradation (Parzych et Klionsky, 2014).

1.3.1 Macro-autophagie

Dans le cadre de cette recherche, l'usage du mot autophagie réfèrera à l'autophagie de type macro-autophagie. Pour la macro-autophagie, il y a plus de connaissances sur les mécanismes impliqués. La macro-autophagie se déroule en cinq grandes étapes pour la dégradation des constituants : l'initiation, la nucléation, l'élongation, la maturation et la fusion. Contrairement à la microautophagie, dans la macro-autophagie, la formation des vacuoles ne provient pas des membranes ; celles-ci sont plutôt formées dans le cytoplasme.

1.3.1.1 L'initiation

La macro-autophagie débute par la formation de la bicouche de phospholipides à l'aide du complexe d'initiation. Dans ce complexe, on trouve les protéines « Unc-51 like autophagy activating kinase » (ULK1) et « Autophagy-related protein 13 » (ATG13) (Figure 1.1) (Parzych et Klionsky, 2014; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). En condition normale, les protéines ATG13 et ULK1/2 sont hyperphosphorylées par la protéine « mammalian target of rapamycin » (mTORC1) pour inhiber leur activité enzymatique ; ainsi, cette inhibition empêche l'activation du complexe d'initiation (Parzych et Klionsky, 2014; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). En revanche, en cas de manque de nutriments, l'« adenosine monophosphate-activated protein kinase » (AMPK) va phosphoryler la protéine « Tuberous sclerosis complex » (TSC1/2) pour permettre la régulation négative de mTORC1, ce qui permettra la libération du complexe ULK1 (Lin et Hurley, 2016; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). La protéine ULK1 joue un rôle dans la phosphorylation d'ATG13 et de « Focal adhesion kinase family interacting protein of 200

kD » (FIP200). La protéine ULK1 sera activée par AMPK. À son tour, ULK1 ira activer les autres protéines du complexe d'initiation, ATG13 et FIP200, en phosphorylant ATG13 et FIP200 (Lin et Hurley, 2016; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Cela permet d'avoir la forme active du complexe d'initiation (Lin et Hurley, 2016).

1.3.1.2 La nucléation

Une protéine régulatrice de la nucléation est la protéine Bécline-1 (BCN1). La protéine BCN1 est, lors de condition normale, liée par son domaine « Bcl-2 Homology domain » BH3 à la protéine « B-cell lymphoma 2 » (BCL2). Cette interaction permet d'inhiber l'activité autophagique de BCN1. Lors d'un manque de nutriment, l'interaction est dissociée et la protéine BCN1 va activer la protéine « vacuolar protein sorting 34 » (VPS34), sous-unité catalytique appartenant au complexe de la phosphoinositide 3-kinase de classe 3 (PI3K III) (Eskelinen, 2008; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). L'activation de VPS34 permet le recrutement de la sous-unité VPS15 de la PI3K III. Par la suite, la PI3K III va rameuter la protéine (Autophagy-related protein 9) ATG9. Cette dernière joue un rôle dans l'élongation de la bicouche phospholipide de l'autophagosome (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016) (Figure 1.1).

Hormis les protéines de base (BCN1, VPS34, VPS15 et ATG9), il existe deux formes du complexe PI3K III. Les complexes 1 et 2 vont influencer sur la nucléation et la fusion. Plus précisément, le complexe 1 est composé de BCN1, VPS34, VPS15, ATG9 et l'ajout de la protéine ATG14 et « Nuclear receptor-binding factor 2 » (NRBF2) (Fairlie *et al.*, 2020). Ce complexe a pour effet d'augmenter l'affinité des protéines du complexe lors de la nucléation. Le complexe 2 est formé de BCN1, VPS34, VPS15, ATG9 et de l'ajout de la protéine « UV resistance-associated gene » (UVRAG) et « B1/Bax-interacting factor 1 » BIF1 (Fairlie *et al.*, 2020). Ce complexe aide à la nucléation et à la maturation.

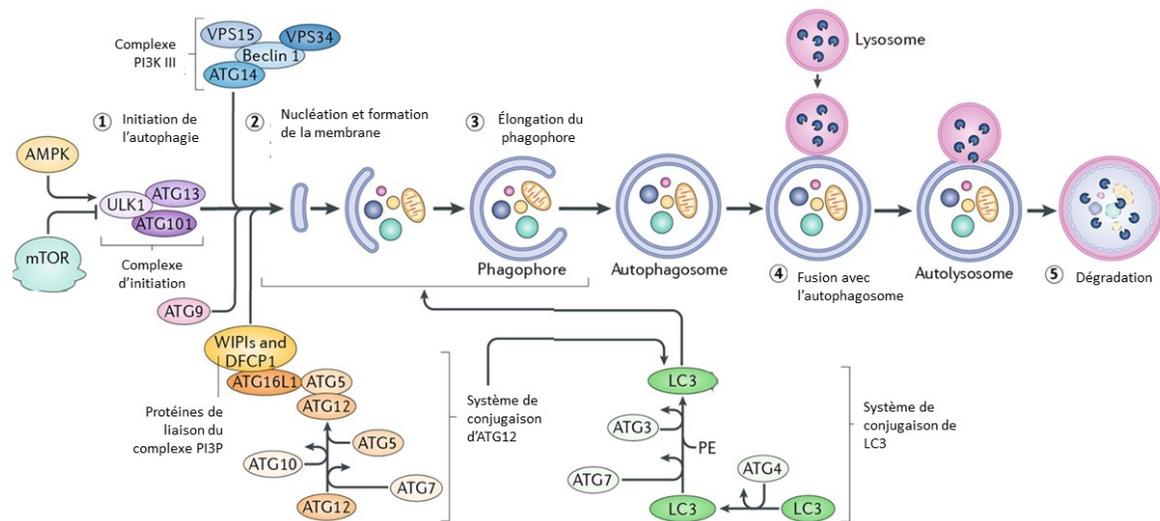


Figure 1.1 Aperçue des étapes de la macro-autophagie.

Le processus d'autophagie est divisé en cinq grandes étapes : l'initiation (1), la nucléation (2), l'élongation (3), la fusion (4) et la dégradation (5). L'autophagie débute par la formation du complexe d'initiation. La protéine AMPK phosphoryle TSC1/2 qui a son tour ira inhiber mTOR et permettre la libération des protéines ULK1 et ATG13 qui iront recruter ATG101. Par la suite, la protéine BCN1 va recruter les protéines du complexe de nucléation : VPS34, VPS15, ATG9 et ATG14. Durant cette seconde étape, le complexe de nucléation permet l'initiation de la bicouche de phospholipides. Durant la troisième étape, nous allons avoir l'élongation du phagophore pour devenir un autophagosome. L'élongation a lieu à l'aide de deux complexes : ATG12-ATG5-ATG16L et ATG8-LC3-PE. Ces deux complexes avanceront au fur et à mesure de la formation du phagophore et seront libérés lors de la maturation de l'autophagosome. Par la suite, en quatrième étape, l'autophagosome va fusionner avec un lysosome pour devenir un autolysosome. Finalement, en dernière étape, nous avons la dégradation des constituants présents dans l'autolysosome. Tirée de (Hansen *et al.*, 2018). Reproduite et adaptée avec la permission du « Nature Reviews Molecular Cell Biology ».

1.3.1.3 L'élongation

Pour l'élongation du phagophore, les cellules ont besoin de deux complexes (ubiquitinase-like). Le premier est le complexe ATG12-ATG5-ATG16L (Bettaieb et Averill-Bates, 2015; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2021). La formation de ce complexe dépend de la protéine ATG12 qui, préalablement, doit être activée par l'interaction avec les protéines ATG7 et ATG10. Par la suite, la forme active d'ATG12 vient lier l'ATG5 et le dimère liera deux protéines d'ATG16L1 pour former un tétramère (Eskelinen, 2008; Parzych et Klionsky, 2014; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Le second complexe est formé des protéines ATG8-LC3-PE (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2021). Pour ce faire, la protéine « Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A » (LC3) va se faire cliver en son C-terminal par la protéine ATG4 générant la forme LC3-I. Le clivage de LC3 en LC3-I permet l'exposition du site de liaison pour le lipide

phosphatidylethanolamine (PE). La liaison de LC3-I et PE est faite par les protéines ATG7 et ATG3 générant la formation de LC3-II (Eskelinen, 2008; Parzych et Klionsky, 2014; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Ce complexe avance au travers de la formation de la membrane jusqu'à la fin de l'élongation. Une fois l'élongation terminée, les deux complexes sont dissociés pour être réutilisés dans la cellule (Figure 1.1).

1.3.1.4 La maturation et fusion

La signalisation impliquée dans la fusion de l'autophagosome au lysosome n'est pas encore tout à fait élucidée concernant l'ordre d'apparition des différentes protéines. Cependant, selon les connaissances actuelles, quelques théories ont été élaborées. Au total, on trouve environ une quinzaine de protéines ou complexes impliqués dans la fusion.

À la suite de la formation de l'autophagosome, ce dernier doit se relocaliser vers les lysosomes. Pour ce faire, la protéine « Ras-related protein Rab-7a » (Rab7) se lie à l'autophagosome et parallèlement, elle lie une autre protéine pour avancer sur les microtubules. La protéine Rab7 va lier soit « Rab-interacting lysosomal protein » (RILP) pour avancer en direction (minus end) ou « FYVE zinc finger domain » (FYVE) et « Coiled-Coil Domain Autophagy Adaptor 1 » (FYCO1) pour naviguer vers l'extrémité (plus end) (Nakamura et Yoshimori, 2017; Zhao *et al.*, 2021). Une fois arrivé à destination, l'autophagosome doit fusionner sa bicouche de phospholipides avec la monocouche de phospholipides du lysosome.

Une fois que l'autophagosome est arrivé à proximité du lysosome, il doit y avoir une fusion. À la surface de l'autophagosome, les protéines syntaxin17 (STX17), « Synaptosomal-associated protein 29 » (SNAP29) et LC3-II jouent un rôle dans la fusion tandis qu'à la surface du lysosome, ce sont les protéines « Vesicle-associated membrane protein 8 » (VAMP8), VAMP7 et Rab7 qui sont impliquées dans la fusion (Zhao *et al.*, 2021). Syntaxin17 va former un complexe avec VAMP8. Cette liaison semble constituer le cœur de la provocation de la fusion. Parallèlement, Syntaxin17 lie SNAP29. Le complexe cœur sera stabilisé par plusieurs protéines aux alentours. ATG14L permettra une stabilisation en liant la syntaxin17 et SNAP29. En outre, du côté de l'autophagosome, la protéine LC3-II interagit avec la protéine Syntaxin17 (Nakamura et Yoshimori, 2017).

Du côté du lysosome, la protéine Rab7 permet le recrutement de deux autres protéines, soit « Ectopic P-granules 5 autophagy » (EPG5) et le complexe « Homotypic fusion and protein sorting » (HOPS) (Jiang *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2021). La protéine EPG5 effectue une interaction avec Rab7 et VAMP7 au niveau du lysosome, mais fera aussi une interaction avec LC3 pour stabiliser le complexe Syntaxin17-SNAP29 et VAMP8 (Nakamura et Yoshimori, 2017). Le complexe HOPS est impliqué dans la fusion des endosomes ou lysosomes. Dans le complexe HOPS, on trouve les sous-unités VPS11, VPS16, VPS18, VPS33, VPS39 et VPS41 (Jiang et al, 2014). Les deux dernières sous-unités ne sont pas centrales dans le complexe. La protéine Rab7 va interagir avec « Pleckstrin homology domain-containing family M member 1 » (PLEKHM1) et RILP qui, à leur tour, interagissent avec les sous-unités VPS39 et VPS41 de HOPS. Enfin, HOPS se lie avec syntaxin17 pour stabiliser le complexe (Nakamura et Yoshimori, 2017). L'ensemble de ces protéines permettent la fusion des lysosomes avec l'autophagosome pour la dégradation des constituants (Figure 1.2).

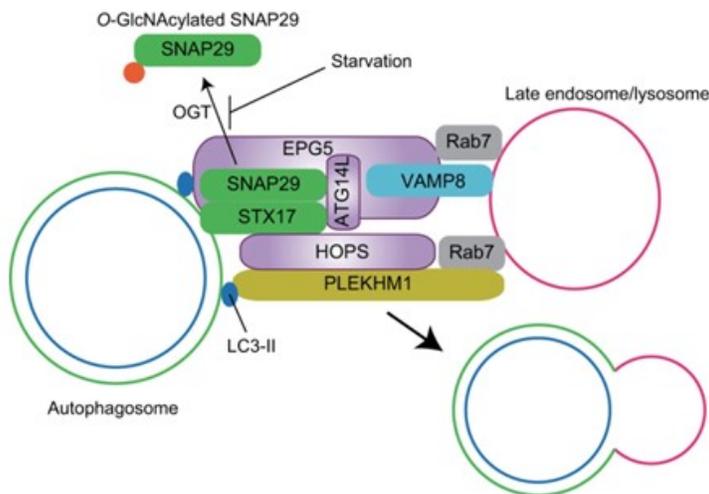


Figure 1.2 Les protéines impliquées dans la fusion de l'autophagosome au lysosome.

Le cœur de l'interaction provient des protéines syntaxin17, SNAP29 et VAMP8. L'ensemble des autres protéines sont présentes pour stabiliser l'interaction et permettre la fusion de l'autophagosome au lysosome. Tirée de (Nakamura et Yoshimori, 2017). Reproduite et adaptée avec la permission du « Journal of Cell science ».

1.4 La mort cellulaire par apoptose

Il existe, dans les cellules, plusieurs mécanismes de mort cellulaire. L'activation de ces derniers dépend de l'intensité et de la durée du stress (Bettaieb *et al.*, 2013). Concernant l'hyperthermie, elle cause l'activation de l'apoptose ou de la nécrose cellulaire en fonction de la durée et de l'intensité.

La nécrose est considérée comme étant une mort cellulaire non régulée. Lors de la nécrose, la perturbation est tellement sévère qu'elle cause l'activation de mécanisme causant la rupture de la cellule. Cette rupture mène ensuite au relâchement du contenu cellulaire dans le liquide interstitiel, causant alors l'inflammation dans l'espace environnant (Khalid et Azimpouran, 2022).

À l'opposé, l'apoptose est un mécanisme régulé et organisé de mort cellulaire. Lorsqu'une cellule se retrouve en condition de mortalité, l'apoptose peut être activée pour permettre la dégradation ordonnée de la cellule. L'apoptose est activée dans l'objectif de permettre la dégradation des cellules sans provoquer de dommage aux cellules avoisinantes. Pour ce faire, différentes protéines dites pro-apoptotiques — telles que les « Cysteine-dependent, aspartate-specific peptidases » (caspases) — vont effectuer le clivage de protéines cibles pour inhiber les mécanismes de survie cellulaire (Choi, 2018; Elmore, 2007). Parallèlement, le noyau se fera détériorer, ce qui mènera à son effondrement. Lorsque la dégradation atteint un seuil, on amorce la formation des corps apoptotiques qui seront phagocytés par les macrophages.

Les caspases sont regroupées en trois catégories selon leurs fonctions respectives. La première catégorie englobe les caspases inflammatoires, soit 1, 4 et 5 (Choi, 2018). Dans la seconde catégorie, on trouve les caspases apoptotiques, soit 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10. Quant à la dernière catégorie, elle contient la caspase 14 qui joue un rôle dans la différenciation de l'épithélium. Les caspases apoptotiques peuvent être sous-divisées en deux sous-catégories : les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10), soit celles activées au début de l'apoptose et les caspases effectives (3, 6 et 7), soit celles jouant un rôle dans la phase exécutive de l'apoptose (Choi, 2018; Elmore, 2007; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016).

L'apoptose peut se faire activer par trois voies de signalisation qui se rejoignent pour l'effondrement et la dégradation cellulaire. Les trois voies se différencient par le mécanisme de l'activation de la mort et l'implication de différentes protéines.

1.4.1 Voie extrinsèque de l'apoptose

L'activation de la voie extrinsèque débute par la liaison d'un ligand (TNF signifie « Tumor necrosis factor », Fas-L pour ligand de Fas ou TRAIL signifie « tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand ») à un récepteur spécifique. Les voies d'activation les mieux connues sont celles de Fas-L et TNF-alpha. Le ligand va lier son récepteur de la mort ; ensuite, on observe la formation du complexe « Death-inducing signaling complex » (DISC), contenant le domaine de la mort du ligand-récepteur, la procaspase 8, la procaspase 10 et « cellular FLICE-like inhibitory protein » (cFLICE) (Figure 1.3). En condition normale, la protéine cFLICE inhibe l'activation des caspases en inhibant la liaison des caspases sur « FAS-associated death domain protein » (FADD). Lors de l'activation de l'apoptose, la protéine FADD joue le rôle d'adaptatrice entre le récepteur et les caspases. L'ensemble de ces protéines vont permettre l'activation de la caspase 8 et de la caspase 10 en aidant à faire leur dimérisation et leur autoclivage. Par la suite, cela nous mène à la phase exécutive de l'apoptose (Choi, 2018; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016).

1.4.2 Apoptose via la mitochondrie

La mitochondrie est une organelle dans la cellule ayant comme objectif principal de produire de l'énergie, en plus de réguler le flux de calcium et la production de cofacteurs (ex. : Nicotinamide adénine dinucléotide [NADH]). Selon la théorie de l'endosymbiote, cet organite aurait été incorporé dans les cellules eucaryotes par endocytose, il y a quelques milliards d'années. Cela explique pourquoi elle contient un ADN différent de celui cellulaire, se divise sans l'intervention cellulaire et est composée de deux membranes (Gabaldon, 2021). La présence des deux membranes joue un rôle important dans le transport de constituants et dans la production d'ATP.

L'activation de l'apoptose par le biais de la mitochondrie est considérée, dans les cellules de mammifère, comme étant l'une des activations intrinsèques. À la suite d'une perturbation telle qu'un choc thermique, toxine et autre, certaines protéines se verront activées pour stimuler la mort cellulaire. La régulation de l'apoptose par l'entremise de la mitochondrie a lieu à l'aide des

protéines de la famille « B-cell lymphoma 2 » (BCL2). Les protéines de la famille BCL2 sont divisées en deux groupes : celles favorisant la survie cellulaire telles que « B-cell lymphoma-extra large » (BCL-xL), « B-cell lymphoma-w » (BCL-W) ou « Myeloid cell leukaemia sequence 1 » (MCL-1) ou celles favorisant la mort cellulaire. Les protéines anti-apoptotiques favorisent la survie cellulaire en inhibant les protéines pro-apoptotiques de la famille alors que les protéines pro-apoptotiques telles que « BCL-2-associated X protein » (BAX) et « BCL-2 homologous antagonist/killer » (BAK) favorisent l'apoptose en inhibant les protéines anti-apoptotiques (Czabotar *et al.*, 2014; Wang et Youle, 2009). En conditions normales, les protéines pro-apoptotiques sont inhibées par les protéines anti-apoptotiques. Cependant, lors d'une perturbation, cet équilibre est inversé, causant alors le relâchement des protéines pro-apoptotiques. Subséquemment, certaines de ces protéines telles que BAX et BAK vont permettre la libération des protéines apoptotiques présentes dans l'espace interstitiel mitochondrial par la formation de canaux dans la membrane externe mitochondriale (Czabotar *et al.*, 2014).

La mitochondrie permet la mort cellulaire par la libération de cinq protéines, soit cytochrome C, « Second mitochondria-derived activator of caspases » (SMAC), « Serine protease HTRA2 » (HtrA2), « Apoptosis-inducing factor » (AIF) et endonucléase G, de la mitochondrie (Figure 1.3). Les trois premières protéines vont favoriser l'apoptose en activant des caspases alors que l'endonucléase G et AIF vont cibler la dégradation de l'ADN. La protéine cytochrome C (Cyt C) est produite dans le cytosol sous forme inactive. Par la suite, Cyt C sera amenée dans la mitochondrie par le complexe TOM « Translocon of the outer membrane » (Chalah et Khosravi-Far, 2008). À la suite de l'activation de l'apoptose, la protéine cytochrome C est relâchée dans le cytosol. Elle viendra lier la protéine « Apoptotic peptidase activating factor 1 » (Apaf-1) et activera cette dernière avec un changement conformationnel (Chalah et Khosravi-Far, 2008; Garrido *et al.*, 2006; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016; Wang et Youle, 2009). À la suite de ce procédé, l'oligomère va former une structure heptamétrique de sept oligomères appelée apoptosome. L'apoptosome permet le recrutement de la procaspase 9 et son activation, et ce, à l'aide du domaine « caspase activation and recruitment domains » (CARD) (Chalah et Khosravi-Far, 2008). Parallèlement, la protéine « Second mitochondria-derived activator of caspases » (SMAC) est activée par clivage dans l'espace interstitiel mitochondrial et est relâchée dans le cytosol (Chalah et Khosravi-Far, 2008). Elle va interagir avec les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) (XIAP,

l'altération de l'ADN. Enfin, dans la voie du réticulum endoplasmique (RE) à la suite de l'accumulation de protéines mal repliées, d'autres protéines se verront activées. Les caspases 4 ou 12 sont activées à la surface du RE et par la suite, elles activent la caspase 9. La voie du réticulum endoplasmique active d'ailleurs la voie PERK-eIF2a-ATF4 qui finit par activer CHOP. Cette dernière favorise l'expression de protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2, ce qui permet l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la même famille. La protéine IRE-1a est activé par la voie du RE et elle lie Traf-2 ; ensemble, elles activeront ASK1. ASK1 phosphorylise JNK, ce qui permet d'inhiber les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2.

1.4.3 Apoptose via la voie du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le lieu de multiples fonctions normales. Il permet la production des lipides, régulation de l'influx de (calcium) Ca^{2+} , synthèse, repliement, transport et modification post-traductionnelle des protéines. Lors d'un stress, le RE active la voie de réponse protéique ou « Unfolded Protein Response » (UPR) pour tenter de survivre à ce stress (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). La voie de réponse protéique va tenter de maintenir la survie cellulaire en utilisant trois différentes voies de signalisation protéique : PERK-eIF2a, ATF6 et IRE1a-XBP-1. Cependant, en fonction de l'intensité et la durée du stress, l'UPR peut activer la mort cellulaire. À l'aide de plusieurs voies de signalisation, le RE favorisera l'apoptose.

L'activation de la mort cellulaire peut débuter avec la protéine « Eukaryotic translation initiation factor 2A » (IRE-1alpha) ; celle-ci joue un rôle important dans la l'activation de l'apoptose par le biais du RE (Figure 1.3). À propos de la survie cellulaire, IRE-1a est capable de convertir la protéine de liaison à la X-box 1 (XBP-1) en XBP1s. Cette dernière transloquera au noyau où elle activera les gènes favorisant la réparation des dommages et le repliement des protéines. De plus, la protéine PERK via IRE-1a et ATF4 influence la production de l'ARNm en favorisant un délai pour aider la diminution de la production de protéine lors d'un stress. En revanche, lors de la mort cellulaire, IRE-1a se lie avec la protéine « TNF receptor-associated factor 1 » (Traf-2) pour permettre l'activation de « Apoptosis signal-regulating kinase 1 » (ASK1) qui, à son tour, va phosphoryler les MAPK « Mitogen-activated protein kinase », soit « c-Jun N-terminal kinase » (JNK) et p38. La protéine JNK, une fois activée, permet l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2 (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016).

Une autre voie d'activation de mort par le RE est la voie PERK-eIF2a-ATF4 (« Protein Kinase RNA-Like ER Kinase » (PERK), « Eukaryotic translation initiation factor 2A » (eIF2a) et « Activating transcription factor 4 » (ATF4)) qui, ultimement, activeront la protéine « C/EBP

homologous protein » (CHOP). Une fois activée, CHOP favorisera par la suite l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2, ce qui permettra d'inhiber la protéine BCL-2 (Bettaieb et Averill-Bates, 2015).

Un autre chemin d'activation de la mort par le RE se fait par les caspases. Dans les cellules murines, la caspase 12, lors d'un stress, peut se relocaliser au RE. À la suite de la translocation, elle sera activée par la caspase 7 ou calpaine. L'activation de la caspase 12 favorise l'apoptose puisqu'à son tour, elle effectue l'activation de la caspase 9 (Figure 1.3). Petite particularité : ces résultats proviennent des murins alors que chez les humains, la caspase 12 est inactive en raison des mutations présentes dans le gène et elle serait remplacée par la caspase 4 (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016).

Une dernière voie d'activation de mort par le RE est celle de Bap31. La protéine « B-cell receptor-associated protein 31 » (Bap31) est une protéine du RE ayant plusieurs rôles dans la cellule. Elle est impliquée dans la voie de signalisation « Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation » (ERAD) et dans le repliement des protéines. En revanche, lors d'un stress du RE, cette dernière est clivée en p20Bap31. Cette nouvelle structure est capable de favoriser la mort par le RE et la mitochondrie. Pour ce faire, elle permet la libération du Ca^{2+} du RE ; ce dernier sera absorbé, en partie, par la mitochondrie. À un certain seuil, le niveau de Ca^{2+} activera les pores mitochondriaux. Cela favorisera la libération de molécules de la membrane externe et déclenchera l'apoptose (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016).

1.4.4 La phase exécutive de l'apoptose

La phase exécutive de l'apoptose est la dernière étape du processus après l'activation extrinsèque et l'activation des voies intrinsèques. Au préalable, les caspases initiatrices auront été activées par le domaine de la mort (voie extrinsèque), par l'apoptosome ou une voie du RE (voies intrinsèques). Par la suite, ces caspases (8, 9 et 10) permettront l'activation des caspases effectrices (3 et 7) (Choi, 2018; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Les caspases effectrices sont les caspases permettant l'effondrement cellulaire par le clivage de substrats protéiques.

L'implication de la caspase 3 est importante dans la dégradation cellulaire. Elle permet l'activation de la caspase 6. De plus, elle effectue le clivage de la protéine iCAD en ADNase activé par les

caspases (CAD) dans sa sous-unité DFFA « DNA fragmentation factor subunit alpha » (Chalah et Khosravi-Far, 2008). La protéine CAD est une protéine hétérodimérique contenant deux sous-unités « DNA fragmentation factor beta » (DFFB) et DFFA. Une fois sous sa forme active, la protéine peut aider à la dégradation dans le noyau par l'incitation à la fragmentation et à la condensation de l'ADN.

1.5 Interrelation entre la survie et la mort cellulaire

L'autophagie et l'apoptose sont interreliées. Effectivement, l'autophagie est un processus généralement utilisé pour la survie cellulaire. L'apoptose, quant à elle, génère la mort cellulaire. Ainsi, le fait qu'il existe des mécanismes contradictoires entre elles engendre le chevauchement de chacun. En observant attentivement, on remarque que l'interrelation entre ces deux processus se révèle importante pour leurs activations respectives. Il existe plusieurs façons de catégoriser les différentes méthodes ou relations présentes entre les deux voies. Dans ce cas de figure, l'interrelation sera séparée en deux catégories. La première concerne les différentes méthodes d'inhibitions (ex. : autophagie) mises en place pour inhiber l'autre processus (ex. : apoptose). La seconde catégorie, quant à elle, observe comment certaines protéines peuvent transitionner d'une voie à l'autre en fonction de l'environnement.

1.5.1 L'inter inhibition entre l'apoptose et l'autophagie

Autant dans l'autophagie que dans l'apoptose, certaines protéines jouent un rôle d'activation d'un de ces mécanismes ; parallèlement, elles peuvent causer l'inhibition de l'autre. Dans l'autophagie, on retrouve d'ailleurs la protéine UVRAG. Cette dernière favorise directement l'autophagie en recrutant le complexe PI3K lors de l'initiation de l'autophagie. De plus, elle favorise l'autophagie en interagissant avec BCN1 dans le domaine « Coiled-coiled domain » (CCD), ce qui diminue la capacité d'interaction de Bécline-1 avec BCL2. UVRAG favorise indirectement l'autophagie et inhibe l'apoptose par son interaction avec le N-terminal du domaine C2 de BAX. Enfin, elle inhibe l'apoptose en interagissant avec la protéine BIF1 : il s'agit de la protéine impliquée dans l'activation de BAX et BAK à la suite d'un changement conformationnel (Su *et al.*, 2013).

Du côté de l'apoptose, une famille de protéines importante dans cette inter inhibition est la famille des protéines caspases. Elles permettent l'inhibition de l'autophagie en venant cliver certaines

protéines cibles liées à l'autophagie. C'est ainsi que la protéine BCN1 est théoriquement clivée par les caspases 3, 6, et 9 ; ATG5 se fait potentiellement cliver par calpaine (Marino *et al.*, 2014), et les caspases 3, 6, 8, 9, 10 (Tsapras et Nezis, 2017), alors que la protéine ATG4D est clivée par la caspase 3 (Marino *et al.*, 2014). Outre les caspases, on trouve la protéine p53. Elle permet l'activation de l'apoptose sur de nombreuses facettes ; la création de pores dans la mitochondrie ou l'activation de protéines pro-apoptotiques. Elle joue aussi un rôle inhibiteur sur l'autophagie. Pour ce faire, elle diminue l'affinité d'interaction de FIP200 et ULK1 en liant FIP200 (Marino *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2013).

Une famille de protéines importantes dans l'interrelation est la famille des protéines BCL-2. Les protéines de la famille BCL-2 jouent un rôle majeur dans l'activation et la répression de l'apoptose. Il est possible de séparer la famille en deux groupes selon leurs rôles. Le premier groupe contient les protéines jouant un rôle anti-apoptotique ; ces protéines ont toutes des similitudes dans les domaines d'homologie de BCL-2 (BH1, BH2, BH3 et BH4) (Czabotar *et al.*, 2014; Marino *et al.*, 2014; Mukhopadhyay *et al.*, 2014). Dans ce groupe, on trouve les protéines BCL-2, BCL-xL, BCL-W, « BCL-2-like-10 » (BCL-B), BCL-2 A1 (A1) et MCL-1. Le second groupe contient les protéines favorisant l'apoptose dite pro-apoptotique. Une seconde séparation est faite en fonction des ressemblances entre les différents domaines ; ils sont séparés en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe comprend les protéines BAX, BAK et « BCL2-related ovarian killer » (BOK). Elles ont toutes des similitudes dans les domaines BH1, BH2 et BH3 (Czabotar *et al.*, 2014; Mukhopadhyay *et al.*, 2014). Dans le second sous-groupe sont présentes les protéines dites BH3 seulement puisque c'est leur seul domaine de similitude. On y observe les protéines « BCL2 associated agonist of cell death » (BAD), «BCL-2-modifying factor » (Bmf), « BCL-2-binding component-3 » (Puma), « Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein1 » (Noxa), « BCL2 Interacting Killer » (Bik), Bid et « BCL-2-like-11 » (BIM) (Czabotar *et al.*, 2014; Mukhopadhyay *et al.*, 2014).

En condition normale, les protéines anti-apoptotiques peuvent lier, de manière hétérodimérique, les protéines pro-apoptotiques pour inhiber l'activité apoptotique. Pour ce faire, certaines protéines telles que BCL-xL et BCL-2, à l'aide de leurs domaines BH3, sont capables de neutraliser les domaines BH1, BH2, BH3 et d'autres protéines pro-apoptotiques (Marino *et al.*, 2014). En revanche, lors d'une perturbation, les protéines pro-apoptotiques peuvent former des homodimères

ou hétérodimères pour s'activer. Pour ce faire, certaines protéines pro-apoptotiques (ex : BAD, Puma, Noxa, t-Bid) vont lier des protéines anti-apoptotiques tels que BCL-2 et BCL-xL; ce lien permettra de libérer les protéines pro-apoptotiques tels que BAX et BAK pour assurer l'activation de l'apoptose par la voie des mitochondries.

1.5.2 La bivalence de complexe ou protéines

Il existe des protéines ou des complexes protéiques ayant un rôle dans l'activation de l'autophagie. En revanche, à la suite d'un changement majeur dans l'environnement, leurs affiliations seront davantage tournées vers l'apoptose. La protéine BIM est un exemple de protéine capable de transitionner d'une voie de signalisation à une autre. Il existe trois formes de BIM ; « BIM-short » (BIM_S), « BIM extra long » (BIM_{EL}) et « BIM-long » (BIM_L). Les deux premières variantes favorisent l'apoptose en inhibant les protéines Bcl-2 et BCL-2 causant respectivement l'inhibition de l'autophagie et la dissociation du complexe protéique contenant BAX ou BAK (Su *et al.*, 2013). La version BIM_L favorise l'autophagie en ayant une interaction avec la dynéine causant la facilitation du positionnement de l'autophagosome et fusion aux lysosomes (Elmore, 2007). Cette interaction est possible uniquement en l'absence de stimuli apoptotiques. Cependant, en présence de stimuli apoptotiques (manque de nutriments) ; l'interaction protéique est dissociée (Elmore, 2007).

Les études sont à leurs débuts ; cependant, la protéine ATG12, malgré son implication dans l'élongation du phagophore, pourrait privilégier l'apoptose en inhibant une protéine anti-apoptotique de la famille de BCL2, soit l'homologue de BCL-2 MCL-1. En effet, une étude de 2011 a démontré que la protéine ATG12 co-immunoprécipite avec MCL-1 (Rubinstein *et al.*, 2011).

1.5.2.1 Sérine/thréonine kinase

Au sein du groupe des sérines/thréonines kinases, on trouve des protéines capables de favoriser l'une des deux ou les deux voies d'intérêt (autophagie et apoptose) en fonction du lieu de la phosphorylation. La Protéine kinase associée à la mort (DAPK) privilégiera l'une des voies (apoptose) alors que JNK et Protéine kinase B (AKT) activeront les deux en fonction de l'environnement. DAPK favorise l'autophagie en régulant la phosphorylation de BCN1 au niveau de son domaine BH3 ; cela permet de diminuer les chances d'interaction avec les protéines BCL-

2 et BCL-xL (Marino *et al.*, 2014). D'ailleurs, DAPK favorise l'autophagie en activant la protéine Protéine Kinase D (PKD) qui, à son tour, phosphorylera et activera la sous-unité VPS34. JNK, quant à elle, favorise l'autophagie en phosphorylant la protéine BIM, causant la dissociation du complexe BCN1-BIM-DLC1 (« Dynein light chain 1 ») (Marino *et al.*, 2014). La libération de Bécline-1 permet l'initiation du phagophore. De plus, Bécline-1 interagit dans les domaines BH4 et BH3 des protéines BCL2 ; cela génère l'activation de l'autophagie ou l'apoptose en fonction de l'interaction avec des protéines anti ou pro-apoptotiques. Finalement, la protéine kinase B (AKT) favorise l'autophagie en phosphorylant BAD pour inhiber l'activité apoptotique (Marino *et al.*, 2014). Cependant, elle permet de privilégier l'apoptose en phosphorylant Bécline-1 (inhibition de l'activité autophagique) ou en induisant la voie de mTOR causant la répression de ULK1 (Su *et al.*, 2013).

1.5.2.2 Autophagosome

Un autre point de contrôle entre l'autophagie et l'apoptose est l'autophagosome. Lors de l'accumulation des autophagosomes dans les conditions de stress sévère ou prolongé, ces derniers favorisent la mort cellulaire plutôt que l'autophagie (Su *et al.*, 2013). Cela est possible puisque ce dernier est capable de recruter le complexe DISC à la surface membranaire et de permettre l'activation de la caspase 8. À ce jour, il existe deux méthodes par lesquelles la caspase 8 serait recrutée à l'autophagosome (Fairlie *et al.*, 2020). La première a lieu à l'aide du complexe ATG5-ATG12-ATG16. En effet, ce complexe peut fusionner avec « FAS-associated death domain protein » (FADD), ce qui assure le recrutement de la caspase 8 et ainsi son activation. La seconde méthode se caractérise par l'interaction entre p62 et LC3. Pour ce faire, la caspase 8 sera au préalable ubiquitinylé, puis la protéine p62 sera alors capable d'activer la caspase 8. La méthode par laquelle la caspase 8 est ubiquitinée n'est pas connue. Toutefois, il existe une théorie selon laquelle l'ubiquitination de la caspase 8 est faite à la suite de l'interaction de LC3 avec la E3 ligase cullin3 (Fairlie *et al.*, 2020).

En résumé, certaines protéines telles qu'UVRAG, la famille BCL2 ou p53 peuvent jouer des rôles d'inhibiteurs envers l'une des voies (ex. : apoptose) tout en étant un activateur de son compétiteur (ex. : autophagie). En sus, certaines protéines ou complexes protéiques comme ATG12, BIM, des protéines de la famille des sérines/thréonines (DAPK, AKT, JNK) ou l'autophagosome changent

d'activation d'un processus vers l'autre en fonction de l'environnement. L'ensemble de ces protéines et d'autres protéines permettent de réguler la transition entre les deux voies de manière ordonnée.

1.6 Protéines d'intérêts

L'autophagie et l'apoptose sont deux processus s'interposant l'un contre l'autre. Lors de l'autophagie, les protéines inhibent celle de l'apoptose. Lors de l'activation de l'apoptose, certaines protéines se voient clivées dans le but d'inhiber l'autophagie ou d'activer leurs fonctions apoptotiques. Malgré l'opposition entre les deux processus, des protéines sont capables de jouer un rôle dans l'autophagie et l'apoptose en fonction de l'environnement. Pour aller plus loin, des protéines, telles que l'ATG5 et Bécline-1, pourraient se voir conférer un nouveau rôle, par exemple un rôle dans le déclenchement de l'apoptose, lorsque ces protéines sont clivées.

1.6.1 Bécline-1

La protéine Bécline-1, plus précisément son homologue chez la levure ATG6, a été découverte lors d'une étude pour déterminer les gènes pouvant réguler l'autophagie et le transport des vacuoles chez la levure. Par la suite, d'autres études ont été réalisées et ont permis d'établir que cette protéine était impliquée, en fonction du type cellulaire, dans le développement chez les larves « durer larvae », l'immunité, la santé neuronale, la santé cardiaque, le développement des ailes, du système sanguin et salivaire chez les drosophiles (Tran *et al.*, 2021). Bécline-1 est une protéine contenant un domaine BH3 qui lui permet de faire une liaison avec BCL-2 en condition native. Bécline-1 fait partie des protéines pouvant favoriser autant l'autophagie que l'apoptose. Sous sa forme native, la protéine favorise l'autophagie par son implication dans la formation du phagophore alors que, dans sa forme clivée, la protéine a d'autres rôles tels que l'implication au sein du noyau, la sensibilisation au stress oxydatif, la mort ou la survie cellulaire (Tran *et al.*, 2021).

1.6.1.1 Implication dans l'autophagie

Lors de l'autophagie, la protéine Bécline-1 joue un rôle crucial pour la formation et l'initiation du phagophore. Pour ce faire, la protéine sera impliquée dans la formation du complexe PI3Kinase avec les protéines VPS34 et VPS15 (Eskelinen, 2008). Par la suite, il y aura le recrutement d'autres protéines en fonction du complexe impliqué. Ainsi, les protéines ATG14 et NRBF2 sont recrutées

pour former le complexe PI3K C1 impliqué dans la nucléation. Les protéines UVRAG et BIF1 sont recrutées pour le complexe PI3K C2. Ce complexe est impliqué dans l'autophagie (Fairlie *et al.*, 2020), mais pourrait aussi être présent lors du transport d'endocytose et de la tubuline lysosomale.

1.6.1.2 Inhibition de la protéine Bécline-1

À l'aide de son domaine BH3, BCN1 est capable d'effectuer des interactions avec différentes protéines de la famille des BCL-2 ; particulièrement BCL-2 puis successivement, BCN1 peut lier BCL-xL, MCL-1 et BCL-B (Tran *et al.*, 2021). Ces différentes protéines créent une liaison causant l'inhibition d'interaction avec le complexe PI3K. L'interaction entre BCN1 et BCL2 est régulée par de nombreuses protéines de manière agoniste ou antagoniste pour la voie de l'autophagie. Outre la liaison avec BCL-2, la protéine BCN1 peut être inhibée par sa relocalisation. Lors de condition native, les protéines « Activating Molecule In BECN1-Regulated Autophagy » (AMBRA) ou BIM peuvent relocaliser BCN1 vers le cytosquelette pour former une liaison avec le complexe moteur de la dynéine causant l'inhibition de l'autophagie. Par contre, lors d'une perturbation, AMBRA se fera phosphoryler, engendrant le relâchement de BCN1 (Kang *et al.*, 2011).

Hors des interactions protéiques, la phosphorylation joue un rôle important dans l'activation ou la répression du processus d'autophagie. La phosphorylation en Thr119 de BCN1 par les protéines DAPK1/2 (Marino *et al.*, 2014) ou « Rho kinase 1 » (ROCK1) favorise l'autophagie en diminuant l'affinité au niveau d'interaction BCN1-BCL-2 (Tran *et al.*, 2021). Cependant, la phosphorylation en T108 par « Macrophage Stimulating 1 » (MST1) inhibe l'autophagie en favorisant l'interaction BCN1-BCL2 (Tran *et al.*, 2021). La phosphorylation de BCN1, en son C-terminal Y233 et Y352 par la protéine kinase BCR-ABL, diminue l'affinité sur le plan de l'interaction de BCN1 avec le complexe PI3K et UVRAG pour favoriser l'interaction avec Rubicon et ainsi diminue l'activation de l'autophagie (Tran *et al.*, 2021).

1.6.1.3 L'importance de la version clivée de Bécline-1 dans la cellule

Immanquablement, le clivage de Bécline-1 nuit au bon fonctionnement de l'autophagie. Par contre, le clivage apporte de nouvelles fonctionnalités à la protéine. Certaines études ont permis de mettre en place quelques prémisses concernant le clivage et le rôle de Bécline-1 clivée ; toutefois, le tout demeure nébuleux. Lors d'une perturbation cellulaire, les différentes protéines apoptotiques

peuvent effectuer le clivage de BCN1 en trois localisations différentes, soit D133, D146 et D149 (Su *et al.*, 2013). La localisation du clivage semble influencer sur l'action des résidus protéiques. En effet, Wirawan *et al.* (2010) ont démontré que Bécline-1 jouait un rôle dans l'activation de l'apoptose lors du retrait de l'interleukine-3 chez les cellules Ba/F3. Lors de ce traitement, la protéine se retrouvait clivée par des caspases en position D133 et D149 (Wirawan *et al.*, 2010). BCN1 serait clivée en deux fragments de 35 et 37 kDa. Ces fragments se retrouvent localisés aux mitochondries et permettraient le relâchement de cytochrome C et HtrA2.

Une recherche distincte montre que la caspase 3 effectue un clivage de Bécline-1 en position D149. À la suite de ce clivage, la version clivée en N-terminal transloque du cytosol vers le noyau. Toutefois, son rôle dans le noyau n'a pas été découvert hormis la diminution de formation du phagophore (Luo et Rubinsztein, 2010). Outre les caspases, calpaine serait en mesure de cliver BCN1 pour obtenir un fragment de 40 kDa. Ce fragment, au lieu de stimuler la mort cellulaire, sensibiliserait les cellules au stress oxydatif (Nguyen *et al.*, 2019). Néanmoins, une autre étude a démontrée que BCN1 n'influçait pas l'activation de l'autophagie ou l'apoptose, lorsque clivée. Dans leur recherche, des cellules HCT116 ont été utilisées ; les résultats ont montré que BCN1 était clivée en positions D133 et D146. Ainsi, à la suite d'un traitement des cellules HCT116 avec des agents chimiothérapeutiques, ils observaient une augmentation de la survie cellulaire (Elmore, 2007). La protéine BCN1 est nécessaire lors de l'autophagie, ce qui implique une régulation minutieuse par différents mécanismes : interaction, phosphorylation, ubiquitination et clivage. En revanche, les connaissances de l'impact du clivage sur les fonctionnalités cellulaires demeurent restreintes et une meilleure compréhension est requise pour déterminer l'étendue de cet impact.

1.6.2 ATG5

L'ATG5 est une protéine appartenant à la famille des « Autophagy related genes » (ATGs). Les ATGs ont été découverts chez la levure et, par la suite, chez les cellules eucaryotes. Les différentes protéines ATG sont séparées en fonction de leurs rôles dans la cellule (Matoba et Noda, 2021). Dans le premier groupe, on trouve le complexe ATG1 contenant les protéines ULK1/2 (homologue chez la levure ATG1), ATG13, FIP200 (homologue ATG17) et ATG101 alors que dans le second groupe, il n'y a que les protéines ATG9A et ATG9B. Le troisième groupe comprend le complexe PI3K auquel sont rattachées les protéines BCN1 (homologue ATG6), ATG14L et NRBF2

(homologue ATG38). Dans le quatrième groupe, soit le complexe ATG2-ATG18 contient ATG2A, ATG2B et WIPII-4 (homologue ATG18). Le cinquième groupe, nommé le système ATG12, comporte ATG5, ATG10, ATG12 et ATG16L. Enfin, le sixième groupe ou le système ATG8 est constitué de ATG3, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, LC3 (homologue ATG8), « g-aminobutyric acid (GABA) type A receptor associated protein » (GABARAP), GABARAP-L1 et GABARAP-L2. L'ensemble de ces protéines permettent le bon déroulement de l'autophagie (Matoba et Noda, 2021).

1.6.2.1 L'importance d'ATG5 dans l'autophagie

La protéine ATG5 joue un rôle primordial dans la macro-autophagie. Elle est impliquée lors de l'élongation du phagophore en autophagosome ; elle produira un complexe protéique. Le complexe débute par l'association des protéines ATG5 et ATG12 par la méthode de conjugaison. Pour ce faire, la protéine ATG12 se fait conjuguer par la protéine ATG7 qui agit comme une ubiquitinase E1 et ATG10 une autre ubiquitinase E2. La formation du complexe a lieu à la membrane externe du phagophore. À la suite de la conjugaison d'ATG5-ATG12, la protéine ATG16L est recrutée au complexe pour permettre le support lors de la courbure du phagophore. En l'absence d'ATG5 ou de sa liaison avec ATG12, l'autophagie est inhibée (Matoba et Noda, 2021).

1.6.2.2 L'implication d'ATG5 dans la cellule

Une étude a montré un nouveau rôle de la protéine ATG5 ; elle joue un rôle sur le plan nucléaire à la suite de traitement cellulaire avec des agents générant des dommages à l'ADN. Après les traitements, la quantité d'ATG5 dans les cellules augmente. De plus, elle montre une implication dans certains processus nucléaires tels que l'effondrement mitotique et l'interaction de la protéine survivine dans le complexe chromosomal passager ; de même qu'une quantité non négligeable d'ATG5 transloque du cytosol vers le noyau (Fairlie *et al.*, 2020; Maskey *et al.*, 2013). En plus de son rôle dans l'autophagie, ATG5 peut jouer un rôle dans l'activation de l'apoptose lorsqu'il y a accumulation des autophagosomes. À la suite de la formation de son complexe, ATG5 native peut lier en C-terminal la protéine FADD, protéine impliquée dans le domaine de la mort. Cette liaison est seulement possible si le complexe ATG5-ATG12 et ATG16L est préalablement formé. Une fois FADD liée à ATG5, FADD peut recruter la caspase 8 et l'activer (Fairlie *et al.*, 2020). L'activation de la caspase 8 mène à la mort cellulaire (Yousefi *et al.*, 2006).

1.6.2.3 Impact de la version clivée d'ATG5 sur la cellule

Tout comme pour BCN1, ATG5 peut se retrouver clivée par des protéines apoptotiques lors d'un stress. Ce clivage confère de nouvelles fonctions à la protéine. Yousefi et al. ont montré qu'ATG5 pourrait être clivé lors d'un traitement à la staurosporine (inhibiteur de protéines kinases) et la doxorubicine (un agent anticancéreux, de la famille des anthracyclines agissant comme un intercalant dans l'ADN) (Yousefi *et al.*, 2006). Plus précisément, la protéine est clivée en position T193. Ils ont démontré que ce clivage serait régulé par la protéine calpaine et que la partie clivée de 24 kDa transloquerait à la mitochondrie. À la suite de sa translocation à la mitochondrie, la protéine ATG5 clivée interagirait avec BCL-xL pour inhiber son activité anti-apoptotique, favoriser l'activation de BAX et avantager le relâchement du cytochrome C et la mort cellulaire (Yousefi *et al.*, 2006).

1.7 Présentation du projet

1.7.1 Introduction

Toutes les cellules des différents organismes sur la planète vivent dans un intervalle de température précaire; une légère variation au-dessus ou au-dessous peut engendrer la mort des cellules. Il n'en demeure pas moins que la mort n'est pas la première réponse d'une cellule lors d'une perturbation. Les cellules tenteront de survivre en activant différentes voies durant la perturbation. Les mécanismes de survie ont une capacité maximale. Quand le stress est maintenu de manière prolongée, les cellules peuvent activer une seconde voie ; celle de la mort cellulaire généralement par l'apoptose ou la nécrose.

Globalement, des recherches ont permis de comprendre, de découvrir et de mettre au point des schémas expliquant l'activation des différentes voies de signalisation de la survie ou de la mort cellulaire. Au courant des dernières décennies, des études ont été effectuées sur la compréhension du rôle des protéines dans les processus d'autophagie et d'apoptose. Ainsi, ces études ont été réalisées pour découvrir les protéines, les mécanismes et les relations entre les deux voies. À l'aide de ces recherches, il a été découvert que certaines protéines étaient impliquées dans les deux processus de survie et de mort cellulaires. Malgré les découvertes, il reste beaucoup de notions à élucider avant d'arriver à une compréhension complète de la transition entre l'autophagie et l'apoptose.

Concernant la perturbation hyperthermique, elle est capable d'engendrer la survie ou la mort cellulaire en fonction de l'intensité et la durée du choc thermique. Dans certains cas, la mort peut être favorable pour détruire les cellules problématiques comme pour le traitement contre le cancer alors que dans d'autres situations, la survie cellulaire est préférable pour activer des mécanismes de régulation comme pour le traitement des maladies rhumatisques.

Lors des dernières décennies, de nombreuses découvertes ont permis d'élucider certains mécanismes moléculaires impliqués lors de l'hyperthermie. Plus précisément, nous avons une meilleure compréhension de l'implication de l'autophagie et de l'apoptose lors d'hyperthermie.

Au sein du laboratoire, certaines découvertes ont permis de mieux comprendre les voies de signalisation impliquées lors de l'autophagie ou de l'apoptose lors d'hyperthermie. Conséquemment, Bettaieb et Averill-Bates ont peaufiné l'affirmation selon laquelle l'hyperthermie peut générer la mort par les différentes voies intrinsèques, en démontrant que l'activation de l'apoptose par la voie intrinsèque du réticulum endoplasmique pouvait être régulée par trois différentes protéines : PERK, ATF6 et IRE-1a (Bettaieb et Averill-Bates, 2015).

D'autres études menées par Kassis et collègues ont montrées l'implication des EROs dans l'activation de l'autophagie lors d'hyperthermie de courte durée (moins de 60 minutes). De plus, ils ont démontré que la production des EROs était augmentée chez les cellules thermotolérantes, accentuant l'idée que l'autophagie est un mécanisme de pro-survie cellulaire (Kassis *et al.*, 2021).

Glory et Averill-Bates ont montrés l'importance de la protéine Nrf2 dans l'acquisition de la thermotolérance. Globalement, son activation s'effectue par les protéines pro-oxydantes telles que la protéine p53. À la suite de son activation, la protéine Nrf2 migre au noyau où elle ira lier les régions promotrices des gènes qui codent pour des protéines antioxydantes. Cela permettra d'activer une voie de réponse au stress ciblant le stress oxydatif et électrophile (Glory et Averill-Bates, 2016).

Ces recherches ont permis de mieux comprendre les voies d'autophagie ou d'apoptose de manière individuelle. Malgré ces découvertes, l'aspect de l'activation de la mort à la suite de l'autophagie n'a pas été encore étudié lors d'une perturbation thermique. Dans l'objectif d'une meilleure

compréhension de la transition du processus de survie cellulaire (autophagie) vers l'activation de la voie de la mort cellulaire (apoptose), des cellules HeLa seront analysées. En fait, l'impact du choc thermique sur des protéines, des organelles ou l'intégrité cellulaire sera observé par différents moyens.

1.7.2 Hypothèses

Pour ce projet, nous avons deux hypothèses. D'abord, le choc thermique, sur des cellules HeLa, engendre le clivage d'ATG5 et Bécline-1 suivi de leurs translocations vers la mitochondrie où ces protéines peuvent stimuler la mort via la mitochondrie. Concernant la seconde hypothèse, nous supposons que le clivage d'ATG5 et Bécline-1 sera altéré, chez les cellules thermotolérantes, en raison de l'acquisition d'une résistance thermique.

1.7.3 L'objectif et la démarche

L'objectif principal de cette étude est de comprendre comment les protéines ATG5 et Bécline-1 transitionnent dans l'activation de l'autophagie vers l'apoptose lors de condition hyperthermique chez des cellules HeLa et des cellules HeLa thermotolérantes.

1. Déterminer si l'hyperthermie peut engendrer le clivage d'ATG5 et Bécline-1
2. Déterminer si les caspases sont impliquées dans le clivage d'ATG5 et Bécline-1 par l'utilisation d'inhibiteurs.
3. Déterminer si le clivage d'ATG5 et Bécline-1 bloque des protéines anti-apoptose et cause la mort par apoptose
4. Déterminer si la thermotolérance confère un avantage protecteur contre l'activation apoptotique lors de clivage des protéines ATG5 et Bécline-1

CHAPITRE 2

Matériel et Méthodes

2.1 Culture des cellules HeLa

La culture des cellules du carcinome cervical HeLa s'est effectuée dans des flacons de culture (Sarstedt, Saint-Laurent, QC, Canada). Le milieu utilisé fut du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) complet (Wisent Bioproducts, Saint-Jean-Baptiste, QC), combiné avec du sérum 10 %, de la pénicilline (50 unités/ml) et streptomycine (50 µg/ml) et d'une solution amphotéricine B (0,25 µg/ml) (Wisent). Les cellules ont été en incubation jusqu'à l'obtention de confluence de soixante-dix à quatre-vingts pour cent dans un incubateur à 37 °C (Sanyo Scientific, Canada), sous une atmosphère de 5 % CO₂.

2.2 Choc thermique à 42 °C

Les cellules, lors d'une confluence convenante, ont été incubées durant 0, 15, 30, 45, 60 ou 120 minutes à 42 °C. Par la suite, elles ont été traitées à la trypsine-EDTA, récoltées et centrifugées (1000 ×g) à 4 °C durant 10 minutes. Ensuite, elles ont été lavées avec la solution A (100 mM sucrose, 1 mM EDTA, et 20 mM MOPS « Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique » à pH 7,4) et centrifugées (1000 ×g) à 4 °C durant 10 minutes. Les cellules ont été resuspendues dans 100 µl de tampon de lyse (100 mM sucrose, 1 mM EDTA, 20 mM MOPS, 0,01 % digitonine, 2 mM NaVO₃, 1 mM NaF, 2 mM PMSF « Fluorure de phénylméthylsulfonyl », 0,1 mM NaF, inhibiteur de protéase et 1 % Percoll) et congelées à -80 °C pendant la nuit.

2.3 Fractionnement subcellulaire : mitochondries et cytosol

À la suite de la congélation d'une nuit à -80 °C, les cellules ont été brisées au mortier et pilon (50 fois). Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 750 g à 4 °C durant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires et les cellules intactes. Le surnageant a été conservé et centrifugé à 14 500 g à 4 °C durant 20 minutes. Le surnageant résultant a été conservé comme cytosol. Le culot a été lavé avec du tampon de lyse et centrifugé à 1000 g à 4 °C durant 5 minutes. Finalement, le culot (fraction des mitochondries) a été suspendu dans du tampon (300 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS et 0,1 mM dithiothréitol (DTT)).

2.4 Immunobuvardage du type Western

Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (15 %) « Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis » selon le protocole de Laemmli (1970) (Rezda-Dutordoir et al, 2016). L'électrophorèse se faisait durant 60 minutes à 150 V. Par la suite, les protéines ont été transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidene (PVDF) (Biorad Laboratories, Mississauga, ON, Canada,) durant 60 minutes à 100 V (Rezda-Dutordoir et al, 2016). Enfin, les membranes ont été bloquées avec une solution contenant 5 % de lait dans du TBST (« tris-buffered saline » (TBS) et Tween 20).

2.5 Anticorps pour l'immunobuvardage de type Western

Pour la détection, différents anticorps primaires spécifiques aux protéines d'intérêt ont été utilisés. Ces derniers ont été incubés avec les membranes durant une nuit à 4 °C. La protéine ATG5 fut détectée avec anti-ATG5 de lapin (Abgent, Burlington, Ontario, #AP1812a) avec une dilution de 1 :1000. Becline-1 clivée a été détectée par l'anti-BCN1 de souris avec une dilution de 1 : 1000 (Becton Dickinson Company BD USA, Spark, Maryland # 612113). Becline-1 native fut détectée avec l'anti-BCN1 de lapin (D40C5) avec une dilution de 1 :1000 et LC3A/B avec l'anti-LC3A/B de lapin (4108) avec une dilution de 1 :1000 (Cell Signaling Technology Inc., New England Biolabs Canada Whitby, ON). Les anticorps pBAD (Ser136), BAD (K-17) et BAX (2D2) ont été détectés avec une dilution de 1 :1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA). Pour la détection des anticorps secondaires, nous avons utilisé un anticorps secondaire anti-souris (Cedarlane Canada, Burlington, ON, Canada, #CLAS09-627) avec une dilution de 1 : 25000 ou anti-lapin (Cell Signaling Technology Inc., #7074) avec une dilution de 1 : 3000. Enfin, nous avons eu recours à un contrôle de charge; GAPDH « Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase » (1 : 1000) anti-souris (MediMabs, Montréal, QC) et VDAC « Voltage-dependent anion channel » (1 :1000) (Cell Signaling Technology Inc., ON). Les niveaux des protéines ont été normalisés à GAPDH et détectés par un densitomètre de balayage à laser (Fusion Fx7, Montréal Biotech (MBI), Montréal, QC) et le logiciel Quantity one (Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd.).

2.6 Analyse cinétique du potentiel membranaire mitochondriale par microscopie confocale

Pour détecter le potentiel membranaire en temps réel, des cellules ont été ensemencées dans des pétris (ibidi Inc., Fitchburg, WI, USA) à 37 °C, sous atmosphère de 5 % CO₂ durant la nuit. Le

lendemain, la sonde JC1 (7,7 μM) et la sonde Hoeschst 33258 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ont été ajoutées au milieu DMEM. JC1 est une sonde ratiométrique qui change de couleur en fonction de l'accumulation dans les mitochondries. Par la suite, l'échantillon a été placé dans une chambre à incubation (5 % CO_2) du microscope confocal (model MRC-1024ES, géré par le logiciel NIS-Element AR4, Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd), combiné avec un microscope inversé (Eclipse Model TE 3000, Nikon Canada, Montréal, QC) avec un objectif à 40 \times (Plan Apo, NA 0.75) en mode résonant. La température a été montée à 42°C et puis la prise de photo (caméra digitale et analyse des images avec logiciel FIJI (NIH, Maryland, USA)) a été faite aux intervalles de cinq minutes sur une période de deux heures.

2.7 Activité des caspases

Les cellules ont été incubées durant 0, 15, 30, 45, 60 ou 120 minutes à 42°C. Par la suite, elles ont été incubées durant 1h à -80°C. Les cellules ont été lysées par sonication et les substrats Ac-DEVD-AFC (201608-14-2, Santa Cruz Biotechnology Inc) à 0,2 mM pour caspase 3, Ac-LEVD-AFC (28809, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) à 0,2 mM pour caspase 4, Ac-LEHD-AMC (24569, Cayman Chemical Company) à 0,401 mM pour caspase 9 et calpain Substrate II (208731, Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, Ontario, Canada) à 0,5 mM ont été ajoutés aux échantillons. L'activité enzymatique des caspases fut mesurée par le clivage des peptides fluorogéniques de chaque substrat. Les échantillons furent analysés par lecteur de plaque Varioskan Lux (ThermoFisher) et les résultats furent générés par le logiciel Skanlt Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

2.8 Inhibition de l'activité des caspases

Les cellules ont été incubées durant deux heures avec les différents inhibiteurs de calpaine à 20 μM (ALLN, 110044-82-1, Calbiochem), de la caspase 4 à 20 μM (Ac-LEVD-CHO, 402832-01-3, Calbiochem) ou de la caspases 9 à 20 μM (Z-LEHD-FMK, 218761, Caspase Inhibitor Set III, Calbiochem) à 37°C. Par la suite, les cellules ont été incubées durant 0, 15, 30, 45 60 ou 120 minutes à 42°C. Ensuite, les cellules ont été lysées et fractionnées en portions cytosoliques et mitochondriales.

2.9 Microscopie confocale

10⁶ cellules ont été incubées à 37°C (Sanyo Scientific, ESBE Scientific, Markham, ON, Canada), dans des flacons de culture sous une atmosphère de 5 % CO₂. Le lendemain, les cellules ont été incubées durant 0, 15, 30, 45, 60 ou 120 minutes à 42°C. Les cellules ont été traitées durant 15 minutes au formaldéhyde 3,7 %. Elles ont été, par la suite, incubées dans une solution de blocage (PBS 1X, 5 % de BSA « Bovine serum albumin », 5 % de sérum et 0,1 Triton X-100). Ensuite, les cellules ont été incubées durant la nuit avec l'anticorps primaire ATG5 clivée (1 : 400), Becline-1 (1 : 200) ou BCL-xL (1 : 200). Le surlendemain, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire ALEXA-488-conjugated anti-lapin (1 : 1000) dilué dans une solution de blocage (PBS 1X, 5 % de BSA, 5 % de sérum). Par la suite, les cellules furent installées sur la plateforme d'un microscope confocal (model MRC-1024ES, géré par le logiciel NIS-Element AR4, Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd), combiné avec un microscope inversé (Eclipse Model TE 3000, Nikon Canada, Montréal, QC) avec un objectif à 60 X (Plan Apo) en mode galvano.

2.10 Analyses statistiques

Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de minimalement trois expériences indépendantes. La comparaison au travers d'un même groupe a été faite par « one-way ANOVA », ce qui mesure le contraste linéaire des moyennes. Le test de Bonferroni-Holm fut appliqué pour obtenir la probabilité d'obtenir de faux positifs avec le « family-wise error rate » défini à 5 %. Le logiciel utilisé a été GraphPad Prism8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Les différences significatives sont indiquées par des étoiles, et l'absence d'étoiles indique l'absence de différences statistiques.

CHAPITRE 3

Résultats

Cette étude a démontrée de nombreux résultats préliminaires. Subséquemment, certains résultats sont non significatifs statistiquement. Ainsi dans le cadre de cette étude, lorsqu'on observe un phénomène qui a lieu à plus de 80 %, nous émettons que les résultats ont fonctionnés. Cependant, pour ces résultats, d'autres analyses supplémentaires doivent être faites pour obtenir des valeurs statistiques.

3.1 Augmentation de protéines liées à l'autophagie et l'apoptose lors d'un traitement thermique à 42°C

Nous avons voulu déterminer le moment de transition entre l'activation de l'autophagie et de l'apoptose lors d'un choc thermique à 42°C sur des cellules HeLa. Nous avons observé l'augmentation graduelle des protéines liées à l'autophagie [FIG 3.1A]. Durant les premières trente minutes, il y avait une augmentation d'ATG5, de BCN1, de LC3-I et LC3-II. Après 45 minutes, il y a eu une diminution de l'expression pour certaines protéines pour atteindre un niveau basal aux alentours de 60 minutes. En plus de protéines autophagiques, il y avait la hausse de protéines liées à l'apoptose : BAX, BAD et la forme phosphorylée de BAD (pBAD) [FIG 3.1B]. Nous avons observés une augmentation des protéines BAX et BAD dès 15 minutes; cette hausse se maintient pour BAX, mais elle diminue pour BAD à 60 minutes. pBAD a eu une augmentation d'expression suivi d'un retour au niveau contrôle après 45 minutes. À la suite d'un traitement avec l'hyperthermie à 42 °C, il y a eu une tendance d'augmentation de protéines liées à l'autophagie et l'apoptose.

3.2 Le choc thermique génère le clivage d'ATG5.

Nous avons voulu déterminer si l'ATG5 serait clivée lors d'un stress thermique à 42 °C. Lors d'un traitement thermique à 42 °C, il a eu une hausse significative des niveaux des protéines ATG5 clivées et natives à 30 minutes, dans le lysat cellulaire [FIG 3.2]. Après 60 minutes, les niveaux d'ATG5 clivées et natives ont retournées au niveau du contrôle.

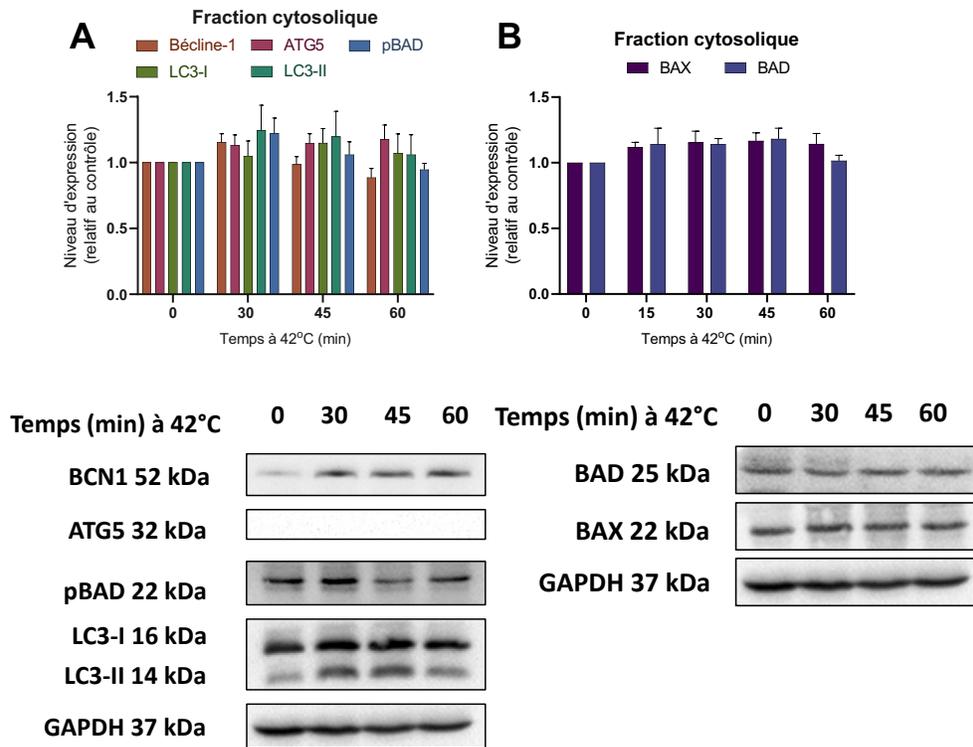


Figure 3.1 Augmentation d'expression des protéines liées à l'autophagie et l'apoptose lors d'un choc thermique à 42°C.

À un choc thermique à 42 °C, l'expression des protéines a été analysée et quantifiée dans la fraction cytosolique des cellules par immunobuvardage de type Western où N = 8. (A) Expression de protéines liées à la survie cellulaire où N ≥ 7 et (B) L'expression des protéines a été normalisée par rapport à la protéine GAPDH pour le contrôle de charge et par rapport aux cellules non traitées au temps 0, expression = 1. Les valeurs d'expression représentent la moyenne et l'écart-type de la moyenne (SEM).

3.3 Translocation d'ATG5 clivée du cytosol vers la mitochondrie

Selon les résultats de Yousefi *et al.*, la protéine d'ATG5 tronquée a été impliquée dans l'activation de la mort cellulaire via la mitochondrie (Yousefi *et al.*, 2006). Nous avons confirmés le clivage d'ATG5 et conséquemment, nous allons valider sa translocation vers la mitochondrie. Subséquemment, l'expression d'ATG5 clivée dans les fractions mitochondriales et cytosoliques à la suite d'une exposition thermique à 42°C a été analysée. Les résultats ont montrés, qu'il y a une tendance à l'augmentation d'ATG5 clivée dans le cytosol à 30 minutes [FIG 3.3A]. Cette tendance d'augmentation corrèle avec celle dans la mitochondrie au temps 30 minutes [FIG 3.3B].

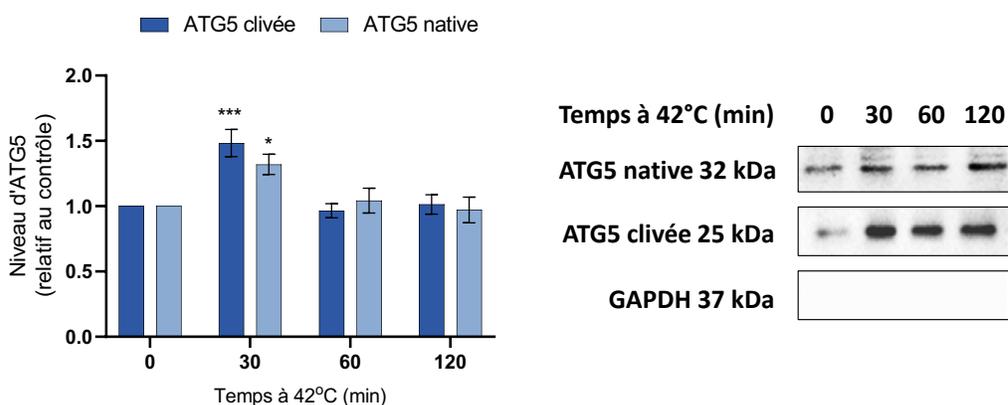


Figure 3.2 Clivage de l'ATG5 lors d'un choc thermique à 42 °C.

Les cellules ont été traitées avec un choc thermique à 42 °C et analysées par immunobuvardage de type Western. L'expression des protéines a été normalisée par rapport à la protéine GAPDH pour le contrôle de charge et par rapport aux cellules non traitées au temps 0, expression = 1. Les valeurs d'expression représentent la moyenne et l'écart-type de la moyenne (SEM). Les résultats d'immunobuvardage de type Western représentent plus de cinq expériences faites indépendamment. Les valeurs sont statistiquement significatives des cellules traitées à 42°C par rapport aux cellules non traitées lorsque $p < 0,05$ [*] et $p < 0,001$ [***].

Pour confirmer les résultats d'immunobuvardage, nous avons quantifiés la protéine ATG5 clivée dans les cellules par microscopie confocale [FIG 3.4]. Il y avait une tendance d'augmentation d'ATG5 clivée lors d'un choc thermique à 42 °C [FIG 3.4B, FIG 3.4C]. Pour renchérir, la colocalisation de la protéine ATG5 clivée à la mitochondrie a été observée par microscopie confocale. La sonde MitoTracker Red a été utilisée pour l'identification de la mitochondrie. Un anticorps secondaire couplé à Alexa 488 détecte l'anticorps contre ATG5 clivée (FIG 3.4C). La microscopie confocale permet de calculer la corrélation de Pearson entre deux sondes fluorescentes. Pour ce faire, le logiciel de microscopie (NIS-Element AR4 de Nikon) permet de quantifier la corrélation linéaire entre les deux sondes fluorescentes (Dunn *et al.*, 2011). Plus exactement, la corrélation de Pearson se définit comme étant la corrélation linéaire de l'intensité de l'immunofluorescence de deux sondes. Il y avait une tendance d'augmentation de la corrélation de Pearson dès 45 et 60 minutes à 42 °C [FIG 3.4A]. L'ensemble de ces résultats corroborent la tendance que la protéine ATG5 a été clivée dans le cytosol et elle a été trouvée à la mitochondrie. ATG5 clivée pourrait avoir une action à la mitochondrie.

3.4 Interaction entre ATG5 clivée avec la protéine BCL-xL

Yousefi et ses collègues ont démontrés le clivage d'ATG5 et l'interaction de la version clivée avec BCL-xL par immunoprécipitation de cellules Jurkat traité à la staurosporine (Yousefi *et al.*, 2006). Nous avons voulu savoir si la version tronquée d'ATG5 lie BCL-xL lors d'une perturbation hyperthermique. Pour débiter, il a fallu déterminer si l'expression de la protéine BCL-xL était affectée par les températures élevées. Il y a eu une augmentation de la protéine dans la fraction cytosolique de 15 minutes à 60 minutes [FIG 3.5A, FIG 3.5B]. Dans la fraction mitochondriale, le niveau de BCL-xL était plus élevé après 45 minutes. Ayant confirmé l'augmentation de l'expression de BCL-xL, la microscopie confocale fut utilisée pour confirmer la colocalisation des deux protéines. Pour pouvoir détecter les protéines, il nous a fallu avoir recours à la sonde Alexa-488 pour ATG5 clivée et Alexa-647 pour identifier BCL-xL (FIG 3.5D). Nous avons trouvé la colocalisation entre ATG5 clivée et BCL-xL de 45 minutes à 60 minutes [FIG 3.5C]. Cela nous permet de confirmer qu'il y a une tendance d'interaction entre les deux protéines lors d'une hyperthermie à 42 °C.

3.5 Clivage d'ATG5 par les caspases 4, 9 et calpaine.

À la suite de l'activation de l'apoptose, plusieurs protéines se font cliver pour permettre la dégradation cellulaire (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Il avait fallu déterminer quelles sont les protéines qui pourraient cliver ATG5. Les cellules ont été traitées avec différents inhibiteurs des protéases lors d'un choc thermique dans l'objectif de déterminer si l'augmentation d'expression d'ATG5 clivée pourrait être bloquée. À la suite du traitement avec les inhibiteurs, les différentes fractions cellulaires [cytosoliques, mitochondriales] ont été analysées par immunobuvardage de type Western. Lors d'un traitement avec les inhibiteurs des caspases 4, 9 et calpaine, une tendance de diminution de la quantité d'ATG5 clivée dans la fraction cytosolique a été relevée [FIG 3.6A]. Avec les inhibiteurs de caspases 4 et 9, il a été possible de remarquer une tendance de diminution d'ATG5 clivée dans la fraction mitochondriale [FIG 3.6B].

Par la suite, ayant démontrés une implication des caspases 4, 9 et calpaine sur le clivage d'ATG5, nous avons déterminés si l'activation de ces cliveurs correspondait dans le temps à l'augmentation d'ATG5 clivée. L'activité enzymatique de ces protéases a été détectée par le clivage de substrats fluorescents lors d'un choc thermique à 42°C. À la suite d'un choc thermique à 42°C, nous avons

observés l'activation significative de la caspase 9 et la caspase 3. Cette activation débute après 15 minutes et coïncide avec le début du clivage d'ATG5 [FIG 3.6C]. À propos de la caspase 4 et calpaine, la tendance de leurs activations avaient débuté à 30 minutes [FIG 3.6C]. Conséquemment, la protéine ATG5 semble être clivée par les caspases 4, 9 et calpaine lors d'une hyperthermie induite à 42 °C.

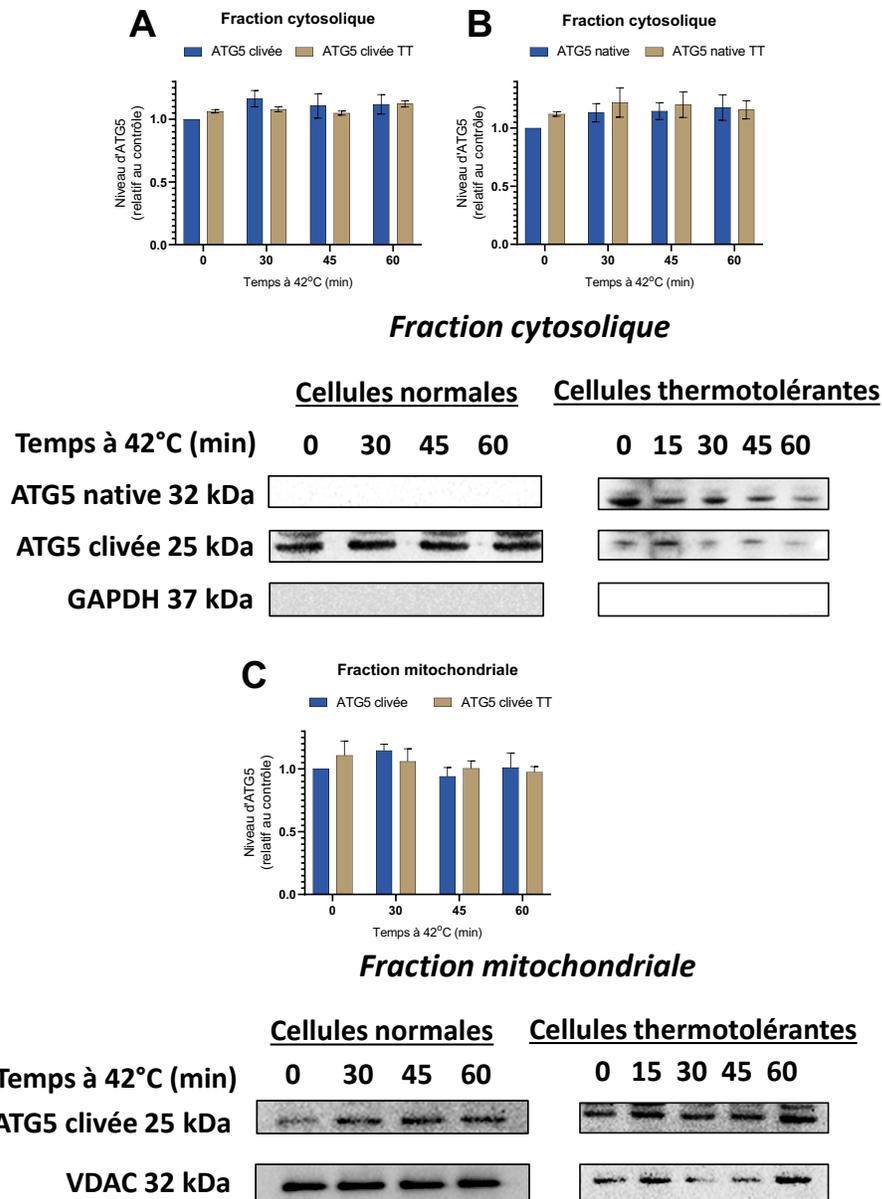


Figure 3.3 Expression d'ATG5 clivée dans la partie cytosolique et mitochondriale lors d'un choc thermique à 42 °C chez des cellules normales et thermotolérantes (TT).

L'expression d'ATG5 clivée dans la fraction cytosolique (A), mitochondriale (C) et d'ATG5 native dans le cytosol (B) détectée par immunobuvardage de type Western (A, B et C). Les cellules thermotolérantes ont été préincubées pendant 3 h à 40 °C. N ≥ 7. Les protéines ont été normalisées par rapport à la protéine GAPDH pour le contrôle de charge et par rapport aux cellules non traitées au temps 0, expression = 1. Les valeurs d'expression représentent la moyenne et l'écart-type de la moyenne (SEM). Les valeurs représentent plus de sept expériences faites indépendamment.

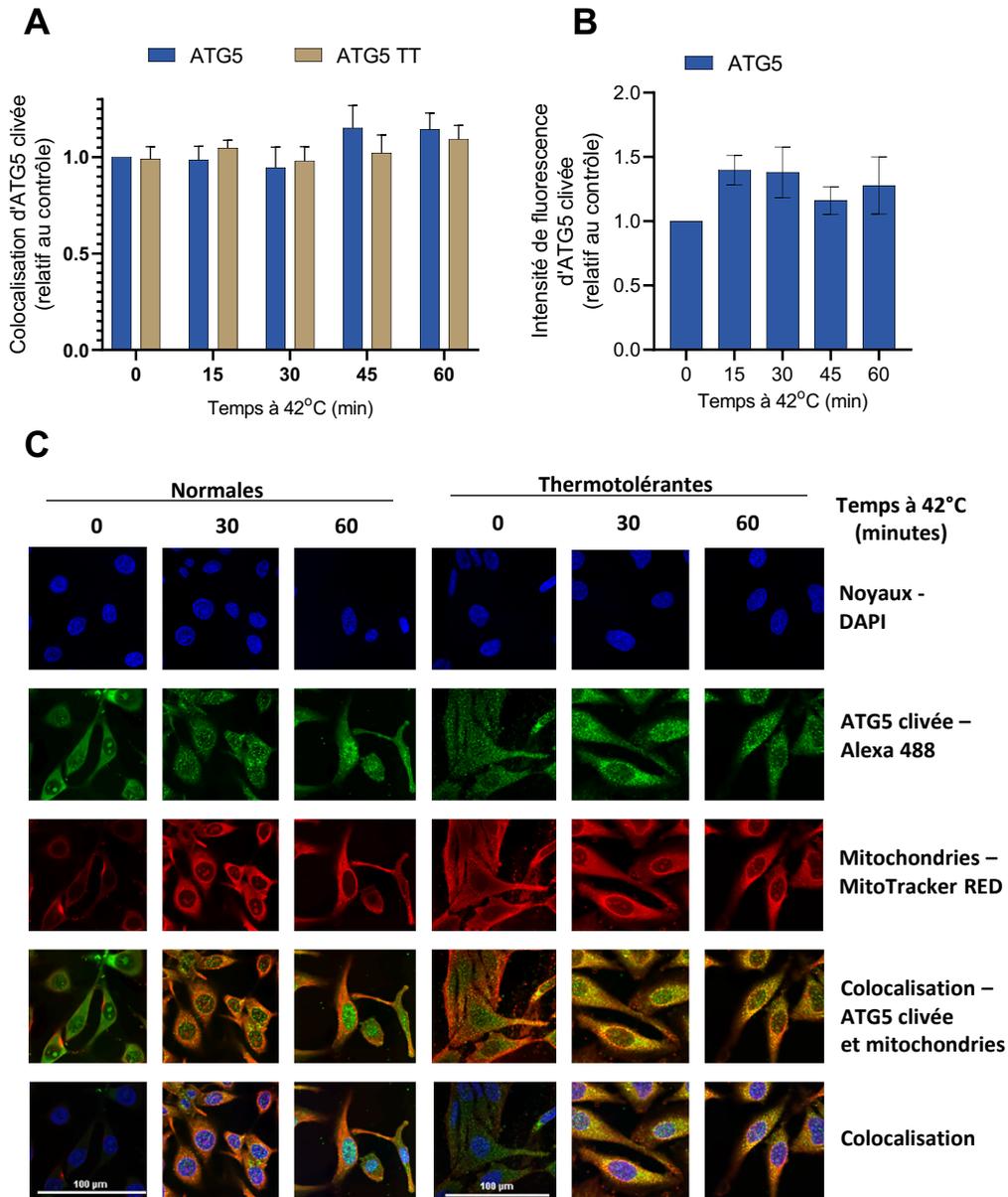


Figure 3.4 Colocalisation d'ATG5 clivée à la mitochondrie lors d'un choc thermique à 42 °C. Représentation de la colocalisation d'ATG5 clivée à la mitochondrie à la suite d'un choc thermique à 42 °C (A). Intensité d'expression de la fluorescence d'ATG5 clivée à la suite d'un choc thermique à 42 °C (B) ou N ≥ 3. Images de la colocalisation d'ATG5 clivée et des mitochondries lors d'un choc thermique à 42 °C (C). Les images représentent plus de 4 expériences qui ont été faites indépendamment (Grossissement de

60X). La protéine ATG5 clivée a été détectée par la sonde Alexa-488, alors que les mitochondries ont été détectées par la sonde MitoTracker Red et les noyaux ont été colorés au DAPI. La colocalisation est montrée pour des sondes des noyaux, d'ATG5 et des mitochondries. Les valeurs d'expression représentent la moyenne et l'écart-type de la moyenne (SEM).

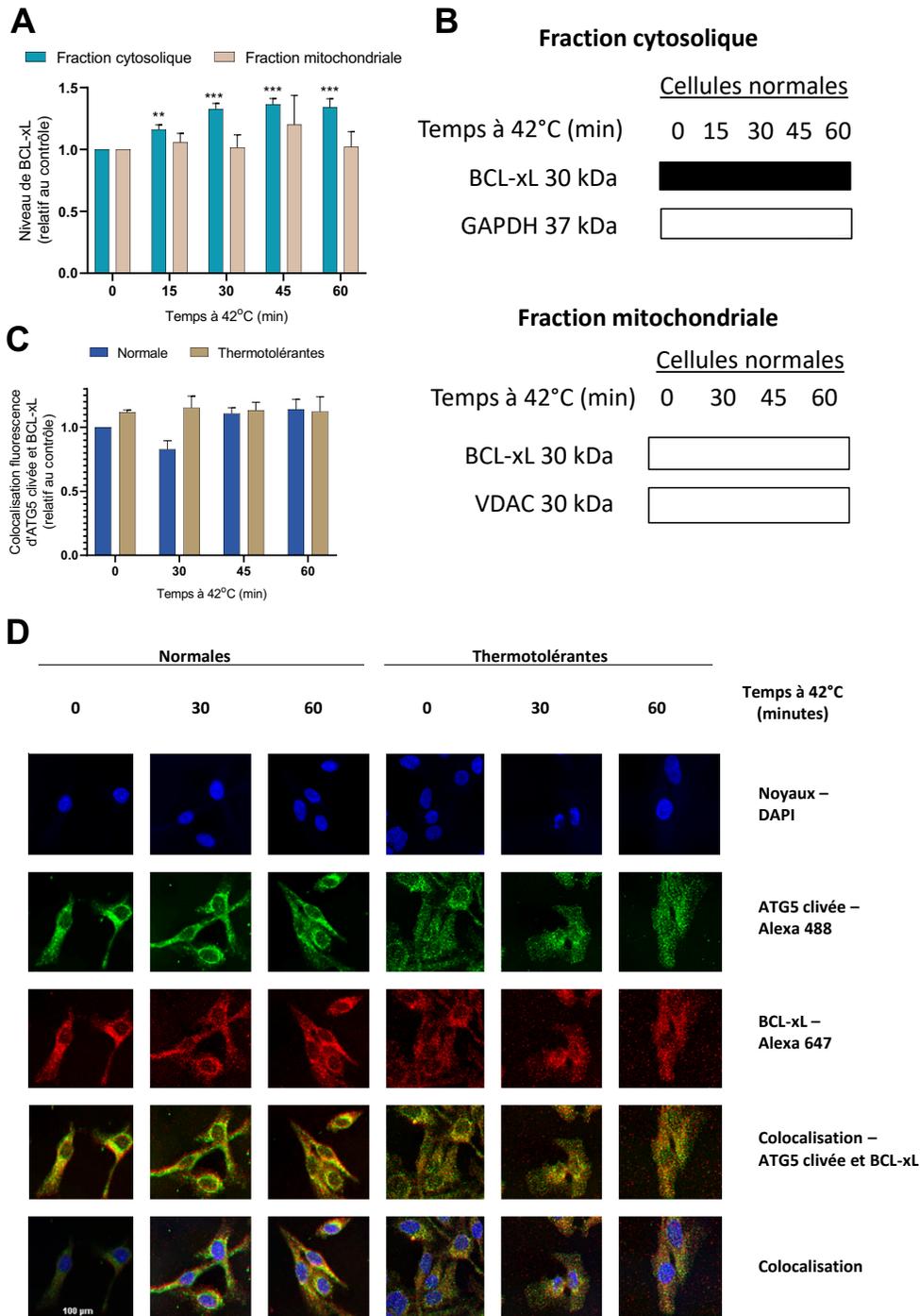


Figure 3.5 Interaction d'ATG5 avec la protéine anti-apoptotique BCL-xL lors d'un choc thermique. Les cellules ont été traitées avec un choc thermique à 42 °C. Les cellules ont été fractionnées puis analysées pour l'expression de BCL-xL par immunobuvardage de type Western ou $N \geq 5$ (A). Les protéines ont été

normalisées par rapport à la protéine GAPDH pour le contrôle de charge et par rapport aux cellules non traitées au temps 0, expression = 1. Les valeurs d'expressions représentent la moyenne et l'écart-type de la moyenne (SEM). Image des résultats d'immunobuvardage de type Western de la protéine BCL-xL dans la fraction cytosolique et mitochondriale. (B) Les valeurs représentent plus de quatre expériences faites indépendamment. Représentation de la colocalisation d'ATG5 clivée avec BCL-xL lors d'une hyperthermie à 42 °C (C). $N \geq 4$. Colocalisation de la protéine ATG5 avec la protéine BCL-xL lors d'un choc thermique à 42 °C. (D) Les images représentent plus de quatre expériences faites indépendamment (Grossissement de 60X). La protéine ATG5 clivée a été détectée par la sonde Alexa-488, alors que la protéine BCL-xL a été détectée par la sonde Alexa-647 et les noyaux ont été colorés au DAPI. La colocalisation est montrée pour des sondes des noyaux, d'ATG5 clivée et de BCL-xL. Les valeurs sont statistiquement significatives des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées lorsque $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***)

3.6 Activation de l'apoptose via la mitochondrie par l'influence d'ATG5 clivée

Les mitochondries sont un vestige de la fusion des cellules eucaryotes avec un procaryote. Cette fusion a permis l'acquisition de certaines particularités, dont la présence de deux membranes. Cette double couche membranaire joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de l'organite et dans la survie cellulaire (Giacomello *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2022). Effectivement, la première couche dite externe est poreuse pour les ions et certaines petites protéines, alors que la couche dite interne est plus sélective et contient de nombreuses pompes ioniques. Ces pompes ioniques permettent la production d'ATP et H_2O (Zorova *et al.*, 2018). La présence d'ions pour les pompes génère un potentiel dans la membrane interne qui est en constante variation entre l'état polarisé et dépolarisé. En revanche, lors d'un dysfonctionnement dans la mitochondrie, ce potentiel peut être affecté. Par conséquent, l'étude du potentiel membranaire mitochondrial est un indicateur de la santé mitochondriale.

Pour comprendre l'importance de la mitochondrie lors de cette transition de l'autophagie vers l'apoptose, le potentiel membranaire mitochondrial a été déterminé à la suite d'un choc thermique à 42 °C. Nous avons eu une dépoliarisation à 15 minutes qui a été maintenue dans le temps jusqu'à 120 minutes [FIG 3.7A, 3.7B]; d'autant plus que le début de cette dépoliarisation corrèle avec l'augmentation d'ATG5 clivée, qui a été observée par la figure 3.2.

La dépoliarisation membranaire mitochondriale est un bon indicateur des dommages au niveau mitochondrial. En règle générale, la présence d'une dépoliarisation continue des mitochondries signifie qu'il y a un problème aux mitochondries, mais cela ne signifie pas la mort cellulaire pour autant. Conséquemment, nous avons aperçus la sortie de la protéine cytochrome C. Cette protéine a été relâchée de la membrane mitochondriale vers le cytosol lors de l'activation de l'apoptose via

la voie mitochondriale. Nos résultats ont montrés que le relâchement du cytochrome C débute dès 15 minutes [FIG 3.7C], soit simultanément à la hausse de la protéine ATG5 clivée [FIG 3.2], et s'est maintenu jusqu'à 60 minutes.

3.7 L'inhibition d'ATG5 clivée causée par la thermotolérance

Les cellules peuvent acquérir une protection contre l'hyperthermie dite sévère, telle que 42 à 45°C. Pour ce faire, elles doivent au préalable être exposées à des températures moins élevées telles que 39 et 40 °C (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Palapati et Averill-Bates, 2010). À la suite d'une exposition à 40 °C, d'autres travaux précédents ont montrés une protection des cellules contre l'apoptose induite par le choc thermique et le peroxyde d'hydrogène (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Palapati et Averill-Bates, 2010).

Les cellules ont été exposées à 40 °C durant 3 heures avant de les exposer à un traitement à 42 °C. Nous avons observés une tendance à la hausse de la protéine ATG5 native chez les cellules thermotolérantes lors d'un choc thermique à 42 °C [FIG 3.3C]. Concernant ATG5 clivée, il y a eu une tendance à l'augmentation d'expression d'ATG5 clivée chez les cellules thermotolérantes qui était semblable par rapport aux cellules normales, dans les fractions cytosoliques et mitochondriales [FIG 3.3A et 3.3B]. Lors de l'analyse par la corrélation de Pearson en microscopie confocale, il a été possible de confirmer la colocalisation des protéines ATG5 clivées et des mitochondries chez les cellules thermotolérantes telles que dans les cellules normales [FIG 3.4C, 3.4C].

De plus, nous avons observés une tendance à la hausse de colocalisation entre ATG5 et BCL-xL chez les cellules thermotolérantes par rapport au contrôle. Cependant, dans l'ensemble, aucune variation d'interaction entre ces deux protéines n'a été constatée comparée aux cellules normales [FIG 3.5C]. Enfin, ces résultats tendent à confirmer que la thermotolérance ne diminue pas le clivage d'ATG5, ni ces interactions avec la mitochondrie et BCL-xL.

Enfin, nous voulions savoir l'impact du choc thermique sur les mitochondries chez les cellules thermotolérantes lors d'un choc thermique. Nous avons observés qu'il n'y avait pas de variation du potentiel membranaire mitochondrial en fonction de la température à 42°C dans les cellules

thermotolérantes [FIG 3.7A]. Cependant, le cytochrome C n'a pas été augmenté dans les cellules thermotolérantes par rapport à celles normales [FIG 3.7C]. Ceci montre l'effet protecteur de la thermotolérance contre les événements pro-apoptotiques, comme attendu. En résumé, la thermotolérance a retardé l'activation de l'apoptose via les mitochondries.

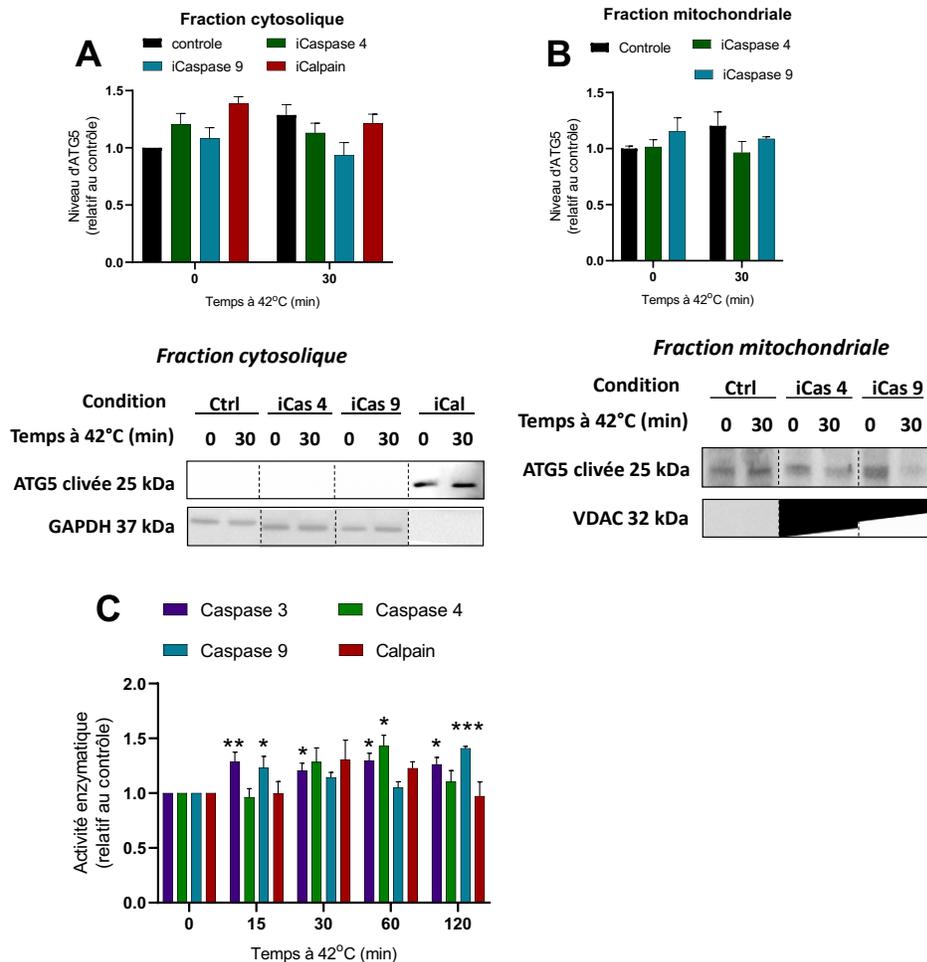
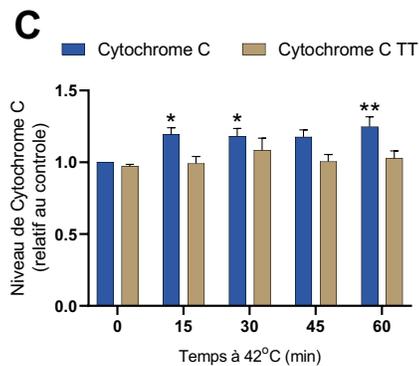
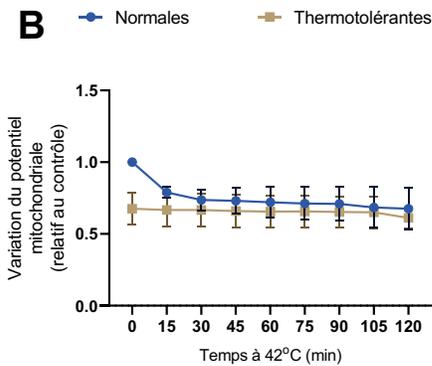
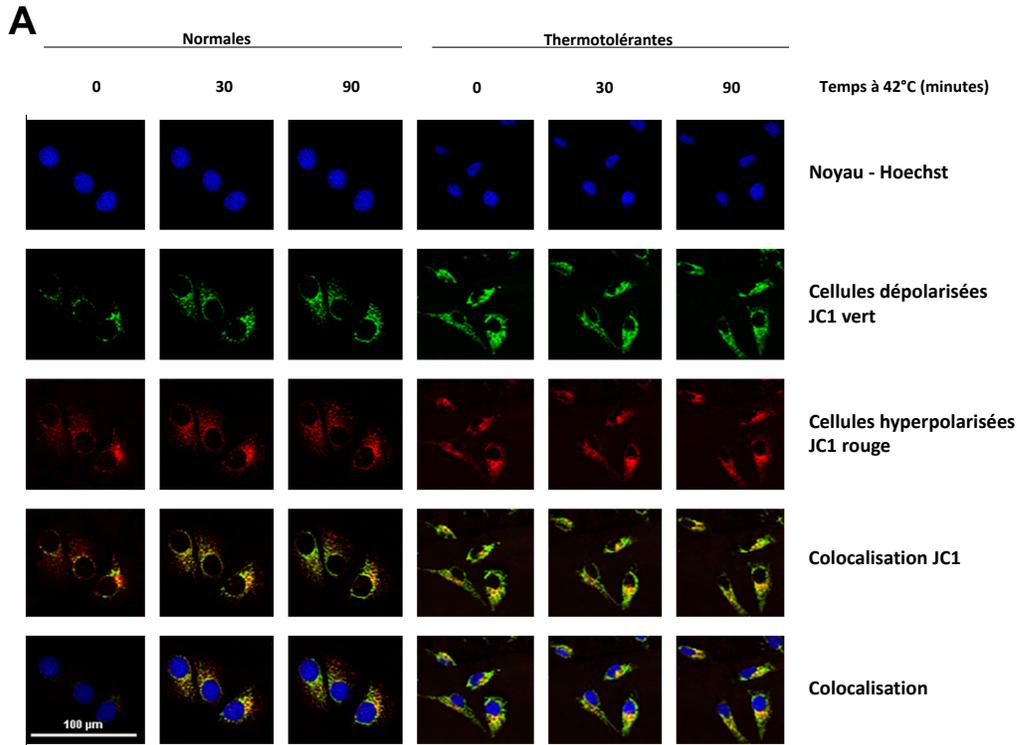


Figure 3.6 Inhibition du clivage d'ATG5 par les inhibiteurs de protéases lors d'un choc thermique. La diminution d'ATG5 clivée dans les fractions cellulaires cytosoliques [A] et mitochondriales [B] a été analysée par immunobuvardage de type Western. $N \geq 3$. Activation de l'activité enzymatique de protéases lors d'un choc thermique à 42 °C [C] $N \geq 5$. Les hachures verticales séparent les échantillons pris sur différents immunobuvardages de type Western ; le contrôle est pris sur le même échantillon. L'utilisation de i est pour définir les inhibiteurs ; iCaspase 4 est l'inhibiteur de caspase-4, et iCalpain est l'inhibiteur de calpaine. Les protéines ont été normalisées par rapport à la protéine GAPDH pour le contrôle de charge et par rapport aux cellules non traitées au temps 0, expression = 1. Les valeurs d'expression représentent la

moyenne et l'écart-type de la moyenne [SEM]. Les valeurs sont statistiquement significatives des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées lorsque $p < 0,05$ [*], $p < 0,01$ [**] et $p < 0,001$ [***].



Fraction cytosolique

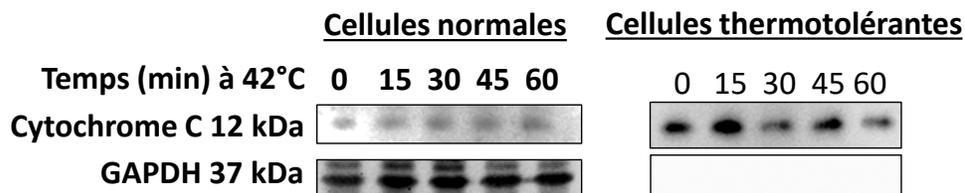


Figure 3.7 Diminution de l'intégrité mitochondriale lors d'un choc thermique à 42 °C.

Images des mitochondries lors du choc thermique détectée par la sonde JC1 (sonde indicatrice du potentiel membranaire mitochondriale) par microscopie confocale [A]. Les images représentent plus de 11 expériences faites indépendamment [Grossissement de 60X]. Les mitochondries dépolarisées sont vertes, les mitochondries hyperpolarisées ont été colorées en rouge et les noyaux ont été colorés au Hoechst 33258. Variation du potentiel membranaire mitochondrial qui a été détecté par l'émission de fluorescence de JC1 [B]. N = 31 pour les valeurs des cellules normales et N = 11 pour les valeurs des cellules thermotolérantes. Expression de la protéine cytochrome C a été détectée par immunobuvardage de type Western dans la fraction cytosolique lors d'un choc thermique [C]. N ≥ 5 pour les valeurs des cellules normales et N = 3 pour les valeurs des cellules thermotolérantes. Les protéines ont été normalisées par rapport à la protéine GAPDH pour le contrôle de charge et par rapport aux cellules non traitées au temps 0, expression = 1. Les valeurs d'expressions représentent la moyenne et l'écart-type de la moyenne [SEM]. Les valeurs sont statistiquement significatives des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées lorsque $p < 0,01$ [*], $p < 0,05$ [**].

3.8 La protéine Bécline-1

3.8.1 Implication de Bécline-1 lors d'un choc thermique

Une recherche faite par Wirawan et ses collègues a établi qu'il y avait le clivage de Bécline-1 et sa translocation cellulaire du cytosol vers la mitochondrie lors d'un traitement des cellules avec des facteurs de croissance ou privation de nutriments (Wirawan *et al.*, 2010). Nous avons souhaité déterminer si cet événement avait lieu lors d'une hyperthermie. À la suite d'un choc thermique à 42 °C, nous avons détecté par immunobuvardage de type Western l'augmentation de Bécline-1 native dans le cytosol à 30 minutes [FIG 3.8A]. À propos de la protéine Bécline -1 clivée, nous avons constaté une tendance à l'augmentation d'expression à 30 minutes [FIG 3.8B] alors que par la microscopie confocale, nous avons observé une tendance à la hausse de BCN1 clivée dans les cellules dès 30 minutes qui atteint son maximum à 45 minutes [FIG 3.9A]. Parallèlement à cette augmentation, la protéine se retrouve localisée à la mitochondrie dès 45 minutes jusqu'à 60 minutes [FIG 3.9B]. Ces résultats, pareillement à ATG5, corroborent l'idée de Wirawan (Wirawan *et al.*, 2010) selon laquelle la protéine BCN1 clivée semble être impliquée dans la mort cellulaire via la mitochondrie.

3.8.2 Implication de Bécline-1 chez les cellules thermotolérantes

Chez les cellules thermotolérantes, l'augmentation de Bécline-1 [FIG 3.8A, 3.9A] et sa forme clivée [FIG 3.8B] ainsi que sa colocalisation avec les mitochondries à 42 °C étaient similaires aux effets observés chez les cellules normales [FIG 3.9B]. Similairement à l'ATG5, la thermotolérance n'affecte pas la transition entre l'autophagie et l'apoptose.

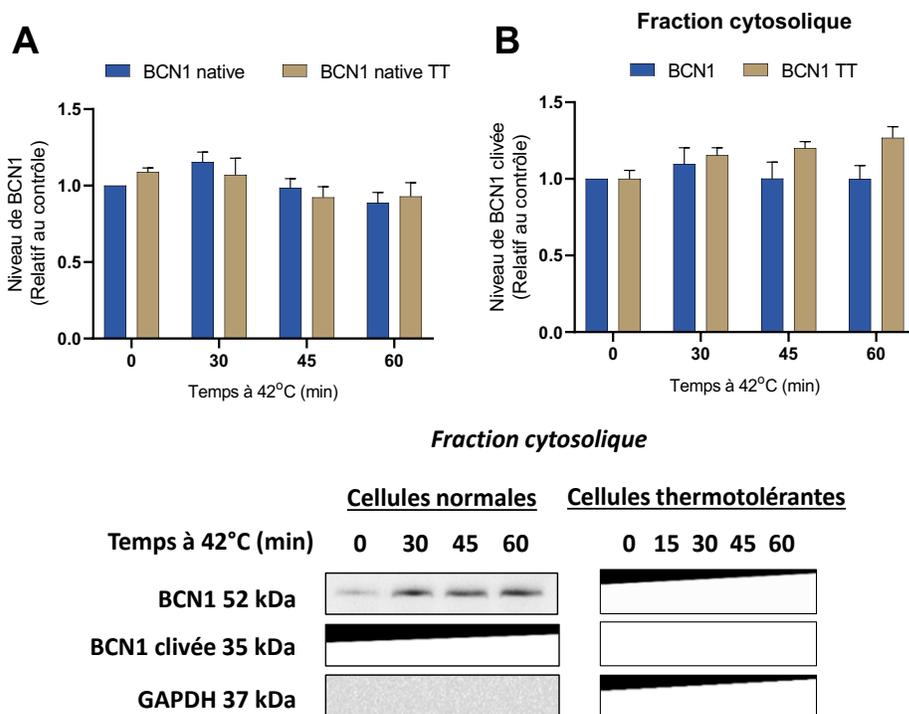


Figure 3.8 Augmentation de l'expression de Bécline-1 lors d'un choc thermique à 42 °C chez des cellules normales et thermotolérantes [TT]. Expression de Bécline-1 native dans la fraction cytosolique de cellules après un traitement thermique à 42 °C (A). Augmentation de Bécline-1 clivée dans la fraction cytosolique (B) détectée par immunobuvardage de type Western. Les cellules thermotolérantes ont été préincubées pendant 3 h à 40 °C. Les protéines ont été normalisées par rapport à la protéine GAPDH pour le contrôle de charge et par rapport aux cellules non traitées au temps 0, expression = 1. Les valeurs d'expression représentent la moyenne et l'écart-type de la moyenne (SEM). Les valeurs de l'immunobuvardage de type Western représentent plus de quatre expériences faites indépendamment.

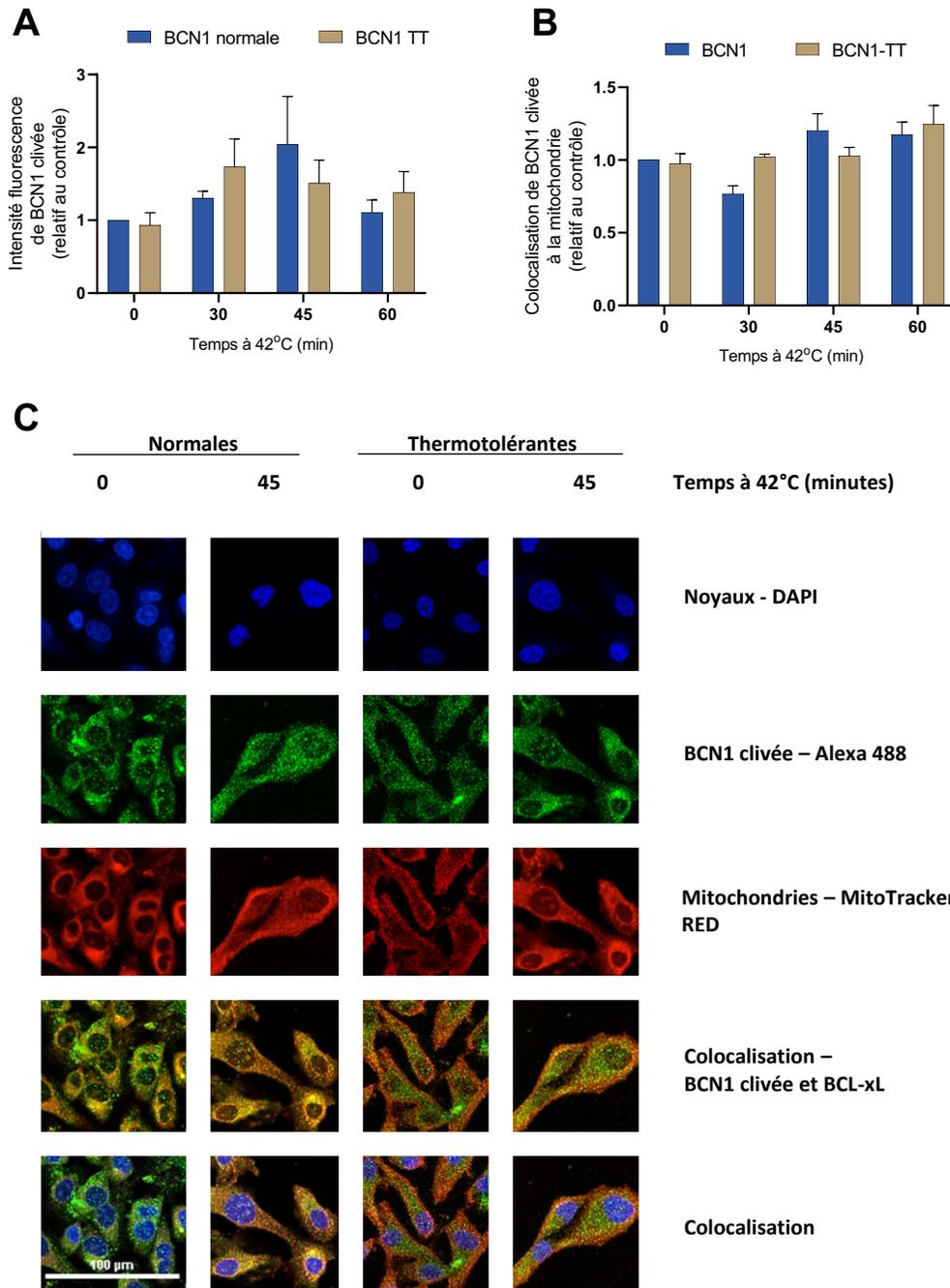


Figure 3.9 Influence du choc thermique sur l'expression et la colocalisation de Bécline-1 à la mitochondrie à la suite d'un choc thermique à 42 °C.

Représentation de l'intensité de fluorescence de Bécline-1 clivée à la suite d'une hyperthermie à 42 °C (A). $N \geq 4$ pour les valeurs de cellules normales et $N = 8$ pour les valeurs de cellules thermotolérantes. Représentation de la colocalisation de BCN1 à la mitochondrie. (B) $N = 6$. Images de la colocalisation de Bécline-1 à la mitochondrie (C). Les images représentent plus de huit expériences faites indépendamment (Grossissement de 60X). La protéine BCN1 clivée a été détectée par la sonde Alexa-488, alors que les

mitochondries ont été détectées par la sonde MitoTracker Red et les noyaux sont colorés au DAPI. La colocalisation est montrée pour des sondes des noyaux, BCN1 et les mitochondries. Les valeurs d'expression représentent la moyenne et l'écart-type de la moyenne (SEM).

CHAPITRE 4

Discussion

4.1 Récapitulatif de l'objectif

Dans le cadre de cette recherche, l'usage du mot autophagie réfèrera à l'autophagie de type macroautophagie. L'hyperthermie est une procédure complémentaire à des traitements traditionnels contre le cancer comme la chimiothérapie ou la radiothérapie (Crezee *et al.*, 2021). À l'aide de cette technique comme complément, il est possible de rendre les autres traitements plus efficaces auprès des tumeurs ciblées. Pour ce faire, le choc thermique augmente la cytotoxicité des traitements traditionnels à la suite de l'activation de processus tels que la vascularisation, l'augmentation du système immunitaire ou la diminution de la capacité des réparations aux dommages nucléaires (Bettaieb *et al.*, 2013). De plus, l'hyperthermie permet de diminuer les doses qui permettent de diminuer les effets secondaires de chimiothérapie et radiothérapie. En revanche, pour obtenir une efficacité optimale, il faut avoir une bonne compréhension du fonctionnement de l'hyperthermie sur les plans cellulaires et moléculaires. Dans cette recherche, l'objectif était de mieux comprendre les mécanismes impliqués derrière le passage de la survie cellulaire de type autophagie vers la mort cellulaire de type apoptotique à la suite d'un traitement avec hyperthermie à 42 °C.

4.2 Retour des résultats

Lors d'un choc thermique à 42 °C, nous avons observé la variation de l'expression de différentes protéines impliquées autant dans l'autophagie que l'apoptose. Tout d'abord, nous avons étudié les protéines liées dans l'autophagie et l'apoptose. Conséquemment, nous avons eu une tendance à l'augmentation des protéines liées à l'autophagie (BCN1, ATG5 et LC3) pendant les 30 premières minutes du choc thermique. Parallèlement, le choc thermique a stimulé la tendance à la hausse des protéines apoptotiques BAX, BAD et cytochrome C dès les 15 premières minutes du choc thermique. L'expression de BAX et de Cytochrome C se maintient constante durant l'heure du choc thermique dans la fraction cytosolique. Outre ces protéines apoptotiques, il y a eu l'activation de protéases (caspases, calpaïne) dès les quinze premières minutes du choc thermique.

Par la suite, ayant confirmé les prémices concernant le choc thermique, nous avons détecté la protéine ATG5 clivée dans le cytosol et les mitochondries. Ce clivage semble être causé par les protéases caspases 4, 9 et calpaine. En plus du clivage par les protéases, ATG5 clivée s'est déplacée du cytosol vers la mitochondrie. Ce déplacement a coïncidé dans le temps avec l'interaction de l'ATG5 clivée avec la protéine anti-apoptotique BCL-xL. Outre ATG5, le choc thermique a causé un impact sur la protéine Bécline-1. De manière similaire à ATG5, il y a eu une tendance à l'augmentation de Bécline-1 clivée dans le cytosol et sa migration du cytosol vers la mitochondrie.

4.3 Transition de l'autophagie vers l'apoptose

Nous voulions d'abord confirmer l'activation de l'autophagie et de l'apoptose, et par la suite déterminer la période de transition entre les deux voies. Lors d'une hyperthermie modérée, entre 39 et 41 °C et de courte durée, les cellules activeront plusieurs voies pour permettre la survie de l'organisme (Bettaieb *et al.*, 2013). L'une des voies activées est l'autophagie qui assurera le recyclage des constituants pour pallier le stress entre autres lié aux protéines mal repliées.

Selon la littérature, des températures situées au-dessus de 40 °C stimulent l'autophagie dans différents types cellulaires humains. Ainsi, chez les cellules HeLa, HEK293T, A549, SH-SY5Y et N2a à 43 °C (Zhao *et al.* (2009), on a observé une propension d'augmentation de la protéine LC3. La conversion de LC3-I en LC3-II s'est produite dans les cellules HeLa, mais aussi dans les cellules spermatozoïdes de souris (Zhang *et al.*, 2012). L'analyse de la protéine LC3 est utilisée pour observer l'avancement de l'autophagie en raison de son implication obligatoire dans la formation de l'autophagosome (Eskelinen, 2008; Parzych et Klionsky, 2014) et de sa conservation chez les différentes espèces de mammifères. Nos résultats préliminaires concordent avec la littérature puisque nous avons constaté l'activation de l'autophagie lors d'une hyperthermie à 42 °C. En effet, nos résultats ont montré une tendance à l'augmentation des formes clivées des protéines autophagiques Bécline-1 et ATG5. En outre, une augmentation des formes natives des protéines Bécline-1 et ATG5 a déjà été démontrée lors d'un choc thermique à 42 °C (Kassis *et al.*, 2021).

Ayant démontré une tendance à l'activation de l'autophagie, nous avons voulu confirmer l'activation du second mécanisme : l'apoptose. Effectivement, la mort cellulaire par l'apoptose

peut être générée dans les cellules en fonction du temps et de la durée du choc thermique (Bettaieb *et al.*, 2013). Lors de l'apoptose cellulaire induite par un traitement avec l'hyperthermie, on peut y observer l'activation des caspases, l'activation de protéines liées à la mort cellulaire et la diminution du potentiel membranaire mitochondrial. Comme attendu, nous avons remarqué l'activation de la caspase initiateur 9 et de la caspase effectrice 3 à 42 °C.

À propos des protéines pro-apoptotiques, nous avons ciblé les protéines BAX et cytochrome C lors d'un choc thermique. Selon la littérature, la protéine BAX migre du cytosol vers la mitochondrie chez les cellules CHO (Cellules d'ovaire de hamster : *Cricetulus griseus*), les cellules HeLa (Bettaieb et Averill-Bates, 2005) et les cellules HUVEC (Gu *et al.*, 2015). Cette migration permettra à BAX d'activer la voie intrinsèque de l'apoptose par la mitochondrie. Outre BAX, la protéine BAD se voit déphosphorylée en sa position S136 (Schurmann *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2013) pour permettre son activation par les phosphatases. À la suite de son activation, BAD migre du cytosol vers la mitochondrie (Wolter *et al.*, 1997). Cette migration permet la libération de BCL-xL puisque BAD y est liée par son domaine BH3 (Danial, 2008; Klumpp et Krieglstein, 2002). Enfin, cytochrome C est libérée hors de la mitochondrie pour se trouver dans le cytosol. Effectivement, la protéine cytochrome C est un précurseur de l'apoptose par la mitochondrie. Cytochrome C se retrouve libéré de la mitochondrie dans le cytosol à la suite de l'activation d'un stimulus apoptotique (Garrido *et al.*, 2006). Nos résultats ont montré une tendance à l'augmentation des protéines BAX et BAD et à l'augmentation significative de cytochrome C dans le cytosol.

Concernant le potentiel membranaire mitochondrial, il peut être utilisé pour déterminer la santé des mitochondries. Il se définit comme une variation en ions entre les deux membranes de la mitochondrie. Cette variation est influencée par la production et l'hydrolyse d'ATP (Zorova *et al.*, 2018). Une variation dans le potentiel membranaire mitochondrial ponctuel n'est pas néfaste pour les mitochondries ; par contre, une variation continue causera des dommages irréversibles pouvant mener à la mort cellulaire (Zorov *et al.*, 1992). Certaines études ont montré qu'un choc thermique cause la diminution du potentiel membranaire mitochondrial (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Lors de l'utilisation de cellules neuronales de rat, une dépolarisation a été observée à la suite d'un choc thermique à 43 °C (White *et al.*, 2012). Une autre étude réalisée avec des cellules U937 a montré de dépolarisation lors d'une hyperthermie à 44 °C (Li *et al.*, 2001). Ces recherches

confirment qu'il est possible d'observer de dépolariation de la membrane mitochondriale soutenue dans les cellules lors d'un choc thermique.

L'activation de l'autophagie et l'apoptose dès les premières 15 minutes du choc thermique sous-entendent que les deux voies auraient lieu de manière simultanée pour les événements précoces de l'apoptose. L'activation simultanée de l'apoptose et l'autophagie s'explique de deux façons. Tout d'abord, lors d'une analyse par immunobuvardage de type Western, l'ensemble des cellules (mortes ou vivantes) exposées à un choc thermique sont analysées. Cependant, ce n'est pas l'ensemble des cellules qui survivent au choc thermique en activant l'autophagie. Certaines cellules plus sensibles activeront la mort par apoptose. Ainsi, on ne peut distinguer les cellules autophagiques versus apoptotiques dans un mélange de cellules lors d'une analyse par immunobuvardage. Cela va causer la détection simultanée de protéines liées à l'apoptose et l'autophagie. La seconde explication découle du fait que l'apoptose serait activée en simultané avec l'autophagie. Certaines protéines de l'autophagie, telles que les protéines BCL-xL ou BCL-2, inhibent les protéines de l'apoptose lors des débuts du traitement avec l'hyperthermie. Cette répression permettrait de favoriser le maintien de la survie cellulaire, ce qui générerait de l'autophagie dans les premières minutes suivies de la mort par l'apoptose lors de perduration du choc thermique. Subséquemment, aux alentours de 60 minutes à 42 °C, le stress prolongé est trop fort et la survie cellulaire ne peut être maintenue, causant alors l'activation de l'apoptose. Cette activation mènera à la phase exécutive de l'apoptose. Ce second raisonnement explique l'atteinte plus tardive du maximum d'expression de BAX pour transloquer à la mitochondrie et permettre la formation de canaux privilégiant la libération de protéines liées à la mort cellulaire telles que cytochrome C, SMAC, AIF ou Endonucléase G.

Pour conclure, nous avons observé l'activation simultanée de l'autophagie et l'apoptose dès les 15 premières minutes du choc thermique à 42 °C. Ce que nous pourrions définir est que le moment de transition entre ces deux voies lors d'un choc thermique a lieu aux alentours de 45 à 60 minutes à la suite de la diminution de l'autophagie.

4.4 La transition vers l'apoptose : la protéine ATG5

4.4.1 Les effets de l'hyperthermie sur l'expression et le clivage d'ATG5

À la suite de la confirmation de la période de transition entre l'autophagie et l'apoptose aux alentours de 45 à 60 minutes, nous pouvons maintenant nous consacrer à la réaction de la protéine ATG5 lors de ce moment de transition. Selon d'autres études, la protéine ATG5 se voit clivée lors de condition de traitements chimiques menant à la mort cellulaire. En effet, le clivage d'ATG5 avait déjà été démontré auparavant à l'aide des cellules Jurkat traitées à la l'anti-CD95 (protéine Fas) et des cellules H4 traitées à la Bay K-8644. Ici, nous voulions démontrer qu'un choc thermique à 42 °C est capable de générer ce clivage et que ce dernier est produit par des protéases. Le fait de confirmer le clivage d'ATG5 lors d'un traitement avec l'hyperthermie n'avait pas encore été fait auparavant. Ce résultat permet d'apporter une meilleure compréhension du rôle de la protéine ATG5 dans la cellule lors d'un choc thermique.

À notre avis, l'utilisation du choc thermique est mieux pour certains traitements, car il est moins invasif sur le corps que l'ajout de molécule chimique. En d'autres termes, le corps et les cellules saines peuvent plus facilement se réparer à la suite d'un traitement thermique que d'un traitement chimique puisqu'une hausse thermique est naturel lors de la maladie. Donc, une meilleure compréhension de son mode d'action se révèle essentielle si l'on désire pouvoir utiliser cette méthode comme traitement à son plein potentiel.

Pour élucider le mécanisme de fonctionnement d'ATG5, nous avons cherché à identifier les protéases capables de tronquer ATG5. Yousefi et ses collègues ont démontré que la protéine ATG5 a été clivée avec la protéase calpaine (Yousefi *et al.*, 2006). Une autre étude a montré la présence d'ATG5 clivée chez les cellules H4 à la suite d'un traitement à la Bay K-8644 (Xia *et al.*, 2010). La Bai K-8644 est une molécule capable d'activer les canaux calciques de type L. Dans ces deux études, la protéine ATG5 clivée a joué un rôle anti-autophagique. Selon Yousefi et ses collègues, la protéine ATG5 était uniquement clivée par calpaine (cellules HeLa) et il y avait une absence de clivage par les caspases 3, 6, 7, 8 et 9 in vitro (Yousefi *et al.*, 2006). Cependant, une autre étude réalisée de manière similaire à la nôtre, soit l'ajout d'inhibiteurs de caspases 3, 6, 8, 9 et 10 avec des cellules de mélanomes, a montré le clivage d'ATG5 par les caspases énumérées précédemment (You *et al.*, 2013). Pour ce faire, leurs cellules étaient préalablement traitées dans un milieu sans

arginine et l'ajout de TRAIL comme activateur (molécule capable de lier les récepteurs de la mort). Nos résultats, dans l'ensemble, corrélaient davantage avec ceux des cellules mélanomes. La différence avec les résultats de Yousefi peut s'expliquer par la méthode utilisée pour le traitement sur les cellules et l'utilisation de type cellulaire différent. En effet, dans l'étude de Yousefi et ses collègues, ils ont mis la protéine ATG5 avec les caspases dans une solution pour analyser la capacité des caspases à cliver la protéine ATG5.

L'activation de la caspase 9 lors du stress thermique chez les cellules HeLa concorde avec son implication précoce dans l'initiation de l'apoptose (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Elmore, 2007; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Il a été démontré par différentes études que la caspase 9 est activée lors d'un stress thermique chez les cellules Jurkat (à 44 °C) (Shelton *et al.*, 2010), les cellules HUVEC (à 43 °C) (Gu *et al.*, 2014) et les cellules HeLa (42 à 43 °C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Kassis *et al.*, 2021). Outre les études portant sur la caspase 9, l'étude de la caspase 4 a également été faite. Il a été observé que la caspase 4 joue un rôle dans le mécanisme de l'inflammation (Choi, 2018) et qu'elle a une implication dans l'activation de l'apoptose par la voie du réticulum endoplasmique (Bettaieb et Averill-Bates, 2015; Pallepati et Averill-Bates, 2011). L'implication de la caspase 4 pour cliver ATG5 n'avait pas été démontrée précédemment. Enfin, la dernière protéase est calpaine ; lors d'un choc thermique, elle est impliquée dans l'activation de la voie de l'apoptose par le réticulum endoplasmique (Pallepati et Averill-Bates, 2010). Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Yousefi *et al.* (Yousefi *et al.*, 2006). Par conséquent, on peut émettre l'hypothèse que la protéine calpaine a tendance à effectuer le clivage d'ATG5. À l'aide des résultats de clivage, nous avons conclu que lors d'un choc thermique à 42 °C, il y avait une tendance de clivage de la protéine ATG5 ; ce clivage pourrait être causé par les caspases 4, 9 et la protéase calpaine.

4.4.2 L'incidence d'ATG5 clivée sur la protéine anti-apoptotique BCL-xL et sur la mitochondrie

Nous avons voulu déterminer l'impact d'ATG5 sur les protéines anti-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques et sur la mitochondrie. Yousefi et ses collègues ont démontré une interaction entre ATG5 clivée et BCL-xL lors d'un traitement apoptotique à la staurosporine (inhibiteur de protéines kinase) chez les cellules Jurkat (Yousefi *et al.*, 2006). Cette découverte revêtait une importance considérant l'implication de BCL-xL, les cellules murines ayant mieux résisté. BCL-xL est une

protéine de la famille de BCL2 et elle est considérée comme ayant une implication dans la survie cellulaire (Czabotar et al., 2014 ; Marino et al., 2014 ; Mukhopadhyay et al., 2014). Effectivement, lors d'un choc thermique à 42 °C durant 1 h et la surexpression de BCL-xL, les cellules murines ont mieux résisté à la chaleur que les cellules non traitées (Robertson *et al.*, 1997). Pour permettre cette survie, parmi ses nombreuses fonctions, BCL-xL interagit avec les protéines BAX et BAK, pour inhiber leurs activités pro-apoptotiques (Michels *et al.*, 2013). Par conséquent, l'inhibition de BCL-xL affecte négativement la survie des cellules. La tendance à l'augmentation de la protéine BCL-xL dès les 15 premières minutes du choc thermique aide à l'inhibition de l'apoptose par l'interaction avec les protéines apoptotiques telles que BAX et BAK. En l'absence de stress, la protéine BCL-xL se retrouve majoritairement à proximité de la mitochondrie. Elle peut également se trouver dans le cytosol (Popgeorgiev *et al.*, 2018). Cependant, à la suite de l'activation de BAX et de sa séquestration avec BCL-xL, le complexe BAX-BCL-xL migre vers le cytosol, jusqu'à la dissociation du complexe (Popgeorgiev *et al.*, 2018). L'augmentation simultanée de BCL-xL et de BAX dans le cytosol lors du choc thermique suggère un rôle inhibiteur de BCL-xL. Par la suite, le choc thermique tend à colocaliser BCL-xL avec la protéine ATG5 lors du moment de transition entre l'autophagie et l'apoptose. Considérant la tendance de colocalisation entre BCL-xL et ATG5 clivée, nous supposons que l'interaction entre la protéine BCL-xL et ATG5 clivée inhibe l'action anti-apoptotique de la protéine BCL-xL, ce qui permet de suggérer que la protéine ATG5 tronquée pourrait être en mesure d'interagir avec BCL-xL lors d'un choc thermique et que cela a lieu lors du moment de transition entre l'autophagie et l'apoptose.

Outre son interaction avec la protéine BCL-xL, la protéine ATG5 clivée migre du cytosol vers la mitochondrie. Similairement aux résultats de Yousefi et al. (Yousefi *et al.*, 2006), nous avons observé que lors d'un choc thermique à 42 °C, il y a une tendance à la translocation d'ATG5 clivée à la mitochondrie lors de l'activation de l'apoptose. De plus, ils ont montré *in vitro* le relâchement de cytochrome C lors de l'exposition de mitochondrie à ATG5 clivée. Comparativement à cet article, il y a eu le relâchement de cytochrome C et une tendance à la diminution de l'intégrité mitochondriale dans les cellules HeLa. La mitochondrie joue un rôle crucial dans l'intégrité cellulaire (Giacomello *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2022). Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'intégrité de la mitochondrie (Zorova *et al.*, 2018). Il est possible d'observer l'accumulation de Ca²⁺, la variation du potentiel membranaire mitochondrial ou la libération de protéines telles que

cytochrome C ou Omi. La protéine Omi est une protéase impliquée dans le maintien de l'homéostasie de la mitochondrie. Selon la littérature, la protéine cytochrome C et la tendance à la dépolarisation de la membrane mitochondriale ont lieu lors d'un choc thermique à des températures entre 42 à 45 °C (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Conséquemment, les données obtenues dans cette étude concernant la dépolarisation de la membrane mitochondriale et le relâchement de cytochrome C confirme des résultats de l'étude de Bettaieb et Averill-Bates, 2005. Finalement, il est à noter que la tendance à la dépolarisation de la membrane mitochondriale et à la libération de cytochrome C coïncide dans le temps avec la variation d'ATG5 clivée dans la cellule.

Il est intéressant de remarquer la coïncidence dans le temps de l'augmentation d'ATG5 clivée, le relâchement de cytochrome C et la dépolarisation de la membrane mitochondriale lors d'un choc thermique à 42 °C. Étant donné que la protéine ATG5 clivée ne tend pas à migrer vers la mitochondrie dès les 15 premières minutes du choc thermique, elle ne peut jouer un rôle dans la dépolarisation et le relâchement de cytochrome C dès les premières minutes du choc thermique. Cependant, ATG5 clivée pourrait être impliquée dans le maintien de la dépolarisation et la libération de cytochrome C vers le cytosol, qui sont des événements précoces dans l'activation de l'apoptose. Par conséquent, ATG5 clivée pourrait jouer un rôle dans l'activation irréversible de l'apoptose par la mitochondrie.

En résumé, le choc thermique à 42 °C a tendance à générer le clivage d'ATG5. Le fait que ATG5 tronquée tend à diminuer au travers du temps, plus précisément lorsque l'apoptose est entamée, accentue l'idée selon laquelle la protéine joue un rôle dans l'activation de l'apoptose et la progression vers la phase d'exécution. Parallèlement, ATG5 tronquée tend à migrer dans la mitochondrie et elle interagit avec la protéine BCL-xL, menant à l'inhibition de cette protéine anti-apoptotique, en favorisant l'activation de l'apoptose.

4.4.3 Perspectives d'avenir

La compréhension du mécanisme d'action d'ATG5 ne demeure pas complètement résolue ; d'autres expérimentations pourraient être exécutées dans l'objectif de finaliser la compréhension et l'ampleur de l'implication d'ATG5 lors de l'apoptose.

L'une des analyses qui pourraient être effectuées serait l'immunoprécipitation d'ATG5 clivée et de ses interacteurs. Par cette méthode, on pourrait confirmer l'interaction avec BCL-xL et potentiellement d'autres protéines telles que celles à la surface de la mitochondrie pour permettre sa translocation.

Outre l'importance de l'interactome, il serait intéressant de déterminer l'impact de l'ajout de la protéine clivée chez des cellules non mises en condition thermique pour voir s'il y aura une induction de l'activation de l'apoptose. Il serait d'autant plus pertinent de faire ce même test, mais avec des cellules mises en condition hyperthermique pour déterminer si l'activation de l'apoptose sera devancée. Selon les résultats obtenus précédemment, l'activation ne devrait pas être affectée dans le temps, mais plutôt en intensité étant donné que la protéine joue un rôle stabilisateur plutôt qu'initiateur.

Parallèlement au test d'ajout d'ATG5 clivée, il faudrait effectuer une analyse où la protéine se voit inhibée (ex. siRNA) lors d'un choc thermique. Selon les résultats que nous avons obtenus actuellement, nous pouvons supposer que l'activation de l'apoptose aura lieu, mais cette dernière pourrait être amoindrie.

En résumé, l'ajout de ces analyses permettra d'évincer tous les doutes concernant le mécanisme d'action de la protéine lors d'une hyperthermie.

4.5 Le passage vers l'activité apoptotique de Bécline-1

4.5.1 L'influence de l'hyperthermie sur Bécline-1

Outre ATG5, Bécline-1 est une autre protéine qui, lorsque clivée, acquiert une nouvelle fonctionnalité. Nous avons comme objectif de déterminer si l'hyperthermie génère le clivage de Bécline-1 ; nous avons supposé que ce clivage soit généré par les caspases et que la protéine Bécline-1 inhiberait des protéines anti-apoptotiques. De plus, nous avons voulu démontrer le clivage de la protéine Bécline-1 et sa translocation vers la mitochondrie lors d'un choc thermique à 42 °C.

La protéine Becline-1 a été plus difficile à analyser que la protéine ATG5. L'expression a été plus laborieuse à détecter. Cette difficulté pourrait provenir du temps choisi, de la méthode utilisée et de la qualité de l'anticorps. Effectivement, nous avons obtenu de meilleurs résultats en observant les données par microscopie confocale.

Selon la littérature, la protéine Bécline-1 native est impliquée dans l'autophagie lors d'un choc thermique (Eskelinen, 2008; Tran *et al.*, 2021). Elle permet le recrutement d'autres protéines pour former le complexe PI3K III lors de l'initiation de l'autophagosome. Une recherche effectuée sur des cellules HeLa lors d'un choc thermique à 42 °C a montré une augmentation de l'expression protéique de Bécline-1 (Kassis *et al.*, 2021). D'autres études réalisées dans d'autres conditions telles que hypoxiques, manque de nutriments, ajout de TRAIL, chimiothérapie, irradiation ou immunothérapie ont dévoilé l'aspect anti-apoptotique de la protéine. Nous avons observé une tendance à l'augmentation de la protéine clivée lors d'un choc thermique à 42 °C, ce qui concorde avec deux études différentes : la première concerne une recherche faite par Wirawan et ses collègues démontrant qu'un traitement de cellules de la moelle osseuse dans un milieu sans interleukine 3 a généré le clivage de la protéine Bécline-1 (Wirawan *et al.*, 2010). La seconde étude a été menée sur des cellules de mélanomes et elle a exposé le clivage de la Bécline-1 lors d'un traitement à TRAIL et dans un milieu sans arginine (You *et al.*, 2013). Par conséquent, les résultats de ces recherches ont confirmé que certains traitements sont capables de stimuler le clivage de la protéine Bécline-1. Dans notre étude, le choc thermique montre une tendance à stimuler le clivage de Bécline-1.

Selon la théorie, la protéine BCN1 serait clivée par les caspases 3, 6 et 8. Wirawan et ses collègues ont démontré qu'en solution, la protéine BCN1 serait clivée par les caspases 3, 7 et 8 (Wirawan *et al.*, 2010). Pareillement à ATG5, nous avons tenté de déterminer l'impact de l'ajout d'inhibiteur de caspases 2, 3, 4, 8 et 9 sur l'expression de Béclin-1 lors d'un choc thermique à 42 C. Malheureusement, aucun de nos résultats ne s'est avéré concluant. Dans l'éventualité de confirmer le clivage de Bécline-1 dans les études futures, une approche similaire à Wirawan, c'est-à-dire la mise en culture de la protéine native avec les inhibiteurs de caspases, pourrait être préconisée.

En effet, outre son clivage, Wirawan a démontré la translocation du fragment C-terminale, Bécline-1-C, vers la mitochondrie lors d'un traitement apoptotique induit par le retrait de l'interleukine-3.

À la suite de la relocalisation à la mitochondrie, la protéine Bécline-1 clivée a permis le relâchement des protéines (cytochrome C et Omi protéine inhibant les IAP) lors du traitement d'extrait de mitochondrie avec Bécline-1 clivée. Similairement, l'induction d'un choc thermique pourrait stimuler la translocation de la Bécline-1 clivée vers la mitochondrie.

Étant donné que la protéine Bécline-1 a un domaine BH3 et qu'elle a transloqué à la mitochondrie, elle pourrait interagir pour réguler des protéines de la famille BCL2. Effectivement, il a été démontré que la protéine Bécline-1 pouvait interagir avec les protéines BCL2, BCL-xL, Mcl-1 et BCL-B (Tran *et al.*, 2021). Par conséquent, si la Bécline-1 clivée est impliquée dans l'activation de l'apoptose, on pourrait éventuellement observer l'interaction de Bécline-1 clivée avec ces protéines.

4.5.2 Perspectives d'avenir

Nous n'avons pas montré que Becline-1 clivée active l'apoptose. Par conséquent, il faudrait effectuer davantage d'analyse pour confirmer l'impact apoptotique de Bécline clivée sur la cellule. Pour débiter, il faudrait, comme mentionné plus haut, déterminer quelles sont les protéines permettant le clivage de Becline-1. Par la suite, il faudrait déterminer les protéines d'interaction avec Bécline-1.

Une fois l'impact de la protéine clivée confirmé sur l'apoptose, il faudrait ensuite, similairement à ATG5, observer l'impact de l'ajout de la protéine clivée dans les cellules autant que l'impact de l'inhibition de la protéine clivée sur les cellules lors d'un choc thermique. Nous envisageons d'inhiber le clivage de la protéine en produisant une protéine Bécline-1 recombinante qui ne pourra pas être clivée. Effectivement, si la Bécline-1 est impliquée dans l'activation de l'apoptose, l'ajout de la protéine clivée générerait l'augmentation de l'activation. Suivant ce raisonnement, l'inhibition de la protéine clivée amoindrirait l'activation de l'apoptose.

Pour conclure, l'hyperthermie à 42 °C tend à causer le clivage de la protéine Bécline-1. Bien que nous n'ayons pas pu identifier les cliveurs de manière précise, nous envisageons les caspases 3, 4, 8 et 9. À la suite de son clivage, la protéine Bécline-1 migrerait vers la mitochondrie où elle pourrait interagir avec des protéines de la famille BCL2 pour inhiber l'autophagie ou activer l'apoptose.

Dans l'objectif de confirmer l'action apoptotique de Bécline-1 clivée, il faudrait terminer les analyses supplémentaires.

4.6 L'incidence de la thermotolérance sur les protéines ATG5 et Bécline-1

La thermotolérance est l'acquisition d'une résistance à une nouvelle exposition à l'hyperthermie. Le dernier objectif était de déterminer l'impact de la thermotolérance sur le processus de clivage d'ATG5 et Bécline-1 lors d'un choc thermique. Pour ce faire, plusieurs mécanismes cellulaires vont être enclenchés ; parmi ces processus figurent l'activation de la voie HSF1 qui exprimera les protéines HSP (Ahmed *et al.*, 2020), la voie de la protéine Nrf2 (Glory et Averill-Bates, 2016), l'augmentation des antioxydants (Pallepati et Averill-Bates, 2010) et une augmentation de l'autophagie (Kassis *et al.*, 2021).

Certaines études ont analysé le fonctionnement des voies de signalisation de l'apoptose et de l'autophagie lors d'une thermotolérance. Conséquemment, concernant l'autophagie, des cellules thermotolérantes contiennent une augmentation de l'expression de protéines autophagiques : ATG5-ATG12, Bécline-1 et LC3 (Kassis *et al.*, 2021; Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). Cela tend à confirmer l'augmentation d'ATG5 native que nous avons détectée dans les cellules thermotolérantes. De plus, ils ont démontré que l'autophagie était maintenue plus longtemps dans les cellules thermotolérantes, causant le retardement de l'apoptose (Kassis *et al.*, 2021). L'expression des protéines ATG5 et Bécline-1 clivée dans les cellules thermotolérantes n'avait pas été analysée auparavant. Cependant, considérant la prolongation de l'autophagie et le retardement de l'apoptose, nous pouvions supposer que le phénomène similaire aurait lieu concernant ATG5 et Bécline-1 clivée. Néanmoins, la thermotolérance n'a eu aucun impact sur le clivage d'ATG5, la translocation à la mitochondrie ou l'interaction avec BCL-xL. Pareillement à ATG5, la thermotolérance n'a pas d'incidence sur la protéine Bécline-1 clivée, et ce, autant sur le plan de l'expression que du point de vue de la colocalisation à la mitochondrie. Nous pouvons supposer que cela est dû à un retard dans l'activation de l'apoptose. Considérant que nous avons uniquement examiné ces phénomènes à des temps précoces, il serait intéressant de voir l'impact de la thermotolérance à des temps plus longs. Cependant, le relargage de Cytochrome C a été diminué lors de la thermotolérance. Effectivement, certaines protéines telles que les HSP sont capables de réprimer des processus pro-apoptotiques chez les cellules thermotolérantes, tels que le relargage

de cytochrome C et la dépolarisation des mitochondries (Bettaieb *et al.*, 2013). Pour conclure, la thermotolérance n'affecte pas la transition entre autophagie et apoptose, mais inhibe les événements pro-apoptotiques tels que le relargage de cytochrome C.

CONCLUSION

L'hyperthermie de l'ordre de 39-40 °C est un mécanisme naturel de défense du corps contre les infections que nous utilisons de nos jours. De plus, l'hyperthermie à plus de 42 °C localisée est actuellement utilisée comme traitement complémentaire à la chirurgie, à la chimiothérapie ou à la radiothérapie contre le cancer. Cette méthode permet une meilleure destruction de cellules cancéreuses grâce à son effet cytotoxique. Une compréhension générale des mécanismes de survie et mort cellulaire a été découverte lors des dernières décennies. Cependant, beaucoup demeure à découvrir. Ainsi, dans cette recherche, nous avons ciblé la compréhension des mécanismes impliqués lors de la survie et la mort cellulaire durant un choc thermique à 42 °C. Nous avons analysé l'impact du choc sur la protéine ATG5 et qu'un choc thermique tend à générer le clivage de la protéine par les protéases caspase 9, 4 et calpaine. À la suite de son clivage, ATG5 clivée tend à transloquer à la mitochondrie où elle permettra l'activation de l'apoptose et le relâchement de cytochrome C, tout en liant et inhibant BCL-xL. En plus de la protéine ATG5, nous avons choisi la protéine Bécline-1. Cette dernière tend à être clivée lors d'un choc thermique et elle pourrait naviguer du cytosol vers les mitochondries.

Malgré les tendances, ces résultats permettent de mieux comprendre l'implication d'ATG5 et Bécline-1 clivée dans la transition entre l'autophagie et l'apoptose. Auparavant, l'aspect apoptotique de ces deux protéines n'avait pas été démontré lors d'une hyperthermie. Nous avons amené une nouvelle possibilité de voie de signalisation qui active l'apoptose lors d'un choc thermique, mais d'autres investigations s'avèrent nécessaires. Nos résultats préliminaires combinés à ceux des autres études accentuent l'idéologie selon laquelle le clivage d'ATG5 et Bécline-1 et leurs aspects apoptotiques sont présents lors de différents stimuli apoptotiques et différents types cellulaires.

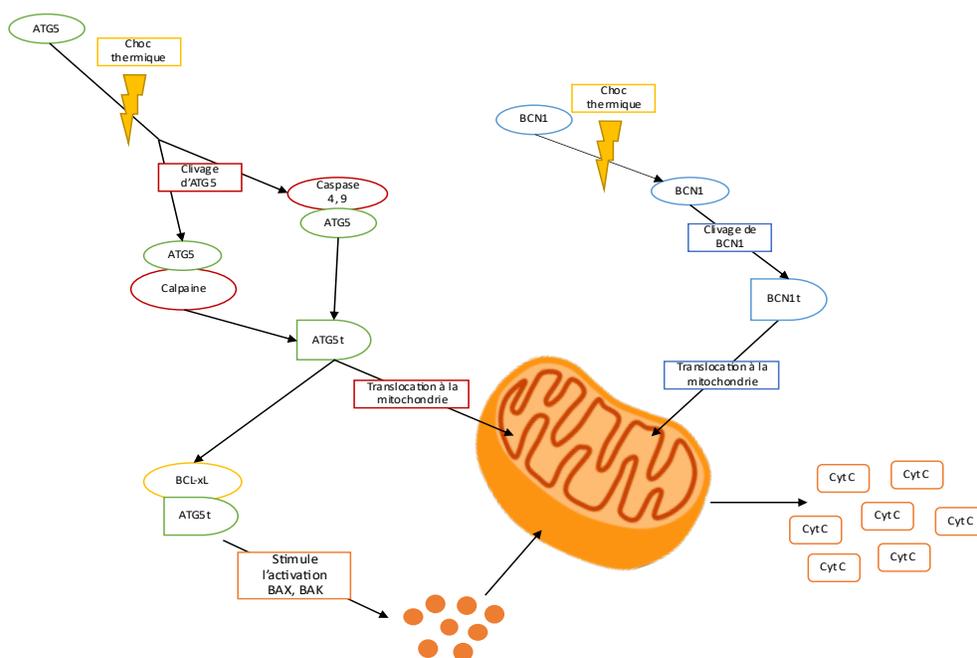


Figure 4.1 Mécanistique d'ATG5 et Bécline-1 lors d'un choc thermique à 42 °C

La protéine ATG5 est clivée par les caspases 4, 9 et calpaïne. La version clivée migre du cytosol vers la mitochondrie tout en interagissant avec BCL-xL. Cette interaction favorise l'activation de protéines pro-apoptotiques telles que BAX et BAK. La protéine Bécline-1 est clivée lors d'un choc thermique et elle migre vers la mitochondrie. Les protéines ATG5 et BCN1 clivée pourraient être impliquées dans le relâchement de cytochrome C.

Cependant, certaines clarifications restent à faire. L'implication d'ATG5 clivée à la mitochondrie n'est pas complètement résolue. Il faudrait déterminer si ATG5 clivée peut avoir des interactions avec des récepteurs mitochondriaux pouvant permettre le relâchement d'autres protéines apoptotiques tels que SMAC, AIF ou endonucléase G. Par conséquent, il faudrait déterminer si ATG5 clivée a des interactions avec des protéines à la surface mitochondriale. À la suite de ces résultats, nous pourrions confirmer l'implication d'ATG5 clivée à la mitochondrie. À propos de Bécline-1, nous devons approfondir les recherches et déterminer quelles sont les protéases générant son clivage. Il faudrait aussi déterminer ses interacteurs protéiques. Outre ATG5 et Bécline-1, l'action d'une autre protéine (ATG12) lors d'hyperthermie serait pertinente à analyser. Il serait intéressant de déterminer si ATG12 a un impact sur l'activation de l'apoptose lors d'un choc thermique. Des recherches ont montré qu'en l'absence du complexe ATG12-ATG3 (Radoshevich

et al., 2010), des cellules ont obtenu une résistance à l'apoptose par la mitochondrie. De plus, la protéine ATG12 jouerait un rôle d'inhibition sur des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2, soit BCL-2 et MCL-1 (Rubinstein *et al.*, 2011). Concernant la protéine MCL-1, elle est impliquée dans la survie cellulaire chez les cellules et elle peut être la cause d'initiation de tumeurs. Actuellement, des recherches de cibles thérapeutiques contre MCL-1 sont en cours pour le traitement contre le cancer (Kelly et Strasser, 2020). Considérant que l'hyperthermie est un traitement contre le cancer, une meilleure compréhension de l'implication de MCL-1 et ATG12 serait intéressante pour trouver un traitement potentiel combiné.

Cette recherche nous a permis de montrer que l'apoptose peut être enclenchée par la conversion des protéines autophagiques en mode pro-apoptotiques lors d'un choc thermique induit à 42 °C. Ces informations permettent de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques pour amorcer la mort cellulaire dans les cellules lors des traitements anticancéreux.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, K., Zaidi, S. F., Mati Ur, R., Rehman, R. et Kondo, T. (2020). Hyperthermia and protein homeostasis: Cytoprotection and cell death. *Journal of Thermal Biology*, 91, 102615. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102615>
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. (2005). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 205(1), 47-57. <https://doi.org/10.1002/jcp.20386>
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. (2015). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(1), 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.016>
- Bettaieb, A., Wrzal K, P. et Averill-Bates, D. (2013). Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. Dans *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. Intechopen. <https://doi.org/10.5772/55795>.
- Bull, J. M. C. (2018). A review of immune therapy in cancer and a question: can thermal therapy increase tumor response? *International Journal of Hyperthermia*, 34(6), 840-852. <https://doi.org/10.1080/02656736.2017.1387938>
- Chalah, A. et Khosravi-Far, R. (2008). The mitochondrial death pathway. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 615, 25-45. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5_3
- Choi, S. (2018). *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4>
- Crezee, J., Franken, N. A. P. et Oei, A. L. (2021). Hyperthermia-Based Anti-Cancer Treatments. *Cancers (Basel)*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/cancers13061240>
- Crile, G., Jr. (1963). The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. *Cancer Research*, 23, 372-380. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14023863>
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. et Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 15(1), 49-63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Danial, N. N. (2008). BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S53-70. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.44>
- Decker, W. K. et Safdar, A. (2009). Bioimmunoadjuvants for the treatment of neoplastic and infectious disease: Coley's legacy revisited. *Cytokine and Growth Factor Review*, 20(4), 271-281. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.07.004>

- Dunn, K. W., Kamocka, M. M. et McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal Physiology Cell Physiology*, 300(4), C723-742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Eskelinen, E.-L. (2008). New Insights into the Mechanisms of Macroautophagy in Mammalian Cells. Dans (Academic Press éd., vol. 266, p. 207-247). [https://doi.org/10.1016/s1937-6448\(07\)66005-5](https://doi.org/10.1016/s1937-6448(07)66005-5).
- Fairlie, W. D., Tran, S. et Lee, E. F. (2020). Crosstalk between apoptosis and autophagy signaling pathways. *International Review of Cell Molecular Biology*, no 352, 115-158. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.01.003>
- Gabaldon, T. (2021). Origin and Early Evolution of the Eukaryotic Cell. *Annual Review of Microbiology*, 75, 631-647. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062213>
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C. et Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differentiation*, 13(9), 1423-1433. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C. et Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 21(4), 204-224. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>
- Glory, A. et Averill-Bates, D. A. (2016, Oct). The antioxidant transcription factor Nrf2 contributes to the protective effect of mild thermotolerance (40 degrees C) against heat shock-induced apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 99, 485-497. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.032>
- Gu, Z. T., Li, L., Wu, F., Zhao, P., Yang, H., Liu, Y. S., Geng, Y., Zhao, M. et Su, L. (2015). Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent p53, Ca(2+) dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Scientific Reports*, 5, 11497. <https://doi.org/10.1038/srep11497>
- Gu, Z. T., Wang, H., Li, L., Liu, Y. S., Deng, X. B., Huo, S. F., Yuan, F. F., Liu, Z. F., Tong, H. S. et Su, L. (2014). Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell. *Scientific Reports*, 4, 4469. <https://doi.org/10.1038/srep04469>
- Habash, R. W. Y. (2018). Therapeutic hyperthermia. *Handbook of Clinical Neurology*, 157, 853-868. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64074-1.00053-7>
- Hansen, M., Rubinsztein, D. C. et Walker, D. W. (2018, Sep). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(9), 579-593. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>

- Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T. et Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), 1327-1337. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-08-0447>
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T. et Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 18(4), 571-580. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
- Kassis, S., Grondin, M. et Averill-Bates, D. A. (2021). Heat shock increases levels of reactive oxygen species, autophagy and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(3), 118924. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118924>
- Kelly, G. L. et Strasser, A. (2020). Toward Targeting Antiapoptotic MCL-1 for Cancer Therapy. *Annual Review of Cancer Biology*, 4(1), 299-313. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033510>
- Khalid, N. et Azimpouran, M. (2022). Necrosis. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491559>.
- Klumpp, S. et Krieglstein, J. (2002). Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Current Opinion in Pharmacology*, 2(4), 458-462. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(02\)00176-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(02)00176-5)
- Li, F. J., Kondo, T., Zhao, Q. L., Tanabe, K., Ogawa, R., Li, M. et Arai, Y. (2001). Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by a free radical initiator, 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, in human histiocytic lymphoma U937 cells. *Free Radical Research*, 35(3), 281-299. <https://doi.org/10.1080/10715760100300821>
- Lin, M. G. et Hurley, J. H. (2016, Apr). Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, no 39, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.02.010>
- Luo, S. et Rubinsztein, D. C. (2010). Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differentiation*, 17(2), 268-277. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.121>
- Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. et Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 15(2), 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>
- Maskey, D., Yousefi, S., Schmid, I., Zlobec, I., Perren, A., Friis, R. et Simon, H. U. (2013). ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy. *Nature Communications*, 4, 2130. <https://doi.org/10.1038/ncomms3130>
- Matoba, K. et Noda, N. N. (2021). Structural catalog of core Atg proteins opens new era of autophagy research. *Journal of Biochemistry*, 169(5), 517-525. <https://doi.org/10.1093/jb/mvab017>

- Michels, J., Kepp, O., Senovilla, L., Lissa, D., Castedo, M., Kroemer, G. et Galluzzi, L. (2013). Functions of BCL-XL at the Interface between cell death and metabolism. *International Journal of Cell Biology*, 2013, 705294. <https://doi.org/10.1155/2013/705294>
- Mikucki, M. E., Fisher, D. T., Ku, A. W., Appenheimer, M. M., Muhitch, J. B. et Evans, S. S. (2013). Preconditioning thermal therapy: flipping the switch on IL-6 for anti-tumour immunity. *International Journal of Hyperthermia*, 29(5), 464-473. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.807440>
- Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N. et Bhutia, S. K. (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, 19(4), 555-566. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0967-2>
- Nakamura, S. et Yoshimori, T. (2017). New insights into autophagosome-lysosome fusion. *Journal of Cell Science*, 130(7), 1209-1216. <https://doi.org/10.1242/jcs.196352>
- Nauts, H. C., Fowler, G. A. et Bogatko, F. H. (1953). A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study. *Acta Medica Scandinavica Suppl*, 276, 1-103. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13039964>
- Nguyen, H. Q., Zada, S., Lai, T. H., Pham, T. M., Hwang, J. S., Ahmed, M. et Kim, D. R. (2019). Calpain-dependent Beclin1 cleavage stimulates senescence-associated cell death in HT22 hippocampal cells under the oxidative stress conditions. *Neuroscience Letters*, 701, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.02.036>
- Oei, A. L., Vriend, L. E., Crezee, J., Franken, N. A. et Krawczyk, P. M. (2015). Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiation Oncology*, 10, 165. <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0462-0>
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D. (2010). Mild thermotolerance induced at 40 degrees 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. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.014>
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D. A. (2011). Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: protective role of mild heat preconditioning at 40 degrees C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(12), 1987-1999. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.07.021>
- Parzych, K. R. et Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460-473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Popgeorgiev, N., Jabbour, L. et Gillet, G. (2018). Subcellular localization and dynamics of the Bcl-2 Family of proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00013>

- Radoshevich, L., Murrow, L., Chen, N., Fernandez, E., Roy, S., Fung, C. et Debnath, J. (2010). ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell*, 142(4), 590-600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.018>
- Raouf, M., Zhu, C., Cisneros, B. T., Liu, H., Corr, S. J., Wilson, L. J. et Curley, S. A. (2014). Hyperthermia inhibits recombination repair of gemcitabine-stalled replication forks. *Journal of National Cancer Institute*, 106(8). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju183>
- Redza-Dutordoir, M. et Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(12), 2977-2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>
- Redza-Dutordoir, M. et Averill-Bates, D. A. (2021). Interactions between reactive oxygen species and autophagy: Special issue: Death mechanisms in cellular homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1868(8), 119041. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119041>
- Redza-Dutordoir, M., Kassis, S., Ve, H., Grondin, M. et Averill-Bates, D. A. (2016). Inhibition of autophagy sensitises cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis: Protective effect of mild thermotolerance acquired at 40 degrees C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(12), 3050-3064. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.015>
- Robertson, J. D., Datta, K. et Kehrer, J. P. (1997). Bcl-xL overexpression restricts heat-induced apoptosis and influences hsp70, bcl-2, and Bax protein levels in FL5.12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241(1), 164-168. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7782>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.014>
- Schuck, S. (2020). Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *Journal of Cell Science*, 133(17). <https://doi.org/10.1242/jcs.246322>
- Schurmann, A., Mooney, A. F., Sanders, L. C., Sells, M. A., Wang, H. G., Reed, J. C. et Bokoch, G. M. (2000). p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 453-461. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.2.453-461.2000>
- Shelton, S. N., Dillard, C. D. et Robertson, J. D. (2010). Activation of caspase-9, but not caspase-2 or caspase-8, is essential for heat-induced apoptosis in Jurkat cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40525-40533. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167635>
- Shen, K., Pender, C. L., Bar-Ziv, R., Zhang, H., Wickham, K., Willey, E., Durieux, J., Ahmad, Q. et Dillin, A. (2022). Mitochondria as cellular and organismal signaling hubs. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 38, 179-218. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120420-015303>

- Su, M., Mei, Y. et Sinha, S. (2013). Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. *Journal of Oncology*, 2013, 102735. <https://doi.org/10.1155/2013/102735>
- Sugahara, T., van der Zee, J., Kampinga, H. H., Vujaskovic, Z., Kondo, M., Ohnishi, T., Li, G., Park, H. J., Leeper, D. B., Ostapenko, V., Repasky, E. A., Watanabe, M. et Song, C. W. (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. <https://doi.org/10.1080/02656730701883675>
- Tran, S., Fairlie, W. D. et Lee, E. F. (2021). BECLIN1: Protein structure, function and regulation. *Cells*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/cells10061522>
- Tsapras, P. et Nezis, I. P. (2017). Caspase involvement in autophagy. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1369-1379. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.43>
- Wang, C. et Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review Genetic*, 43, 95-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134850>
- White, M. G., Saleh, O., Nonner, D., Barrett, E. F., Moraes, C. T. et Barrett, J. N. (2012). Mitochondrial dysfunction induced by heat stress in cultured rat CNS neurons. *Journal of Neurophysiology*, 108(8), 2203-2214. <https://doi.org/10.1152/jn.00638.2011>
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., Agostinis, P., Vanden Berghe, T., Lippens, S. et Vandenabeele, P. (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, e18. <https://doi.org/10.1038/cddis.2009.16>
- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. et Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 139(5), 1281-1292. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.5.1281>
- Xia, H. G., Zhang, L., Chen, G., Zhang, T., Liu, J., Jin, M., Ma, X., Ma, D. et Yuan, J. (2010). Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy*, 6(1), 61-66. <https://doi.org/10.4161/auto.6.1.10326>
- Yan, J., Xiang, J., Lin, Y., Ma, J., Zhang, J., Zhang, H., Sun, J., Danial, N. N., Liu, J. et Lin, A. (2013). Inactivation of BAD by IKK inhibits TNFalpha-induced apoptosis independently of NF-kappaB activation. *Cell*, 152(1-2), 304-315. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.021>
- You, M., Savaraj, N., Kuo, M. T., Wangpaichitr, M., Varona-Santos, J., Wu, C., Nguyen, D. M. et Feun, L. (2013). TRAIL induces autophagic protein cleavage through caspase activation in melanoma cell lines under arginine deprivation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 374(1-2), 181-190. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1518-1>

- 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. <https://doi.org/10.1038/ncb1482>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041412>
- Zhao, Y., Codogno, P. et Zhang, H. (2021). Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 22(11), 733-750. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00392-4>
- Zhao, Y., Gong, S., Shunmei, E. et Zou, J. (2009). Induction of macroautophagy by heat. *Molecular Biology Report*, 36(8), 2323-2327. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9451-4>
- Zonnenberg, C., Bueno-de-Mesquita, J. M., Ramlal, D. et Blom, J. D. (2017). Hypothermia due to Antipsychotic Medication: A Systematic Review. *Frontiers in Psychiatry*, 8, 165. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00165>
- Zorov, D. B., Kinnally, K. W. et Tedeschi, H. (1992). Voltage activation of heart inner mitochondrial membrane channels. *Journal Bioenergetic and Biomembranes*, 24(1), 119-124. <https://doi.org/10.1007/BF00769538>
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J. et Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>