

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA THERMO-DÉPENDANCE DE LA PRODUCTION DE DÉRIVÉS RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE ET LEUR
RÔLE DANS L'INDUCTION D'UNE RÉSISTANCE À LA CHALEUR NRF2-DÉPENDANTE

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

GEORGES HRAOUI

DÉCEMBRE 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse 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

Tout d’abord, je tiens à remercier Diana, ma directrice de recherche. Son soutien scientifique et ses conseils ont été essentiels à mon développement en tant que jeune scientifique. Ensuite, je voudrais remercier ma co-directrice, Sophie. Depuis qu'elle m'a accueillie pour un master en 2017, elle a ouvert de nombreuses portes, et je ne serais pas là où je suis aujourd'hui si elle n'avait pas vu mon potentiel il y a toutes ces années. Je voudrais également remercier ma mère, Gina, dont le soutien pendant mes 11 années d'université m'a permis de garder la tête sur les épaules. Son soutien dans toutes les situations a fait d'elle un pilier central de ma thèse. À ses côtés, je tiens à remercier mon père Roger, qui n'est plus parmi nous. Bien qu'il soit décédé, les valeurs qu'il m’a transmises, les leçons apprises et le temps passé ensemble seront toujours portés par moi tout au long de ma vie.

Je tiens à remercier les membres de mon laboratoire, Mélanie et Khadija, pour leur aide constante. Dès le moment où je suis entré dans le laboratoire sans aucune connaissance préalable en culture cellulaire, elles m’ont aidée à chaque fois que j’en avais besoin, et elles sont en partie la raison pour laquelle j’ai pu terminer ma thèse. Je souhaite remercier Stefano Bettinazzi, mon ancien mentor, qui m’a aidé à faire mes premiers pas en tant que scientifique. De ma vieille équipe à l’Université de Montréal, je tiens à remercier Jeremy, Rudy, Philip, Edith, Victoria, pour avoir supporté mes facéties et m’avoir soutenu pendant les moments les plus difficiles de mon parcours doctoral. Depuis le bureau où je suis actuellement en train d’écrire ceci, il y a trop de gens à remercier, mais je voudrais faire une mention spéciale à Meredith, Yannick, Anaïs, Pauline, Coralie, Fabrice, Fernanda, Sofia, Yann, Brit, Elizabeth et Ève. Vous m’avez soutenu, suivi mes facéties, et rendu tellement d’amour que je ne pouvais imaginer finir ma thèse sans votre présence. Merci à Sophie Duchemin de m’avoir sauvé 3h sur Word avec sa suggestion de recherche.

Je tiens à remercier mes plus anciens amis : Wiggles, Diet Wiggles, Evan, Aaron, Bob, Ian et Nico. Vous ne comprenez peut-être pas grand-chose à ce qui se passait avec ma thèse, mais vous avez toujours été là pour écouter et apporter votre soutien chaque fois que c’était nécessaire. Enfin, je tiens à remercier Marie-Pier, qui m’a soutenue tout au long de mon master et de mon doctorat de bien des manières que je ne peux nommer. À toutes les personnes dans ma vie qui ont été là pour moi, je ne peux pas vous citer toutes. Cependant, sachez que vous m’avez aidé simplement en étant là au bon moment et au bon endroit. Merci à vous tous.

DÉDICACE

Cette thèse est dédiée à mon père, Roger Hraoui. Il n'est plus parmi nous, mais les valeurs qu'il m'a inculquées et les leçons qu'il m'a apprises ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Tu me manques à tous les jours, papa.

Ton fils à tout jamais, Georges.

AVANT-PROPOS

Originellement, ce projet doctoral avait comme but primaire de déceler toutes les sources pertinentes de dérivés réactifs de l'oxygène/azote qui se produisaient durant un stress thermique. Cependant, l'envergure nécessaire à relever ce défi, combinée avec les limites scientifiques des techniques requises pour accomplir ceci, ainsi qu'avec les découvertes surprenantes trouvées durant la thèse, ont modifié la direction de la thèse de manière significative.

Malgré qu'originellement, nous voulions trouver les sources d'ERO, et bien que cela reste encore un questionnement pertinent à relever dans le future, mon projet s'est transformé en quelque chose d'inattendu. Nous nous sommes concentrés sur deux source spécifiques, et nous avons exploré, en long et en large, leur impact sur la survie cellulaire, ainsi que sur la signalisation cellulaire impliquant des protéines adjacentes à la protéine principale du projet : Nrf2. Compte tenu des défis, des obstacles, et des changements amenés au projet, je suis fier de présenter les travaux issus des dernières cinq années de ma vie.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
AVANT-PROPOS.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	x
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xiii
RÉSUMÉ	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 Les espèces réactives de l'oxygène.....	3
1.1.1 Origine mitochondriale des ERO.....	3
1.1.2 Origine non mitochondriale des ERO.....	6
1.1.3 Impact cellulaire des ERO	8
1.1.3.1 ERO et Mitophagie.....	9
1.1.3.2 ERO et biogenèse mitochondriale	10
1.1.4 ERO à bas niveaux.....	11
1.1.4.1 ERO et cancers	12
1.2 Nrf2	15
1.2.1 Structure et Régulation de Nrf2.....	15
1.2.1.1 Structure de Nrf2	15
1.2.1.2 Dégradation de Nrf2	16
1.2.1.3 Nrf2 après sa dissociation de Keap1.....	18
1.2.1.4 Régulation de Nrf2 autre que par Keap1.....	19
1.2.1.5 La régulation fine de Nrf2	20
1.2.2 Nrf2 et la radiation.....	23
1.2.3 Nrf2 et l'hypoxie	24
1.2.4 Nrf2 et les métaux	25
1.2.5 Nrf2 et la température.....	27
1.2.6 Nrf2 et le métabolisme	29
1.3 La chaleur, le stress, et Nrf2.....	33
1.3.1 La chaleur.....	33
1.3.2 Protéines de chocs thermique	37
1.3.3 Autophagie.....	38

1.3.4	Réponse de protéines mal repliées	40
1.3.5	Réponse antioxydante	41
1.4	La thermotolérance, le défi Nrf2, et les partenaires d'interactions potentiels	41
1.4.1	Nrf2 et Nrf1	43
1.4.2	Nrf2 et DJ-1	44
1.4.3	Nrf2 et PGAM5	46
1.4.4	Nrf2 et ATF5	47
1.5	Objectifs et Hypothèses	49
1.5.1	Hypothèses primaires	50
1.5.2	Objectifs	50
CHAPITRE 2 ARTICLE 1: NRF2 MEDIATES MITOCHONDRIAL AND NADPH OXIDASE-DERIVED ROS DURING MILD HEAT STRESS AT 40°C		54
2.1	Introduction	58
2.2	Materials and Methods	61
2.3	Results	67
2.4	Discussion	85
2.5	Conclusion	93
2.6	Supplementary Data	94
CHAPITRE 3 ARTICLE 2 : THERMOTOLERANCE INDUCED BY NON-LETHAL HEAT SHOCK AT 40°C IS ACTIVATED BY MITOCHONDRIAL ROS AND IS NRF2-DEPENDENT		102
3.1	Introduction	106
3.2	Material and Methods	108
3.3	Results	115
3.4	Discussion	134
3.5	Conclusion	143
3.6	Supplementary Data	144
CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE		155
4.1	Résumé bref de la discussion des deux articles présentés	155
4.2	Nrf2, ses partenaires d'interactions, et le stress thermique	161
4.2.1	Nrf1	161
4.2.2	DJ-1	162
4.2.3	PGAM5	164
4.2.4	ATF5	167
4.3	Limites de la thèse	170
4.3.1	Apocynine et MitoQ	170
4.3.2	Nrf2 et ses partenaires d'interactions	172

CONCLUSION174

ANNEXE A DATA WESTERN BLOT LIÉ AU CHAPITRE 3 (non publié)178

RÉFÉRENCES183

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Le système de transport d'électrons de la mitochondrie.	4
Figure 1.2 Les trois modes de production d'ERO dans l'OXPPOS de la mitochondrie.....	5
Figure 1.3 La structure des NOX.	7
Figure 1.4 La mitophagie régulée par PINK1.	9
Figure 1.5 Régulation de la biogenèse mitochondriale.....	11
Figure 1.6 Les ERO dans les cellules saines et cancéreuses.	14
Figure 1.7 La structure des domaines Neh de Nrf2 ainsi qu'une visualisation 3D de la liaison Neh2-Keap1.	16
Figure 1.8 Cascade cellulaire principale de Nrf2 dans la réponse antioxydante.	17
Figure 1.9 Le rôle inverse de Nrf2 et NF- κ B au sein de la cellule.	21
Figure 1.10 Les différents stress chimiques induisent l'oxydation de résidus de cystéine distincts sur Keap1.	23
Figure 1.11 L'inhibition de Nrf2 potentialise les traitements de radiations dans le cancer du sein.....	24
Figure 1.12 Résumé bref de l'impact cellulaire d'une exposition à des métaux lourds.	25
Figure 1.13 Les gènes métaboliques affectés par Nrf2.	29
Figure 1.14 Nrf2 dans une cellule normale et dans une cellule cancéreuse.....	32
Figure 1.15 Une visualisation de base des fonctions des HSP.....	37
Figure 1.16 L'induction de Nrf1 par hormone stéroïde peut moduler le métabolisme énergétique cellulaire.	43
Figure 1.17 Un survol des voies de signalisation du stress liées à DJ-1.	45
Figure 1.18 PGAM5 lie le complexe Nrf2-Keap1 à la mitochondrie, et ce complexe ternaire devient un senseur rédox mitochondrial.....	46
Figure 1.19 ATF5 régule une réponse UPR mitochondriale multifactorielle.	48
Figure 2.1 Mild heat shock at 40°C increases levels of cellular and mitochondrial ROS.	67
Figure 2.2 Antioxidant treatment reduces fluorescence levels of ROS probes at 40°C.	69
Figure 2.3 MitoQ scavenges cellular and mitochondrial ROS during mild heat shock at 40°C.	70

Figure 2.4 Apocynin scavenges cellular and mitochondrial ROS during mild heat shock at 40°C.	72
Figure 2.5 Nrf2 mediates cellular and mitochondrial ROS production during mild heat shock at 40°C.	73
Figure 2.6 Hyperpolarization of mitochondrial membrane potential (MMP) occurred during mild heat shock at 40°C.	77
Figure 2.7 MitoQ scavenges cellular and mitochondrial ROS in Nrf2 KD cells during mild heat shock at 40°C.	78
Figure 2.8 Apocynin scavenges cellular and mitochondrial ROS in Nrf2 KD cells during mild heat shock at 40°C.	80
Figure 2.9 Treatment with Apocynin, MitoQ, or modulation of Nrf2 levels significantly impact protein levels of Nrf1 and DJ-1 during mild heat shock at 40°C.	81
Figure 2.10 Treatment with Apocynin, MitoQ, or modulation of Nrf2 levels significantly impact protein levels of uncleaved and cleaved PGAM5 during mild heat shock at 40°C.	84
Figure 3.1 Heat shock at 42°C increases ROS production and induces cell death.	115
Figure 3.2 Antioxidants diminish enhanced ROS production at 42°C.	117
Figure 3.3 Mitochondria and NOXs contribute to ROS production at 42°C: role in cell death.	119
Figure 3.4 Altered Nrf2 expression impacts ROS levels and cell death during heat shock at 42°C.	122
Figure 3.5 Pretreatment at 40°C confers thermotolerance that inhibits ROS production and protects cells against cell death at 42°C.	126
Figure 3.6 Nrf2 expression directly regulates the effectiveness of thermotolerance conferred by pre-treatment at 40°C.	129
Figure 3.7 Attenuation of mitochondrial ROS prior to pre-treatment at 40°C reverses the protective effect of thermotolerance at 42°C.	132
Figure 4.1 Les voies de réponses au stress impliquant PGAM5.	166
Figure 4.2 Les traitements variés à 42°C affectent l'expression de DJ-1 et ATF5 à 42°C.	179
Figure 4.3 Les traitements variés affectent l'expression et le clivage de PGAM5 à 42°C.	181

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ACC1: Acétyl-CoA Carboxylase 1

ARE: Antioxidant response elements

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ATF5: Activating Transcription Factor 5

Bak: Bcl-2 homologous Antagonist Killer

Bax: Apoptosis regulator BAX

Bcl-xL: B-cell Lymphoma-extra large

CAT: Catalase

CDK: Kinase dépendante de la cycline

CI: Complexe I

CII: Complexe II

CIII: Complexe III

CIV: Complexe IV

CV: Complexe V

DJ-1: Parkinson disease protein 7/protein deglycase

Drp1: Dynamin-related Protein 1

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

GPx: Glutathion Peroxydase

GSH: Glutathion

HeLa: Human Cervical Adenocarcinoma cells

HO-1: Hème Oxygénase-1

HSE: Heat Shock Elements

HSF: Heat Shock Factors

HSPs: Heat Shock Protein

KD: Knockdown

Keap1: Kelch-like ECH-Associated Protein 1

KRAS: Kirsten rat sarcoma virus

mTOR: Mechanistic target of rapamycin

mtUPR: Mitochondrial UPR

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NF- κ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NOX: NADPH Oxidase

Nrf1: Nuclear factor erythroid 2-related factor 1

Nrf1: Nuclear Respiratory Factor 1

Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OE: Overexpressor

OXPPOS: Phosphorylation oxydative

p62: Sequestosome-1/ Ubiquitin-binding protein p62

PEG-CAT: Polyéthylène Glycol-Catalase

PEG-SOD: Polyéthylène Glycol-Superoxyde Dismutase

PERK: Eukaryotic Translation Initiation Factor 2- α Kinase 3/ Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PINK1: PTEN Induced Kinase 1

PGAM5: Phosphoglycerate Mutase Family Member 5

PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1- α

p53: protéine tumeur p53

SCD1: Stearoyl-CoA desaturase

sMaf: small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma

SOD: Superoxide Dismutase

STE : Système de transport d'électrons

TFAM: Mitochondrial Transcription Factor A

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

TT: Thermotolérantes

UPR: Unfolding Unfolded Protein Response

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C : degré Celsius

M : molaire

μM : micromolaire

mM : millimolaire

nM : nanomolaire

RÉSUMÉ

L'hyperthermie est un traitement anticancer généralement administré en tant qu'adjuvant à la chimiothérapie/radiothérapie. Il sensibilise les tumeurs solides à ces traitements et a pour objectif d'induire la mort cellulaire dans la tumeur. Cependant, si le traitement d'hyperthermie n'est pas administré à des intervalles de temps assez espacés, la tumeur peut développer une résistance qui réduit l'efficacité de la chaleur. Cette résistance à la chaleur semble impliquer le régulateur antioxydant maître Nrf2, ainsi qu'un signal activateur transmit par le stress oxydatif. Cependant, les explications mécanistiques de l'établissement de la résistance restent encore à élucider. Dans un modèle cellulaire de cancer, nous avons réussi à induire une résistance à la chaleur létale de 42°C en exposant les cellules préalablement à un choc thermique léger de 40°C pendant 3h. Le premier chapitre de cette thèse a exploré le stress oxydatif produit par ce choc léger de 40°C. Nous avons démontré que les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites à 40°C proviennent de manière significative, mais non exclusivement, de la mitochondrie ainsi que de la protéine membranaire NADPH oxydase (NOX). De plus, nous avons démontré que le stress de 40°C augmente les niveaux de Nrf2. En retour, Nrf2 semble réguler le niveau cellulaire et mitochondrial d'ERO, car sa diminution ou sa surexpression engendrent respectivement plus et moins d'ERO. Finalement, nos résultats démontrent que certaines protéines de défense critiques, telles que Nrf1, DJ-1, et PGAM5, requièrent une double activation par les ERO mitochondriaux et Nrf2 lors d'un choc léger, et que cette double activation pourrait contribuer à la résistance subséquente à 42°C. Dans le deuxième chapitre de cette thèse, nous avons comparé des cellules exposées à 42°C avec les cellules préalablement exposées à 40°C pendant 3h dans l'optique de comprendre la mécanistique derrière la résistance acquise. Nous avons directement corrélé le niveau de Nrf2 avec l'efficacité de la thermotolérance. De plus, nous avons démontré que les ERO d'origine mitochondriale sont essentiels à l'induction de cette thermotolérance, car leur inhibition avant l'exposition à 40°C dissipe complètement l'effet protecteur du pré-traitement de 40°C. L'inhibition de ces ERO réduit aussi le niveau de Nrf2. De plus, plusieurs protéines de défense, comme ATF5, DJ-1, et PGAM5, semblent être dépendantes du niveau cellulaire d'ERO pour être activées. L'identification de sources d'ERO essentielles à l'induction de la thermotolérance Nrf2-dépendante pourrait mener à des nouvelles cibles thérapeutiques pour contrer l'acquisition tumorale d'une résistance aux traitements d'hyperthermie.

Mots clés : Nrf2, Choc Thermique, Stress Oxydatif, Mitochondrie, Thermotolérance

ABSTRACT

Hyperthermia is an anticancer treatment generally administered as an adjuvant to chemotherapy/radiotherapy. It sensitizes solid tumors to these treatments and aims to induce cell death in the tumor. However, if the treatment is not administered at sufficiently spaced out intervals of time, it may develop resistance that reduces the effectiveness of the heat. This phenomenon is considered a cellular adaptive response. This heat resistance also appears to involve the master antioxidant regulator Nrf2, as well as an activation signal mediated by oxidative stress. However, the mechanistic explanations behind the establishment of this cellular adaptive response remain to be elucidated. In a cancer cell model, we successfully induced resistance to a severe heat shock at 42°C by pre-exposing the cells to a mild heat shock of 40°C for 3 hours. The first chapter of this thesis explored the oxidative stress produced by this mild 40°C shock. We demonstrated that reactive oxygen species (ROS) produced at 40°C primarily, but not exclusively, originate from the mitochondria as well as from the membrane protein NADPH oxidase (NOX). Moreover, we showed that 40°C stress increases Nrf2 levels. In turn, Nrf2 appears to mediate cellular and mitochondrial ROS levels, as its knocking down or overexpression respectively results in higher/lesser ROS levels. Finally, our results demonstrate that certain critical defense proteins, such as Nrf1, DJ-1, and PGAM5, require a dual activation by mitochondrial ROS and Nrf2 during a mild heat shock, and that this dual activation may contribute to subsequent resistance at 42°C. In the second chapter of this thesis, we compared cells exposed to 42°C with cells previously exposed to 40°C for 3 hours in order to understand the mechanism behind the acquired resistance. We directly correlated the levels of Nrf2 with the effectiveness of thermotolerance. Additionally, we demonstrated that mitochondria-derived ROS are essential for inducing this thermotolerance, as their inhibition prior to exposure to 40°C completely dissipates the protective effect of the 40°C pre-treatment. Inhibition of these ROS also reduces the Nrf2 level. Furthermore, several defense proteins, such as ATF5, DJ-1, and PGAM5, appear to be dependent on cellular ROS levels for activation. Identifying essential sources of ROS required for the induction of Nrf2-dependent thermotolerance could lead to new therapeutic targets to counter the tumor acquisition of resistance to hyperthermic treatments.

Keywords : Adaptive survival response, Heat shock, Mitochondria, Nrf2, Oxidative stress, Thermotolerance

INTRODUCTION

Le cancer est la deuxième plus grande cause de décès au monde après les maladies cardiovasculaires. Sous toutes ses formes, il a causé au-delà de 10 millions de morts mondialement en 2020 (McIntosh *et al.*, 2023). Concrètement, une mort sur 6 peut être attribuée au cancer (Kaur *et al.*, 2023). De plus, en 2020, il y a eu près de 20 000 000 de cas de cancers diagnostiqués (McIntosh *et al.*, 2023). Ceux-ci ne considèrent pas les cas silencieux qui ne sont pas diagnostiqués par manque d'accès à des ressources en santé. Considérant son impact, la compréhension fondamentale du cancer pour développer divers traitements fonctionnels est un objectif global de premier plan en recherche de santé. Dans les dernières décennies, il y a eu des avancées considérables au niveau du traitement des cancers. Selon la société américaine du cancer, entre 1991 et 2019, les morts proportionnelles liées au cancer ont chuté de 32% (American Cancer Society, 2024). Cette chute est directement liée à l'avancement au niveau des traitements et de nos connaissances. Les traitements les plus courants en oncologie sont la chimiothérapie, la radiothérapie ainsi que l'excision des tumeurs par chirurgie (American Cancer Society, 2024). Cependant, il existe plusieurs autres traitements qui peuvent être administrés au premier ou second plan. Parmi ceux-ci, nous retrouvons les traitements hormonaux, la cryothérapie, les traitements lasers, l'immunothérapie ainsi que l'hyperthermie (American Cancer Society, 2024). Ces traitements peuvent être utilisés de manière primaire, comme l'immunothérapie qui vise à stimuler notre propre système immunitaire pour combattre les cancers (Benoit *et al.*, 2023). Ils peuvent aussi être utilisés en tant qu'adjuvants à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Tel est le cas de l'hyperthermie (Crezee *et al.*, 2021; Datta *et al.*, 2020).

L'hyperthermie est un traitement anticancer qui implique l'utilisation de températures élevées ($\geq 39.5^{\circ}\text{C}$) ciblées pour induire une mort par nécrose dans les tumeurs solides (Crezee *et al.*, 2021). Elle sensibilise aussi les tumeurs à la radiothérapie et la chimiothérapie. Elle augmente l'efficacité de ces traitements chez plusieurs types de cancers incluant le cancer du sein, de la vessie, du col de l'utérus, du cou et de la tête, des sarcomes des tissus mous, et du mélanome (Datta *et al.*, 2015). L'attrait de l'hyperthermie est dans son effet sensibilisant. Le traitement est aussi parmi les moins invasifs. Si les températures utilisées restent en dessous de 44°C , la plupart des tissus sains ne subissent pas de dommages permanents, mais des inconforts temporaires (Baronzio, 2014; Datta *et al.*, 2015). Les effets secondaires de l'hyperthermie incluent principalement la diarrhée, la nausée, ainsi que les vomissements. Cependant, ceux-ci sont plus communs dans les traitements d'hyperthermies au niveau du corps complet en comparaison à l'hyperthermie localisée qui démontre considérablement moins d'effets secondaires indésirables (van der

Zee, 2002). Généralement, les types de traitements en hyperthermie peuvent être séparés en trois grandes catégories. Il y a l'hyperthermie localisée, qui envoie de la chaleur dans une petite zone contrôlée, généralement envers une tumeur ciblée. Un exemple concret de ce type de traitement est l'ablation de tumeurs par ondes radios (Noel et Sinclair, 2023). Ensuite, il y a l'hyperthermie régionale. Ce traitement implique l'application de chaleur à des zones plus grandes, comme des organes, des cavités, ou des membres du corps (Fiorentini *et al.*, 2020). Finalement, il y a l'hyperthermie du corps complet, qui implique l'application de chaleurs de 41.5-42°C pendant de courtes durées à l'individu complet. Ce traitement vise, entre autres, à stimuler le système immunitaire de manière similaire à une fièvre (Zschaek et Beck, 2022).

L'utilisation de l'hyperthermie comme traitement contre le cancer remonte à plus de 4000 ans (Glazer et Curley, 2011). Cependant, c'est seulement dans les dernières décennies que nous commençons à comprendre la biochimie fonctionnelle derrière ce processus, notamment dû à la recherche active pour optimiser son efficacité. Il a été démontré que la durée et l'espacement des traitements sont tout aussi importants que le type d'hyperthermie et la chaleur utilisée (Kok *et al.*, 2020). L'aspect temporel n'est pas seulement important à considérer pour limiter les dommages, mais aussi pour éviter l'acquisition d'une résistance à la chaleur chez la tumeur (Kok *et al.*, 2020). Lorsque les traitements ne sont pas espacés dans le temps, certaines tumeurs développent une résistance à la chaleur qui leur permettent de mieux survivre aux chocs de température subséquents (Landry *et al.*, 1982). Ce phénomène a aussi été reproduit *in vitro*. Lorsque des cellules cancéreuses HeLa sont exposées à des températures de 39-41°C pendant plus de 3h, elles développent une résistance transitoire à des chocs de températures subséquents qui augmente considérablement leur survie (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Glory *et al.*, 2014) et limite fortement l'efficacité de l'hyperthermie. Concrètement, en oncologie, la seule méthode couramment utilisée pour éviter cette résistance est d'espacer les traitements de chaleur dans le temps, car la résistance observée est transitoire et se perd au fil du temps. De plus, la compréhension mécanistique de la thermotolérance reste limitée. Ceci désavantage l'utilisation de l'hyperthermie dans un contexte de thérapie oncologique. En revanche, le potentiel d'identifier les joueurs clefs au niveau cellulaire pourrait mener au développement de méthodes plus modernes qui peuvent éviter cette période « d'attente » et donc ouvrir la porte à des traitements qui n'ont plus cette restriction temporelle. C'est dans le cadre des traitements d'hyperthermie et de la thermotolérance transitoire que s'insère cette thèse doctorale. Elle vise à clarifier, en partie, la biochimie mécanistique derrière ce phénomène dans le but de proposer des pistes de recherche qui pourraient aboutir à des cibles thérapeutiques.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des molécules à bases d'oxygène présentes dans la cellule et la matrice extracellulaire (Averill-Bates, 2024). Les ERO existent sous plusieurs formes. Elles peuvent exister sous forme de radicaux libre ou de non-radicaux. Un radical libre, essentiellement, contient un électron libre au niveau de sa dernière couche d'électrons. Cette caractéristique rend les radicaux libres très réactifs (Averill-Bates, 2024). Les ERO sous forme de radicaux libre incluent l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ainsi que sa forme liée à un proton, le perhydroxyl ($HO_2^{\bullet}$). Il y a aussi le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$), le radical peroxy ($ROO^{\bullet}$), ainsi que le radical alkoxy ($RO^{\bullet}$) (Averill-Bates, 2024; Mailloux, 2020). Les ERO non-radicaux peuvent se retrouver sous forme de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulier libre (1O_2), l'acide hypochlorique ($HOCl$), ainsi que les hydroperoxydes organiques ($ROOH$) (Averill-Bates, 2024). Le « R » dans ces exemples représente un lipide ou une protéine. De plus, cette liste n'est pas exhaustive et représente des exemples des différents types d'ERO retrouvés dans les systèmes biologiques. D'autres espèces réactives existent et possèdent des propriétés oxydantes, comme l'oxide nitrique ($NO^{\bullet}$) ou des espèces réactives du soufre comme le sulfide d'hydrogène (H_2S) (Li *et al.*, 2022). Ces espèces jouent un rôle important dans les systèmes biologiques, surtout en signalisation cellulaire (Li *et al.*, 2022), mais cette thèse se penche spécifiquement sur les ERO.

1.1.1 Origine mitochondriale des ERO

Les ERO sont généralement créés comme produits métaboliques secondaires au niveau mitochondrial. Essentiellement, le système de transport d'électrons (STE) (Figure 1.1) crée un gradient de protons en passant des électrons provenant de différentes sources, comme le NADH ou $FADH_2$, à travers les différents complexes associés. Ces électrons se retrouvent, à la fin du système, au complexe IV (Cytochrome c oxydase ou CIV) et se lient à l'oxygène. Ce dernier est, en conditions homéostatiques, l'accepteur final d'électrons issus du système de transport. Deux protons (H^+) réagissent avec un atome d'oxygène ($\frac{1}{2}O_2$) ainsi qu'un électron pour former de l'eau. Le gradient créé permet au complexe V (ATP synthase ou CV) d'utiliser les protons et de les « pomper » de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale pour synthétiser de l'adénosine triphosphate (ATP) à partir de d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphore inorganique (P_i) (Mailloux, 2020; Mohamed Yusoff, 2015).

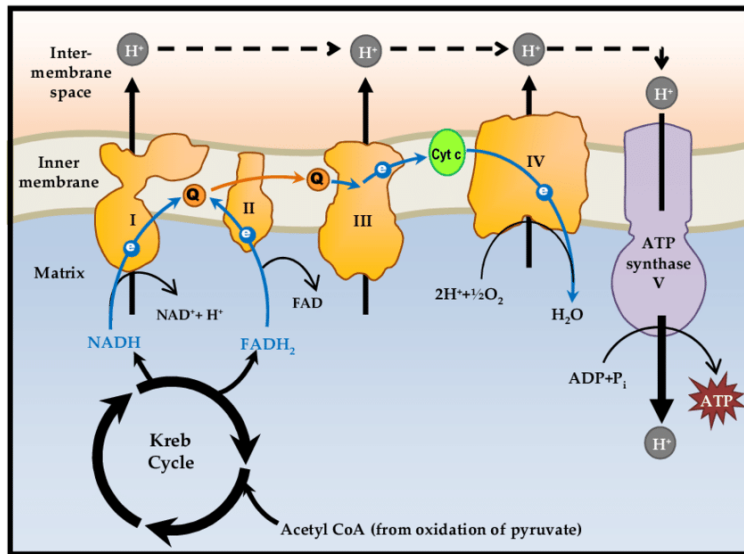


Figure 1.1 Le système de transport d'électrons de la mitochondrie. Les carburants divers de l'OXPHOS (comme le NADH et le FADH₂) donnent des électrons aux complexe mitochondriaux, permettant la création d'un gradient de protons. Ces électrons se retrouvent au complexe IV, et se lient à l'oxygène, qui est l'accepteur final d'électrons en conditions homéostasiques. Les électrons se lient à l'oxygène avec des protons pour créer de l'eau. Le gradient de protons est ensuite utilisé par le l'ATP synthase pour former de l'ATP à partir d'ADP et de phosphore inorganique (P_i) en faisant repasser des protons vers la matrice mitochondriale. Tiré de Mohamed Yusoff (2015)

Ce système n'est pas parfait. Les électrons du système peuvent réagir prématurément avec de l'oxygène avant d'atteindre le CIV et créer du superoxyde. Ainsi, le STE, et donc la mitochondrie, sont classiquement considérés, avec la protéine membranaire NADPH Oxydase (NOX) (voir section : Origine non mitochondriale des ERO), comme les sources primaires d'ERO dans la cellule. Spécifiquement, le complexe I (NADH déshydrogénase ou CI) ainsi que le complexe III (cytochrome *c* oxydoréductase ou CIII) sont reconnus pour être les sites de production majeurs d'ERO dans la mitochondrie (Averill-Bates, 2024; Mailloux, 2020). Généralement, en conditions pathologiques, la production d'ERO est stimulée par une réduction de NADH. Cette réduction peut être causée par des dommages au STE, par perte de cytochrome *c* durant l'apoptose, ou par réduction en demande d'ATP (Figure 1.2) (Murphy, 2009). Cependant, de plus en plus de recherche en cours démontre la contribution active du complexe II (succinate déshydrogénase ou CII) à la production globale d'ERO, via le transport inversé d'électrons par exemple (Mailloux, 2020). Il existe des sources qui produisent des ERO dans la mitochondrie qui ne sont pas associées au STE. En effet,

il est estimé qu'environ 12 sources associées au métabolisme des nutriments ainsi que le STE existent dans la mitochondrie (Mailloux, 2020; Sies *et al.*, 2017). En homéostasie, nous estimons qu'environ 0.2-2% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial se perd sous toute forme d'ERO (Tirichen *et al.*, 2021). De plus, en général, la mitochondrie, ainsi que les NOX, contribuent significativement à la production d'ERO globaux cellulaires en conditions basales (Mailloux, 2020; Moghadam *et al.*, 2021), mais la contribution proportionnelle mitochondriale peut varier selon le type de cellule, de tissu, l'âge, ainsi que le sexe de l'organisme (Mailloux, 2020; Ventura-Clapier *et al.*, 2017).

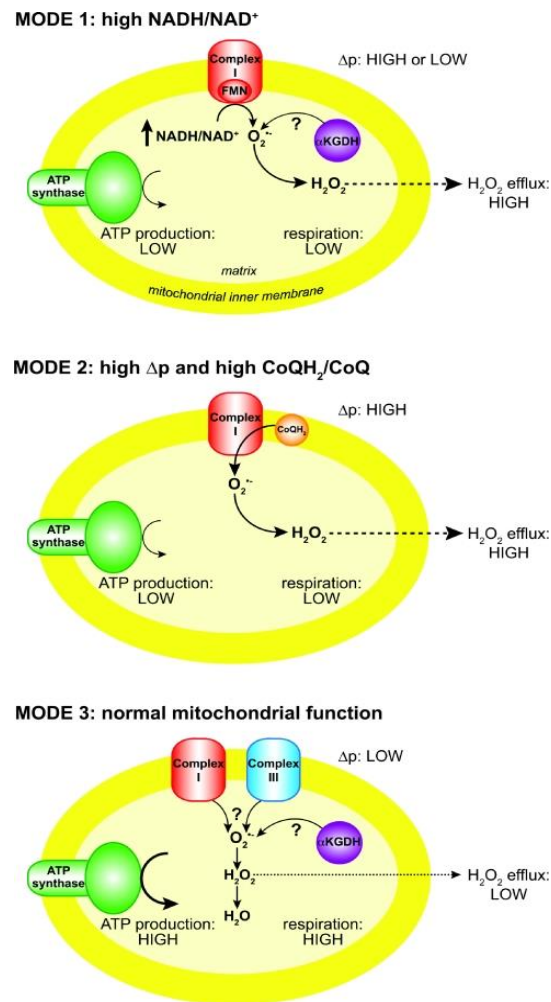


Figure 1.2 Les trois modes de production d'ERO dans l'OXPHOS de la mitochondrie. MODE 1 : Lorsque le ratio NADH/NAD⁺ est trop élevé, le complexe I reçoit une abondance d'électrons. Ceci peut sursaturer le CI et favoriser la production de superoxyde provenant particulièrement du groupe Flavine Mononucléotide (FMN). Ceci peut mener à une dépolarisation ou hyperpolarisation membranaire mitochondriale (Δp). Conséquemment, la production d'ATP et le taux de respiration restent bas. MODE 2 : Un ratio élevé de CoQH₂/CoQ peut causer un reversement du flux d'électrons du CII vers le CI. De plus, le ratio élevé promeut la disponibilité d'électrons au CI. Ainsi, il y a forte production d'ERO couplée avec un bas taux de production d'ATP/respiration. MODE 3 : Lors de conditions

mitochondriales homéostasiques, les électrons peuvent s'échapper du CI et du CIII, menant à la production d'ERO. Cependant, la production d'ATP et la respiration mitochondriale sont maintenues. Lors des modes 1 et 3, l' α -cétoglutarate déshydrogénase (α KGDH) peut variablement contribuer à la production d'ERO. Tiré de Murphy (2009)

1.1.2 Origine non mitochondriale des ERO

Bien que la mitochondrie soit considérée comme une source principale d'ERO dans la cellule, il existe plusieurs autres sources d'ERO à travers la cellule. Par exemple, dans plusieurs membranes cellulaires, telles que la membrane plasmique, la membrane mitochondriale, et la membrane du réticulum endoplasmique, nous retrouvons la protéine « Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxydase » (NADPH oxydase ou NOX) sous 7 isoenzymes potentielles différentes. Les NOX sont connues pour produire du superoxyde en réponse à des stress oxydatifs (Gardiner *et al.*, 2020; Kuroda *et al.*, 2010; Vermot *et al.*, 2021). Elles peuvent aussi être activées en réponse à l'hyperglycémie (Rastogi *et al.*, 2016), à l'hypoxie (Rastogi *et al.*, 2016), par des facteurs de croissance (Brown et Griendling, 2009), et même par une dysfonction mitochondriale (Cipriano *et al.*, 2023). Cette liste n'est pas exhaustive, mais démontre la variabilité de conditions pouvant stimuler les NOX. Originellement décrites comme ayant des fonctions immunitaires chez les phagocytes, le rôle plus large des NOX en tant que productrices généralisées d'ERO se définit de plus en plus (Vermot *et al.*, 2021). La première isoenzyme découverte chez les phagocytes se nomme NOX2 (ou gp91^{phox}) (Figure 1.3). Au fur du temps, six autres homologues humains ont été découverts : NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, Dual oxydase 1 et 2 (DUOX1 et DUOX2, respectivement) (Chocry et Leloup, 2020; Vermot *et al.*, 2021). En tant que producteurs spécialisés d'ERO, les NOX participent à plusieurs processus physiologiquement pertinents tels que la défense cellulaire, les modifications post-traductionnelles des protéines, la signalisation cellulaire via les ERO, la régulation de l'expression de certains gènes, ainsi que la différenciation et prolifération cellulaire (Vermot *et al.*, 2021).

Tous les isoformes de NOX partagent une homologie structurale caractérisée par un noyau catalytique commun composé de six hélices transmembranaires chélatant deux sous-unités d'hème, ainsi qu'un domaine déshydrogénase qui lie les facteurs flavines non-covalents et le substrat NADPH (Vermot *et al.*, 2021). En revanche, leur distribution membranaire et tissulaire, leur régulation et leurs mécanismes d'activation peuvent différer selon l'isoforme. C'est cette diversité qui permet aux NOX d'être impliqués dans un panoplie de processus biochimiques importants. Brièvement, NOX1 et NOX3 ont 60% d'homologie avec le NOX2 original. NOX1 est l'isoforme prédominant dans le colon, la prostate, l'utérus, et les cellules vasculaires (Bánfi *et al.*, 2000; Krause, 2004; Suh *et al.*, 1999). NOX3 est produite dans l'oreille interne, et

la production d'ERO par NOX3 peut être associée à une perte graduelle de l'ouïe (Rybak *et al.*, 2012). NOX4 partage que 39% d'homologie avec NOX2, et est fortement exprimée dans les reins, les ostéoclastes, les fibroblastes, et les cellules endothéliales (Prior *et al.*, 2016). NOX5 partage 27% d'homologie avec NOX2 et est fortement exprimée dans la rate et les testicules. Elle est aussi exprimée à un moindre niveau dans les tissus vasculaires, les cellules gastrointestinales, ainsi que dans plusieurs types de cancers (Fulton, 2009). NOX5 est spécialisée dans la production d'ERO dans des environnements pauvres en calcium (Kawahara *et al.*, 2011). DUOX1 et DUOX2 sont généralement inertes dans le réticulum endoplasmique. Elles requièrent un facteur de maturation (DUOXA1 ou DUOXA2) avant de pouvoir adopter une conformation similaire aux autres isoformes et se déplacer vers les membranes (Milenkovic *et al.*, 2007). DUOX1 ne produit que du superoxyde, tandis que DUOX2 produit aussi du peroxyde d'hydrogène (Lee et Song, 2021; Milenkovic *et al.*, 2007). Ces deux enzymes sont exprimées dans les membranes apicales de tissus folliculaires de cellules thyroïdes (Madkour, 2020). Dans le modèle cellulaire humain très utilisé en recherche, les cellules HeLa, NOX1, NOX2, et NOX4 sont exprimés tandis que NOX5 est possiblement exprimé aussi (Muthuramalingam *et al.*, 2020).

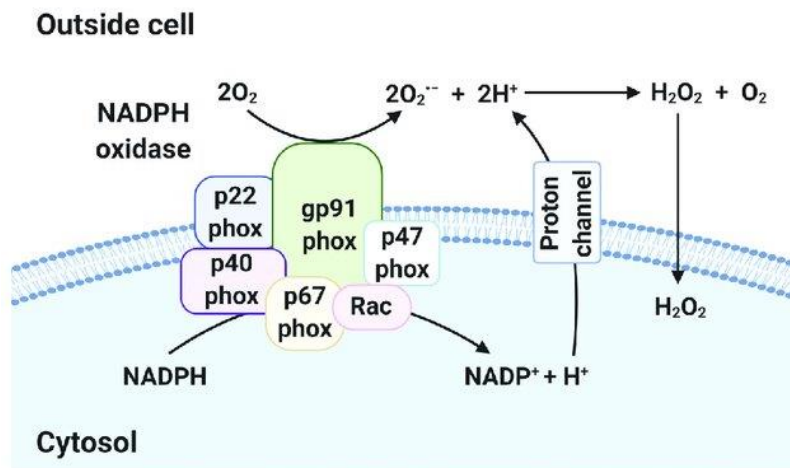


Figure 1.3 La structure des NOX. Les NOX, ici représentées par les sous-unités (p22 phox, gp91 phox, p40phox, p67 phox, p47 phox, et Rac), sont alimentées en protons par la NADPH, et catalysent la réaction de ces protons avec l'oxygène en dehors de la cellule. Ceci résulte en la formation de superoxyde et du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde peut traverser la membrane et pénétrer dans le cytosol cellulaire. Tiré de Lee & Song (2021)

Bien que nous considérions la mitochondrie et les NOX comme des sources principales d'ERO, ce ne sont pas les seules productrices. D'autres sources d'ERO incluent les oxydases centrées sur les flavines dans les

peroxysomes et le réticulum endoplasmique, la beta-oxydation des acides gras, ainsi que des sources externes aux systèmes biologiques tels que la radiation, la chaleur, les métaux lourds, et certains agents pharmaceutiques (Averill-Bates, 2024; Averill-Bates, 2023; Sies *et al.*, 2022; Winterbourn, 2018). Selon les estimations les plus récentes, il existe 41 sources connues pour produire du superoxyde et/ou du peroxyde d'hydrogène dans la cellule eucaryote mammifère (Averill-Bates, 2024; Sies *et al.*, 2022). En incluant les autres types d'ERO, comme l'oxyde nitrique, nous atteignons 56 sources distinctes (Averill-Bates, 2024).

1.1.3 Impact cellulaire des ERO

L'effet des ERO dans la cellule peut varier significativement selon leur concentration (Thannickal et Fanburg, 2000). À des niveaux élevés, généralement plus élevés que 100nM et allant jusqu'à 10-100µM (Herb *et al.*, 2021), les ERO oxydent l'ADN, les membranes lipidiques, ainsi que les protéines et causent des dommages cellulaires importants (Sies *et al.*, 2017; Sies et Jones, 2020). L'accumulation de ces dommages peut mener à la dysfonction cellulaire. Spécifiquement, il a été démontré que l'accumulation excessive des ERO peut engendrer des issues au niveau du protéasome et lysosome. Ces deux systèmes sont essentiels dans la cellule pour dégrader et recycler plusieurs protéines et organites endommagés de la cellule (Kaarniranta *et al.*, 2020). Dans certaines types de cellules épithéliales, une agrégation de protéines oxydées a été remarquée lors d'un stress oxydatif important causé par dysfonction mitochondriale. Habituellement, ces protéines sont dégradées par voie protéasomale. Ceci cause une perturbation homéostatique transitoire qui peut être soutenue par le recyclage des éléments endommagés. Cependant, si le stress oxydatif persiste ou est trop important, les protéines constituant les protéasomes sont elles-mêmes oxydées, endommagées et causent un effet papillon dans lequel les protéines dysfonctionnelles s'accumulent sans voie de dégradation efficace (Kaarniranta *et al.*, 2020). À des niveaux plus bas/intermédiaires, les ERO peuvent servir de molécules signalétiques dans la cellule. Par exemple, ils peuvent modifier les thiols de certaines protéines pour induire des changements conformationnels menant à une potentielle cascade signalétique (Averill-Bates, 2024). Cet effet signalétique sera abordé plus en détail plus tard dans l'introduction.

Au niveau lysosomal, l'autophagie est essentielle comme mécanisme de survie et de recyclage cellulaire (D'Arcy, 2019; Debnath *et al.*, 2023). Ce processus, séparé en trois catégories différentes (microautophagie, macroautophagie, et autophagie médiée par chaperonnes) assure le fonctionnement optimal de la cellule et lui permet de maintenir ses fonctions essentielles par recyclage de matériaux cellulaires (Debnath *et al.*, 2023). Certaines pathologies associées aux ERO, telle la dégénérescence

maculaire liée à l'âge, ont démontré un lien intime entre la réduction autophagique causée par le stress oxydatif, et la progression de la maladie (Kaarniranta *et al.*, 2020). Vu l'importance cruciale des mitochondries au niveau de la production d'ERO, n'importe quelle perturbation aux systèmes de maintien du réseau mitochondrial peut mener à une rétroaction positive dans laquelle le niveau des ERO est accentué.

1.1.3.1 ERO et Mitophagie

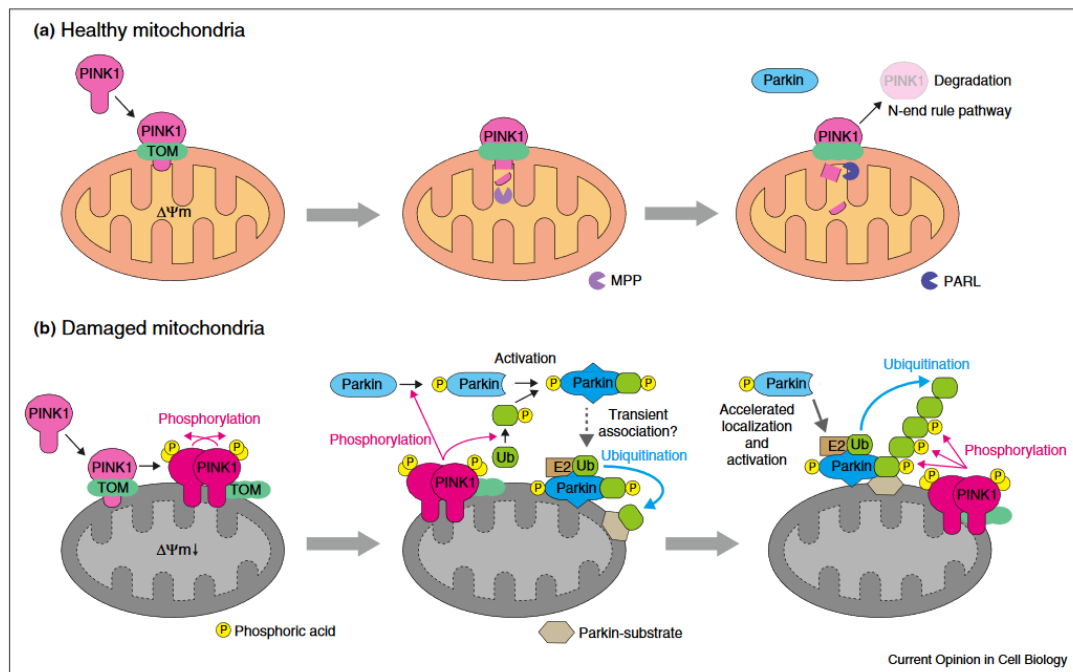


Figure 1.4 La mitophagie régulée par PINK1. A : Lorsqu'une mitochondrie est en santé, PINK1 vient se lier à une translocase de la membrane externe (TOM). Ceci permet son internalisation partielle, menant à un clivage. Elle est ensuite relâchée et est dégradée de manière indépendante à la mitochondrie. B : Lorsqu'une mitochondrie est endommagée, il y a une baisse de potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Ceci permet l'accumulation de PINK1 via TOM en inhibant la translocation partielle de PINK1. PINK1, en nombre important, phosphoryle d'autres PINK1. Ceci permet à Parkin de devenir phosphorylé. Ensuite, à l'aide d'une cascade biochimique impliquant Parkin et une ubiquitine ligase E2 (E2), des ubiquitines sont ajoutées, et subséquemment phosphorylées par PINK1, aux substrats externes de Parkin se retrouvant sur la membrane externe mitochondriale. Conséquemment, ceci crée un signal d'induction mitophagique. Tiré de Eiyama & Okamoto (2015)

La mitophagie est une forme sélective d'autophagie spécifique aux mitochondries (Figure 1.4) (Eiyama et Okamoto, 2015; Su *et al.*, 2023). Elle implique plusieurs voies cellulaires, dont la plus connue passe par la kinase 1 induite via PTEN (PINK1). Brièvement, en conditions basales, PINK1 est partiellement internalisée

dans la mitochondrie. Ceci permet son clivage. Une fois clivée, PINK1 est relâchée de la membrane externe mitochondriale et est destinée à être dégradée par un protéasome. Il n'y a pas d'accumulation de cette protéine à la membrane durant l'homéostasie. Lors d'un stress oxydatif, le changement dans le potentiel membranaire mitochondrial inhibe la translocation partielle dans la matrice interne mitochondriale, ce qui induit une accumulation de PINK1 à la membrane externe mitochondriale. Cette accumulation de PINK1 induit une poly-ubiquitination au niveau de la membrane externe mitochondriale et ce processus est le signal nécessaire pour déclencher cette voie cellulaire de mitophagie qui se termine par la séquestration et l'élimination des mitochondries dans les autophagolysosomes (Su *et al.*, 2023). Lorsque ce processus est défectueux, nous observons une baisse considérable de survie cellulaire ainsi qu'une accentuation de production d'ERO causée par une accumulation de mitochondries endommagées non-dégradées (Au *et al.*, 2024; Su *et al.*, 2023). Lors d'oxydation excessive, les membranes des lysosomes elles-mêmes deviennent oxydées et déstabilisées. Les protéines lysosomales sont aussi susceptibles d'être oxydées. Ceci mène à une réduction de l'efficacité de l'autophagie, dont la mitophagie (Su *et al.*, 2023). Sommairement, des mécanismes de dégradation, responsables du maintien de l'homéostasie cellulaire, sont endommagés par les ERO menant à une rétroaction positive de production d'ERO. Cette boucle rend ces mécanismes attrayant comme cibles thérapeutiques lorsque l'objectif visé est de réduire la quantité absolue d'éléments pro-oxydants.

1.1.3.2 ERO et biogenèse mitochondriale

Les ERO peuvent non seulement affaiblir les mécanismes de recyclage/dégradation cellulaire, ils peuvent aussi agir à l'amont et fortement perturber les mécanismes de biogenèse (Kaarniranta *et al.*, 2020; Ngo et Duennwald, 2022). Par exemple, « proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha » (PGC-1 α) et « Nuclear respiratory factor 1 » (Nrf1) sont des régulateurs maîtres de la biogenèse mitochondriale au niveau du génome nucléaire, tandis que le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM) régule ce processus au niveau du génome mitochondrial (Figure 1.5) (Bouchez et Devin, 2019; Chen *et al.*, 2011). Ce processus régule la création de nouvelles mitochondries dans le but de maintenir des dynamiques mitochondriales optimales. Il a été démontré que les ERO peuvent rendre défectueuse cette voie cellulaire en causant des perturbations au niveau de la signalisation de l'adénosine monophosphate cyclique et de la protéine kinase A (cAMP/PKA). Ces défauts sont associés avec une surproduction d'ERO mitochondriaux menant à des dommages cellulaires excessifs et à la suractivation de voies apoptotiques cellulaires (Bouchez et Devin, 2019). Somme toute, ce ne sont que deux exemples présentés pour démontrer l'impact pervers des ERO au niveau cellulaire ainsi que leur potentiel à être surproduits en

causant des défauts cellulaires. Les ERO, à forte concentration, sont capables d'affecter tous les systèmes cellulaires. À plus grande échelle, toutes ces perturbations de processus cellulaires engendrées par les ERO peuvent causer des problèmes de fonctionnement dans les tissus et, si assez sérieux, mener à la mort de l'individu par accumulation de dommages oxydatifs (Sies *et al.*, 2017). C'est pour cette raison qu'il y a un lien intime entre les ERO et une énorme quantité de pathologies telles que l'Alzheimer, le cancer, et la sclérose en plaques (Islam, 2017; Jelic *et al.*, 2021; Tönnies et Trushina, 2017).

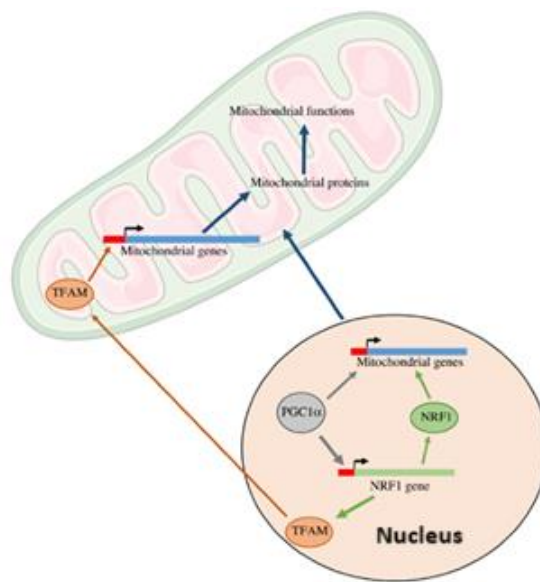


Figure 1.5 Régulation de la biogenèse mitochondriale. Sous régulation de PGC1 α , le facteur de respiration nucléaire 1 (NRF1) peut induire la biogenèse mitochondriale en stimulant la transcription de gènes mitochondriaux nucléaires. En parallèle, Nrf1 régule positivement le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM). TFAM se rend à la mitochondrie et stimule directement la transcription de gènes mitochondriaux dans le génome mitochondrial. Ces deux cascades augmentent la quantité de protéines mitochondriales et contribuent au bon fonctionnement du réseau énergétique cellulaire. Tiré de Bouchez & Devin (2019)

1.1.4 ERO à bas niveaux

À des niveaux homéostatiques plus bas, généralement 1-100nM (Sinenko *et al.*, 2021), les ERO sont des molécules essentielles dans la signalisation cellulaire, et affectent plusieurs processus tels que la croissance et différenciation cellulaire, la prolifération, l'activation ou la répression de facteurs de transcriptions, la migration et l'adhésion, les fonctions immunitaires et le métabolisme énergétique (Abo

et Weerapana, 2019; Averill-Bates, 2024; Sies *et al.*, 2022; Sies *et al.*, 2017; Thannickal et Fanburg, 2000; Vermot *et al.*, 2021; Villalpando-Rodriguez et Gibson, 2021). Tandis que ces molécules à base d'oxygène étaient originellement des produits secondaires inévitables dans le STE, les cellules modernes ont évolué pour pouvoir profiter du pouvoir oxydatif en tant que messenger signalétique puissant. C'est le cas au niveau de cascades cellulaires impliquant les protéines kinases telles que les protéine kinases activées par des mitogènes (MAPK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /protéine kinase B (Akt), et la kinase régulatrice du signal de l'apoptose (ASK1). Les ERO agissent aussi sur des facteurs de transcription comme le facteur d'hypoxie inductible 1 α (HIF-1 α), la protéine activatrice 1 (AP-1) ainsi que le facteur nucléaire activateur de cellules B (NF- κ B), qui lui est un régulateur maître de l'inflammation (Averill-Bates, 2024).

1.1.4.1 ERO et cancers

Dans les cellules cancéreuses, l'environnement cellulaire change énormément au niveau oxydatif. En comparaison à des cellules non cancéreuses, nous retrouvons un environnement beaucoup plus riche en ERO (Schieber et Chandel, 2014). Ce changement est causé par trois phénomènes en particulier. Premièrement, les cellules cancéreuses possèdent un métabolisme très élevé. L'effet Warburg, chez les cancers, est défini comme une favorisation importante de voies glycolytiques moins efficaces en production d'ATP que l'O₂PHOS. Cet effet permet la génération très rapide, mais inefficacement, d'ATP, alimentant en premier lieu la demande accrue en énergie causée par une prolifération et croissance non contrôlée (Dang, 2012; Schiliro et Firestein, 2021). De plus, certaines mutations oncogéniques (e.g. la GTPase K-Ras), ainsi que la perte de suppresseurs de tumeurs (e.g. p53), permettent une reprogrammation métabolique en augmentant le flux glycolytique et en promouvant des processus anaboliques (DeBerardinis et Chandel, 2016; Schiliro et Firestein, 2021). Finalement, il y a une régulation à la hausse de plusieurs voies métaboliques contrôlées par la cible mécanistique de la rapamycine (mTOR). Conséquemment, ces voies métaboliques alimentent les mitochondries en permettant la production excessive de substrats du cycle de Krebs, et donc de l'O₂PHOS, telle que la glutamine (DeBerardinis et Chandel, 2016). Considérant le lien proportionnel entre métabolisme, consommation d'oxygène, et ERO, ceci cause directement une augmentation significative d'éléments pro-oxydants (Perillo *et al.*, 2020). Deuxièmement, les cancers ont un taux de mutation génétique très élevé, causant des mutations pouvant induire une surproduction d'ERO par perturbation de systèmes régulateurs tels que la perte de suppresseurs de tumeurs comme p53, ou même de mTOR, ainsi que des kinases dépendantes des cyclines (CDKs) (Taylor *et al.*, 2018). Troisièmement, l'environnement des cellules cancéreuses au centre d'une tumeur solide est relativement hypoxique. Une prolifération élevée dans les tumeurs combinée avec un

vascularisation pauvre qui ne peut suivre la croissance promeut un environnement pauvre en oxygène (Bae *et al.*, 2024). L'hypoxie est connue comme facteur aggravant la surproduction d'ERO (Perillo *et al.*, 2020). Le manque d'oxygène accentue l'échappement des électrons du STE par manque d'accepteur final (Bae *et al.*, 2024). À première vue, ceci peut sembler désavantageux, mais la cellule cancéreuse a su profiter de cette modification. L'augmentation de la concentration en ERO chez les cancers cause une accélération importante de la division et de la prolifération cellulaire (Figure 1.6) (Schieber et Chandel, 2014). En inhibant la protéine suppresseur de tumeur p53, et en suractivant, à l'aide d'ERO, les facteurs d'induction d'hypoxie (HIF), PI3K, MAPK ainsi que NF- κ B, les cancers peuvent se maintenir dans un environnement oxydatif qui favorise massivement la prolifération cellulaire (Schieber et Chandel, 2014).

Cette favorisation de la croissance et prolifération non contrôlée chez les cancers est le facteur principal qui les rend si dangereux. Pour maintenir cette croissance de manière indéfinie, les cancers requièrent une quantité croissante de nutriments tels que le glucose et les acides aminés. Ils vont chercher ces nutriments chez l'hôte dans lequel ils se retrouvent (American Cancer Society, 2024). En forçant l'angiogenèse excédentaire chez l'hôte, les cancers créent des voies « express » par lesquelles de plus en plus de nutriments sont acheminés vers la tumeur. L'hypoxie de l'environnement tumoral stimule le relâchement du facteur inductible d'hypoxie 1 (HIF-1). HIF-1 promeut la production de plusieurs facteurs pro-angiogéniques, le plus important étant le facteur endothélial de croissance vasculaire 1 (VEGF1). Par ce processus, les cellules endothéliales, présentes dans les vaisseaux sanguins, migrent lentement vers la tumeur pour créer de nouveaux vaisseaux sanguins, permettant la vascularisation de la tumeur et donc l'apport en nutriments (Nishida *et al.*, 2006). À long terme, ceci perturbe les fonctions homéostatiques de l'hôte soit par manque adéquat de nutriments envers les cellules saines, ou par perturbations physiques des fonctions, telle qu'une compétition pour l'espace présent dans le corps entre la tumeur et l'organe original, causées par un agrandissement constant de la tumeur (Schieber et Chandel, 2014). De plus, les cancers ont développé plusieurs mécanismes par lesquels ils peuvent s'évader du système immunitaire de l'hôte (Galluzzi *et al.*, 2017). Ces mécanismes peuvent impliquer l'évasion de la reconnaissance des antigènes par le système immunitaire (Kim et Cho, 2022), l'inhibition immunitaire par régulation à la hausse de molécules « checkpoint » comme PD-L1 (Kim et Cho, 2022), ou même la création de barrières physiques empêchant l'accès aux cellules T (Ghorani *et al.*, 2023). Cette combinaison d'une croissance non contrôlée causée, en partie, par une surproduction d'ERO, ainsi que du pouvoir d'évasion envers le système immunitaire rend les cancers parmi les pathologies les plus dangereuses chez l'humain.

Cependant, pour maintenir un environnement si riche en ERO, qui favorise la croissance et la prolifération, les cancers doivent pouvoir contrôler à la baisse la concentration d'ERO. Tout comme des cellules saines, les cancers ne sont pas immunisés envers le pouvoir oxydatif des ERO. Si le niveau d'ERO devient trop élevé, tout comme dans n'importe quelle cellule, l'environnement devient cytotoxique et peut causer la mort cellulaire. Il est donc encore plus important de pouvoir contrôler ce couteau à double tranchant dans une cellule cancéreuse. Pour ce faire, il y a une surexpression importante du facteur de transcription maître du système antioxydant chez les cancers : « Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 » (Nrf2) (Figure 1.6) (Schieber et Chandel, 2014). Nos connaissances actuelles de cette protéine ainsi que son rôle au sein du cancer seront discutées dans le prochain chapitre de l'introduction.

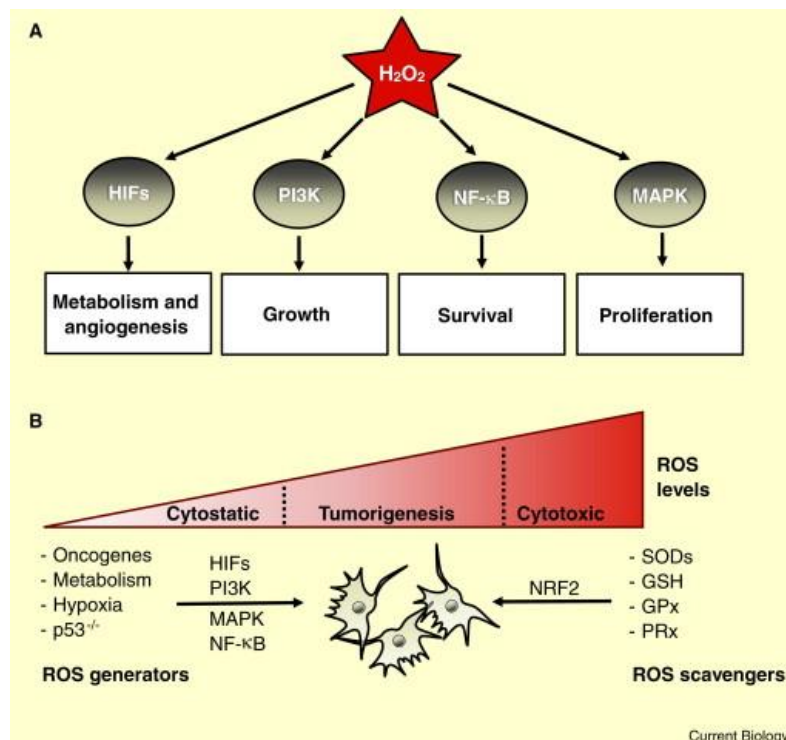


Figure 1.6 Les ERO dans les cellules saines et cancéreuses. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) régule directement plusieurs processus cellulaires (A). Le métabolisme et l'angiogenèse sont sous contrôle des facteurs d'hypoxie inducibles (HIFs). La prolifération est régulée par la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Le facteur nucléaire kappa-B (NF- κ B), régulateur maître de l'Inflammation, régule la survie cellulaire. Finalement, les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) contrôlent la prolifération. En temps normal, ces processus sont finement maîtrisés, mais dans une cellule cancéreuse (B), la présence d'oncogènes, l'augmentation du métabolisme, l'environnement hypoxique, ainsi que la perte de suppresseurs de tumeurs (p53) causent une augmentation significative d'ERO. Ceci a pour effet de suractiver tous les processus ci-hauts, et promouvoir la tumorigenèse. En contrepartie, Nrf2 permet de maintenir l'état rédox de la cellule sous un seuil critique en suractivant les antioxydants tels que les superoxyde dismutases (SODs), la glutathion (GSH), la glutathion peroxydase (GPx), et les peroxyrédoxines (Prx) Tiré de Schieber & Chandel (2014)

1.2 Nrf2

1.2.1 Structure et Régulation de Nrf2

1.2.1.1 Structure de Nrf2

Nrf2 est un facteur de transcription présent dans toutes les cellules chez les mammifères (Averill-Bates, 2024; Ngo et Duennwald, 2022). Il est encodé par le gène *NFE2L2* et fait partie de la famille de protéines de type « leucine zipper » (Moi *et al.*, 1994). Cette famille est caractérisée par un double motif bZip (« basic-region Leucine Zipper ») de 60 à 80 acides aminés en longueur avec des répétitions de résidus leucine qui sont essentielles pour lier l'ADN. En particulier, cette glissière de leucine assure sa dimérisation avec ses protéines régulatrices, tandis que le domaine basique lui-même assure la liaison à l'ADN (Ngo et Duennwald, 2022). Nrf2 a un poids moléculaire d'environ 90-110 kDa selon le type de gel utilisé pour la détecter (Lau *et al.*, 2013). Nrf2 possède 7 domaines très conservés nommés « domaines d'homologie NRF2-ECH » ou Neh (1 à 7) (Figure 1.7) (Saha *et al.*, 2020). Chaque domaine contribue à des fonctions différentes. Le domaine Neh1 est de type CNC-bZip et permet à Nrf2 de créer des hétérodimères avec des petites protéines Maf (sMaf) (Kannan *et al.*, 2012; Motohashi *et al.*, 2004). Le domaine Neh2 permet à Nrf2 de se lier à son répresseur Keap1 (Motohashi et Yamamoto, 2004). Le domaine carboxy-terminal Neh3 est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle des cibles de Nrf2 (Nioi *et al.*, 2005). Les domaines Neh4 et Neh5 possèdent aussi des caractéristiques permettant l'activation transcriptionnelle. Cependant, ces deux domaines se lient à différentes cibles de type « cAMP Response Element Binding Protein » ou CREB (Motohashi et Yamamoto, 2004). Le domaine Neh6 contient un dégron permettant la dégradation de Nrf2 de manière indépendante des ERO et de Keap1 (McMahon *et al.*, 2004). Finalement, le domaine Neh7 est impliqué dans la répression de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 en permettant l'association à la protéine nommée « Retinoid X receptor α » (RAR α) (Tonelli *et al.*, 2018).

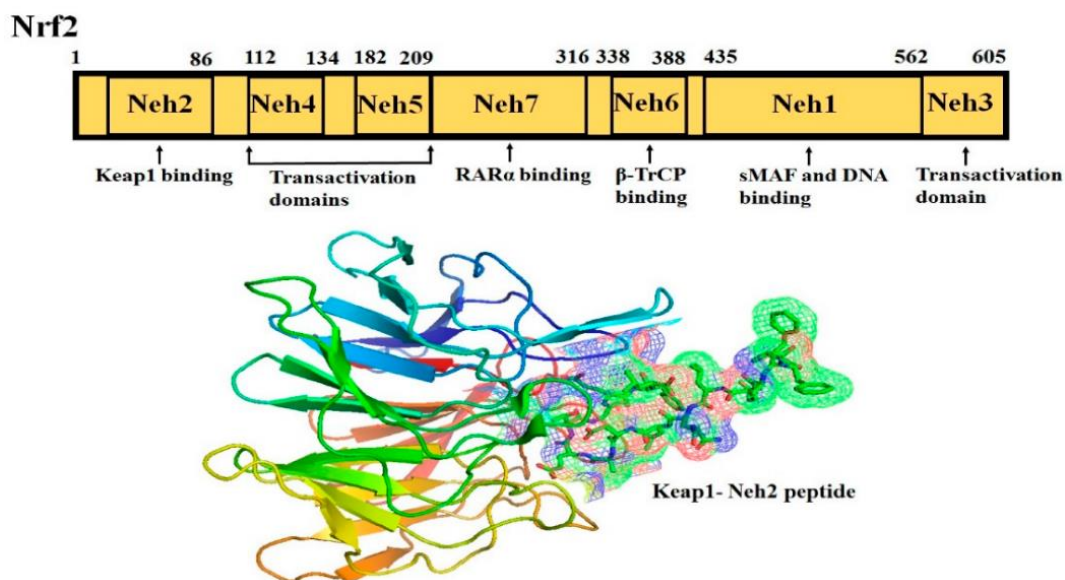


Figure 1.7 La structure des domaines Neh de Nrf2 ainsi qu’une visualisation 3D de la liaison Neh2-Keap1. Neh1 permet la liaison aux protéines sMAF et à l’ADN. Neh2 permet la liaison au régulateur négatif Keap1. Neh3 est un domaine de transactivation des cibles de Nrf2. Neh4 et Neh5 se lient à différentes cibles de type CREB que Neh3. Neh6 régule la dégradation ERO- et Keap1-indépendante de Nrf2 par liaison aux ubiquitines ligases de type β -TrCP. Finalement, Neh7 réprime l’activité de Nrf2 en se liant au rétinol x récepteur alpha (RAR α). Tiré de Saha *et al.* (2020)

1.2.1.2 Dégradation de Nrf2

L’importance de Nrf2 dans le contexte de cette thèse réside dans le fait qu’il est le régulateur maître de la réponse antioxydante (Figure 1.8). Sous conditions homéostatiques basales, Nrf2 est cytosolique et est lié par deux protéines de Keap1 dans un hétérodimère. Keap1 agit comme répresseur et permet la dégradation protéasomale de Nrf2 via poly-ubiquitination par l’ubiquitine ligase de type E3 CUL3 (Averill-Bates, 2024). La demi-vie moyenne de Nrf2 en condition de base est d’environ 20 min (Kobayashi *et al.*, 2004). Cette dégradation rapide assure les fonctions liées à l’homéostasie sans activer les réponses de stress (He *et al.*, 2020b). Keap1 possède plusieurs résidus de cystéine, et ceux-ci sont sensibles à l’oxydation par les ERO. En condition de stress oxydatif, le lien Nrf2-Keap1 est déstabilisé. Spécifiquement, les ERO vont oxyder, entre autres, les résidus de cystéine C226, C613, C622, et C624. Cette oxydation modifie la conformation de Keap1 spécifiquement en ciblant les groupes sulfhydryles des résidus de cystéine, et réduit l’affinité de Nrf2 pour deux domaines répétés de glycine (DGR) de Keap1 (Baird et Yamamoto, 2020; Suzuki *et al.*, 2023) et permet la dissociation de Nrf2 de l’homodimère Keap1.

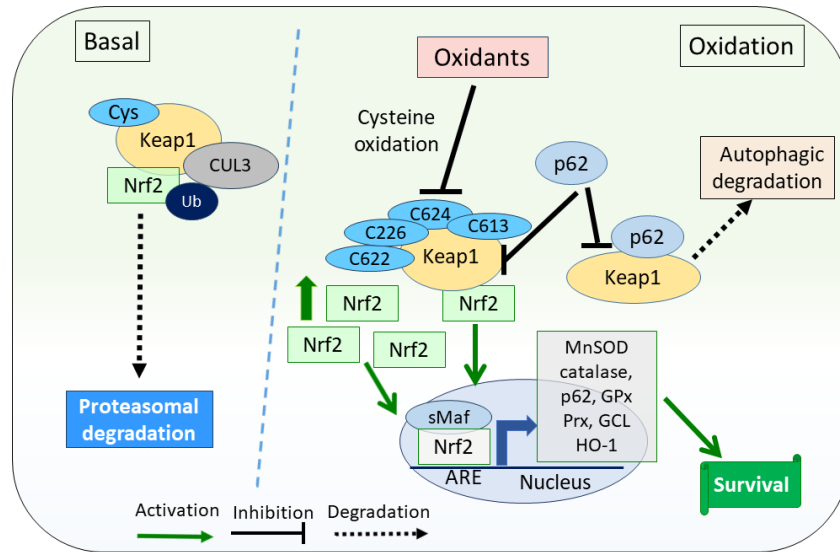


Figure 1.8 Cascade cellulaire principale de Nrf2 dans la réponse antioxydante. En conditions de base (à gauche de la ligne bleue), Nrf2 est liée à son répresseur, Keap1. Les résidus cystéiques (Cys) ne sont pas affectés. De plus, l'ubiquitine ligase CUL3 (CUL3) permet l'ajout d'ubiquitine (Ub), destinant ce complexe protéique à une dégradation par un protéasome. Lors de conditions produisant un stress oxydatif (à droite de la ligne bleue), les résidus cystéiques C226, C613, C622, et C624 sont oxydés par les ERO. Cette oxydation permet la dissociation de Nrf2 de Keap1. Parallèlement, la protéine p62, inhibitrice de Keap1, va s'y lier, et la mener vers une dégradation autophagique. Nrf2, une fois dissociée, pénètre dans le noyau cellulaire, et se lie aux éléments de réponse antioxydants (ARE) à l'aide de protéines sMaf. En conséquence, il y a une transcription de plusieurs gènes cibles de Nrf2, tels que le manganèse superoxyde dismutase (MnSOD), la catalase, p62, la glutathion peroxydase (GPx), les peroxyrédoxines (Prx), le glutamate-cystéine ligase (GCL), et l'hème-oxygénase 1 (HO-1). Ceci promeut la survie cellulaire dans les conditions cytotoxiques de stress oxydatif. Tiré de Averill-Bates (2024)

Il existe aussi des mécanismes qui agissent sur la stabilité Nrf2-Keap1 de manière indépendante des résidus cystéine de Keap1. Le complexe protéique p62/SQSTM1, le dipeptidyl peptidase 3 (DPP3), ainsi que le gène de tumeur Wilms sur le chromosome X (WTX) contiennent toutes des régions pouvant interagir avec Keap1. Ainsi, ils compétitionnent avec Nrf2 pour se lier à Keap1 et, indépendamment de modifications aux cystéines, perturbent la formation de l'hétérodimère Keap1-Nrf2, permettant ainsi à Nrf2 de rester libre (He *et al.*, 2020b). À noter qu'il existe des voies de dégradation de Nrf2 indépendantes de Keap1, telles que la voie impliquant la glycogène synthase kinase-3 (GSK3) phosphorylant les motifs DSGIS et DSAPGS dans le domaine Neh6 (Hayes *et al.*, 2015). Cette phosphorylation mène à une réduction de sa stabilité. Parallèlement, il y a aussi l'ubiquitine ligase E3 HRD1, pouvant se lier aux domaines Neh4/Neh5, ainsi stimulant l'ubiquitination de Nrf2 (Wu *et al.*, 2014). Cependant, la voie impliquant Keap1

est de loin le mécanisme principal par lequel Nrf2 est régulé à la baisse et maintenu à des niveaux homéostatiques dans les cellules mammifères (He *et al.*, 2020b).

1.2.1.3 Nrf2 après sa dissociation de Keap1

Après sa dissociation de Keap1, Nrf2 s'accumule dans le cytosol et se dimérise avec des sMaf (MafK, MafG, ou MafF) (Motohashi *et al.*, 2004). Ce dimère est reconnu par des récepteurs d'importeurs nucléaires tels qu'importine α/β . Ces récepteurs reconnaissent le signal de localisation nucléaire présent chez Nrf2 et le transloquent du cytosol vers l'intérieur du noyau (Motohashi *et al.*, 2004). Une fois transloqué, Nrf2 se lie à des éléments de réponses antioxydantes (ARE). Ce sont des séquences génétiques reconnues par Nrf2 qui sont présentes dans les promoteurs de plusieurs gènes antioxydants. Une fois liée, Nrf2 stimule l'expression de gènes antioxydants qui permettent à la cellule de revenir à un état homéostatique en réduisant les ERO. Les gènes cibles de Nrf2 incluent le manganèse superoxyde dismutase (MnSOD), la catalase, p62, la glutathion peroxydase (GPx), les peroxyredoxines (Prx), la glutamate-cystéine ligase (GCL), et l'hème-oxygénase 1 (HO-1) (Averill-Bates, 2024; Grondin *et al.*, 2024). Cette liste n'est pas exhaustive et représente une partie des nombreuses cibles trouvées à présent. De plus, Nrf2 peut aussi moduler l'expression de certains gènes via des séquences plus distantes, mais ceci demeure un mécanisme moins présent que les ARE (Motohashi et Yamamoto, 2004). Le système antioxydant cellulaire contient énormément de cascades cellulaires complexes et, année après année, de nouvelles cibles qui interagissent avec Nrf2 sont découvertes.

Ces antioxydants peuvent être enzymatiques. Ceci inclut le SOD, la GPx, et les thioredoxines (Trx) (Sun *et al.*, 2020). Ils peuvent aussi être non-enzymatiques comme le glutathion (GSH), la mélatonine (MEL), ou l'acide ascorbique (Vitamine C ou AsA) (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018). Fonctionnellement, les antioxydants enzymatiques catalysent la neutralisation des ERO via des réactions différentes. Par exemple, la SOD transforme le superoxyde en peroxyde d'hydrogène en catalysant la réaction suivante : $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Ensuite, la catalase convertit le H_2O_2 en eau via la réaction suivante : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (Sun *et al.*, 2020). Ces enzymes requièrent souvent des cofacteurs comme le sélénium, le fer, le cuivre, le zinc, ou le manganèse. Tel est le cas du MnSOD. De plus, ces antioxydants ne sont pas dégradés après une utilisation et peuvent être réutilisés. Une fois oxydées, ces enzymes doivent être réduites à nouveau avant de pouvoir servir comme antioxydants (Sun *et al.*, 2020).

De l'autre côté, les antioxydants non-enzymatiques fonctionnent plus directement sur les ERO. Ils ne catalysent pas des réactions de neutralisation d'ERO. Ils vont donner des électrons ou des atomes d'hydrogène pour neutraliser l'espèce réactive de l'oxygène en créant une molécule moins réactive (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018). Un exemple concret implique le GSH. Cet antioxydant va réagir avec l'ERO en leur procurant un don d'électrons ou d'atomes d'hydrogène, se transformant en sa forme oxydée de GSSG. Une fois transformée, elle peut être régénérée et réduite, à l'aide de la NADPH, par la glutathion réductase (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018). Ce ne sont pas tous les antioxydants non-enzymatiques qui se régénèrent. Certaines, comme la mélatonine, forment un produit oxydé non utilisable et sont donc consommés après une seule utilisation (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018). Sommairement, le système général antioxydant de la cellule peut prendre plusieurs formes, mais il est toujours sous contrôle du régulateur maître Nrf2.

1.2.1.4 Régulation de Nrf2 autre que par Keap1

Nrf2 n'est pas seulement régulé par son lien à Keap1 (Figure 1.8). *Nrf2* peut subir d'importantes régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles qui peuvent fortement modifier son activité. Des microARNs (miARN), d'une longueur moyenne de 22 nucléotides (He *et al.*, 2020b), peuvent se lier à l'ARN messager (ARNm) de Nrf2 et réprimer sa traduction. Précisément, miR-144 (Sangokoya *et al.*, 2010), miR-28 (Yang *et al.*, 2011), miR34 (Li *et al.*, 2011), miR-93 (Singh *et al.*, 2013), ainsi que miR153 (Wang *et al.*, 2016) ont été impliqués dans la régulation négative de Nrf2 en s'associant à son ARNm. Cette association modifie le taux de dégradation de l'ARNm de Nrf2 et peut perturber la tolérance au stress en réduisant son activité antioxydante dans les érythroïdes (He *et al.*, 2020b). D'autres interacteurs liant l'ARNm de Nrf2 peuvent avoir un impact positif sur son expression. Par exemple, deux protéines avec un domaine liant l'ARN (RBDd), soit l'antigène humain R (HuR) et la protéine liant l'ARN riche en éléments AU 1 (AUF1) peuvent avoir un effet stimulant sur l'activité de Nrf2. Ils se lient à la région 3' non traduite (3'-UTR) de l'ARNm de Nrf2. HuR permet la maturation plus rapide de l'ARNm résultant en une expression élevée de Nrf2 (Poganik *et al.*, 2019). De son côté, AUF1 permet la stabilisation de l'ARNm et résulte en une demi-vie plus longue. Ceci a pour effet d'augmenter la traduction de Nrf2 avant que l'ARNm soit dégradé (Poganik *et al.*, 2019).

Au niveau post-traductionnel, Nrf2 peut subir plusieurs modifications. Premièrement, nous retrouvons la phosphorylation. Les protéines kinases reliées aux signaux extra-cellulaires (ERK), la N-terminal c-jun kinase (JNK), le complexe PI3K-AKT, la protéine kinase C (PKC), la caséine kinase (CK2) ainsi que la protéine

kinase R reliée au réticulum endoplasmique kinase (PERK) peuvent tous phosphoryler Nrf2. Ceci a comme impact de stabiliser la protéine et promouvoir son activité transcriptionnelle subséquente (He *et al.*, 2020b). Au contraire, la phosphorylation de différents résidus d'acides aminés causée par p38 et GSK3 contribue à réduire la stabilité de Nrf2, menant à une demi-vie plus courte ainsi qu'à une réduction de son action transcriptionnelle (Hayes *et al.*, 2015).

Deuxièmement, Nrf2 peut aussi subir une acétylation pour réguler son activité dans certains tissus/cellules. Une étude récente a démontré que, dans un modèle murin, l'utilisation de l'agent pharmacologique « Echinacoside » (ECH) dans l'hippocampe suivant un accident cérébral vasculaire peut réduire les symptômes de dépression vécus par les animaux. Spécifiquement, son action passe par une suractivation de Nrf2 (Yang *et al.*, 2024). Cette suractivation est associée à l'acétylation de Nrf2. Comme conséquence, l'affinité de Nrf2 pour la protéine se liant à CREB (CBP) est augmentée, et ceci mène à la surexpression du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), qui induit un effet protecteur contre la dépression (Yang *et al.*, 2024). Au contraire, il a déjà été démontré que le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), régulateur principal de l'inflammation, peut réprimer l'activité de Nrf2 dans certains contextes en causant son hypo-acétylation (Wang *et al.*, 2022a).

Troisièmement, l'activité de Nrf2 peut être significativement influencée par des processus de glycation/dé-glycation. La glycation, brièvement, est un processus non-enzymatique par lequel des protéines se lient avec des sucres, tels le glucose, fructose, leurs dérivés phosphatés, ou des composés reliés au sucre comme l'acide ascorbique et le glyoxale (Uceda *et al.*, 2024). Lorsque Nrf2 est glyqué, sa capacité à se lier aux sMAF, et subséquemment à lier les ARE dans le noyau, est diminuée. La dé-glycation, spécifiquement par la fructosamine-3-kinase, permet de stabiliser Nrf2 en excisant les composés déstabilisants (Sanghvi *et al.*, 2019).

1.2.1.5 La régulation fine de Nrf2

Nrf2 possède autant de mécanismes régulatoires, car sa voie cellulaire est primordiale et se doit d'être finement contrôlée (He *et al.*, 2020b). En tant qu'élément essentiel à la survie cellulaire (Bellezza *et al.*, 2018; Deramaudt *et al.*, 2013; Sies *et al.*, 2017; Sies et Jones, 2020), Nrf2 est exprimé face à plusieurs types de stress cellulaires. Ces stress peuvent être abiotiques ou biotiques (He *et al.*, 2020b). Au niveau biotique, Nrf2 est exprimé lorsqu'il y a présence excessive d'inflammasomes. Nrf2 et NF- κ B jouent des rôles opposés ici (Figure 1.9). NF- κ B stimule fortement l'inflammation et peut réprimer l'activité de Nrf2, tandis que Nrf2

peut réguler l'inflammation à la baisse en stimulant la production de HO-1, entre autres (Saha *et al.*, 2020). HO-1, une fois activée, peut ensuite augmenter la production d'antioxydants ainsi que de cytokines anti-inflammatoires. Brièvement, HO-1 dégrade l'hème, et un des produits de cette dégradation, soit la bilirubine, possède des propriétés antioxydantes puissantes. Ainsi, l'hème, fortement pro-oxydante comme molécule, devient un produit antioxydant via l'activité Nrf2-dépendante de HO-1 (Chiang *et al.*, 2021). Nrf2 agit aussi plus directement en réduisant l'activation ERO-dépendante de NF- κ B, menant à une réduction notée dans le niveau de cytokines pro-inflammatoires (Bellezza *et al.*, 2010). Finalement, Nrf2 régule la dégradation protéasomale et la translocation de NF- κ B en agissant sur son régulateur, I κ B- α (Saha *et al.*, 2020). Cette régulation de l'inflammation par Nrf2 permet de contrôler les effets néfastes causés par les éléments biotiques pro-inflammatoires, tels que les bactéries ou les virus. Une sur-inflammation causerait plus de dommages que de bienfaits. Il est donc crucial de maintenir en places des mécanismes pouvant atténuer l'inflammation directement au besoin. L'axe opposé de Nrf2/NF- κ B est non seulement actif lors d'infections pathologiques; il est particulièrement suscité dans les cancers. En général, l'environnement d'un cancer est élevé en ERO, est pro-inflammatoire, et requiert une fine modulation des ERO ainsi que de l'inflammation via les voies de Nrf2 et NF- κ B (Bellezza *et al.*, 2010). Il a été démontré que lorsqu'une ou l'autre de ces deux voies cellulaires sont expérimentalement inhibées dans un modèle murin, l'autre voie est suractivée. Ceci suggère une régulation négative double dans laquelle Nrf2 atténue l'inflammation via NF- κ B, tandis que NF- κ B permet de maintenir l'activité pro-inflammatoire en supprimant Nrf2 (Bellezza *et al.*, 2010).

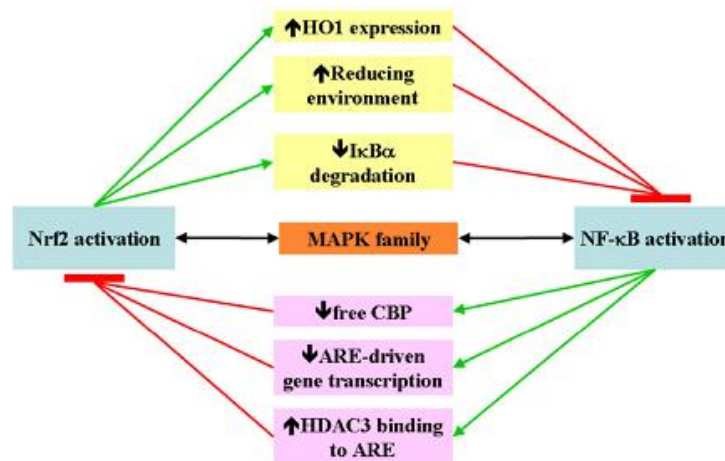


Figure 1.9 Le rôle inverse de Nrf2 et NF- κ B au sein de la cellule. Nrf2 et NF- κ B jouent un rôle opposé. Nrf2 stimule la production de l'hème-oxygénase 1 (HO1), créant un environnement cellulaire plus réducteur. De plus, Nrf2 réduit la dégradation de « nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha » (I κ B α). Ces trois facteurs agissent ensemble pour inhiber la transcription et l'activité de NF- κ B. Au contraire, NF- κ B réduit la

quantité libre de protéines liant CREB (CBP), la transcription Nrf2-dépendante de gènes contenant un élément de réponse antioxydant (ARE), et promeut l'inactivation des ARE en les liant avec l'histone désacétylase 3 (HDAC3). Ainsi, l'activité de Nrf2 est réprimée. Le jeu entre ces deux protéines crée une balance finement modulable. Tiré de Belleza *et al.* (2010)

Malgré la présence importante de Nrf2 au niveau biotique, cet axe cellulaire est primordial pour répondre aux stress abiotiques. Ces stress incluent la radiation (Leach *et al.*, 2001; Sies et Jones, 2020), l'hypoxie (Averill-Bates, 2024; Hu *et al.*, 2018), les métaux lourds (Emami *et al.*, 2022; Fu et Xi, 2020), les agents pharmacologiques/chimiques (Dinkova-Kostova et Talalay, 2008), le froid (Zakic *et al.*, 2023) ainsi que la chaleur (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). Considérant la large gamme de stress pouvant induire Nrf2, les mécanismes d'activation menant à la voie de Nrf2 seront brièvement détaillés.

Au niveau chimique, dépendamment du type de stress, la dissociation du lien Nrf2-Keap1 peut être stimulée par l'oxydation de différents résidus de cystéine (Figure 1.10) (Suzuki et Yamamoto, 2017). Les agents chimiques peuvent inclure les ERO, les métaux lourds, ainsi que plusieurs composés ayant une interaction directe sur la stabilité de Keap1-Nrf2. L'avantage de ce système réside dans le fait qu'un hétérodimère relativement simple peut reconnaître et réagir à un large gamme de stress différents par le même mécanisme. Nous pouvons séparer les agents chimiques en cinq catégories distinctes (Figure 1.10 pour un bref résumé des cinq catégories) (Suzuki et Yamamoto, 2017). Quatre des catégories impliquent des activateurs électrophiliques visant les différents résidus cystéiques sur Keap1. La première catégorie implique des composés favorisant l'interaction avec Cys151. La deuxième favorise Cys288. La troisième met de l'avant les interactions impliquant Cys151/Cys273/Cys288 en parallèle. La quatrième implique l'interaction avec tout autre résidu cystéine indépendamment de Cys151/Cys273/Cys288. La dernière classe (Class V dans la Figure 1.10) regroupe des activateurs non-électrophiliques qui déstabilisent l'interaction protéine-protéine entre Keap1 et Nrf2.

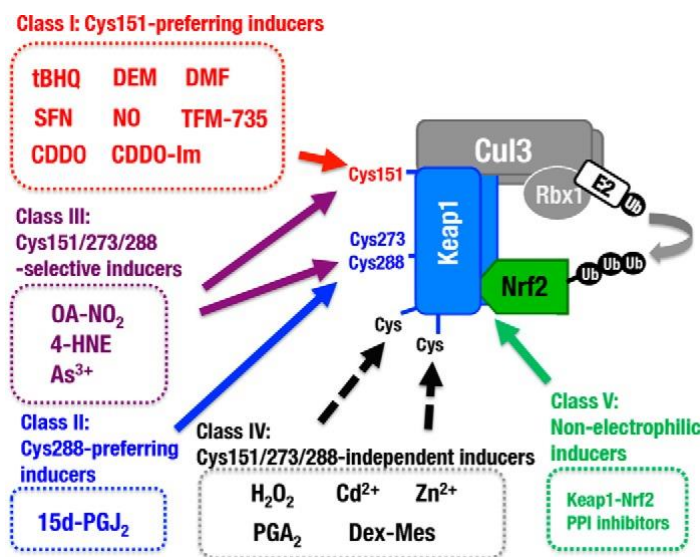


Figure 1.10 Les différents stress chimiques induisent l'oxydation de résidus de cystéine distincts sur Keap1. Il existe cinq catégories d'agents chimiques pouvant déstabiliser l'hétérodimère Keap1-Nrf2. La classe I (Class I) implique les agents agissant sur la cystéine 151 (Cys151), comme le tert-butylhydroquinone (tBHQ), le diéthyl maléate (DEM), le diméthyle fumarate (DMF), le sulforaphane (SFN), l'oxyde nitrique (NO), l'agent synthétique TFM-735 (TFM-735), l'agent pharmacologique CDDO (CDDO), et l'imidazolid CDDO (CDDO-Im). La classe II (Class II) regroupe les inducteurs préférant la cystéine 288 (Cys288), comme le 15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ₂). La classe III regroupe les agents agissant sur les cystéines 151/273/288 en parallèle (Cys151/273/288), comme l'acide nitro-oléique (OA-NO₂), le 4-Hydroxynonenal (4-HNE), et l'arsenic 3+ (As³⁺). La classe IV (Class IV) implique des activateurs via des cystéines indépendantes de Cys151/273/288. Nous retrouvons ici le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le Cadmium 2+ (Cd²⁺), le Zinc 2+ (Zn²⁺), la prostaglandine A2 (PGA₂), et le dexaméthasone (Dex-Mes). Finalement, la classe V (Class V) implique les activateurs non-électrophiliques qui déstabilisent l'interaction protéine-protéine entre Nrf2 et Keap1 (Keap1-Nrf2 PPI Inhibitors). Cul3 : Ubiquitine ligase E3 Cul3, Ub : Ubiquitine, E2 : Enzyme conjuguant l'ubiquitine E2, Rbx1 : protéine RING-box 1. Tiré de Suzuki & Yamamoto (2017)

1.2.2 Nrf2 et la radiation

L'impact de Nrf2 sur le stress induit par radiation est largement affecté par le type de cellule/tissus. Dans la moelle osseuse, la présence de Nrf2 est cruciale pour la survie de cellules souches hématopoïétiques. L'inhibition de Nrf2 sensibilise fortement ces cellules sanguines à la radiation (Cameron *et al.*, 2018). Au contraire, dans les cellules épithéliales intestinales, une déplétion de Nrf2 semble potentialiser la survie cellulaire face à un stress de radiation (Cameron *et al.*, 2018). Ainsi, le rôle de Nrf2 au sein de ce stress semble fortement influencé par le type cellulaire. En général, l'effet protecteur de Nrf2 au niveau de la radiation passe par une détoxification antioxydante protégeant l'intégrité de l'ADN cellulaire. L'énergie apportée par la radiation va scinder une molécule d'eau créant plusieurs ERO et des électrons libres. Les électrons libres réagissent avec le dioxygène créant du superoxyde. Il y a aussi formation de peroxyde

d'hydrogène, et le potentiel de former le radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Ces ERO viennent oxyder les résidus de cystéine sur Keap1 permettant la dissociation de Nrf2 (tel que décrit plus tôt) menant à une expression de gènes antioxydants impliquant le superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion, et la thioredoxine (Liu *et al.*, 2022b). Le lien entre la radiation et Nrf2 est particulièrement intéressant dans le contexte de thérapies anticancers, car l'inhibition de Nrf2 pourrait potentialiser les traitements de radiothérapies dans certains cancers solides, comme le cancer du sein (Figure 1.11) (Qin *et al.*, 2021).

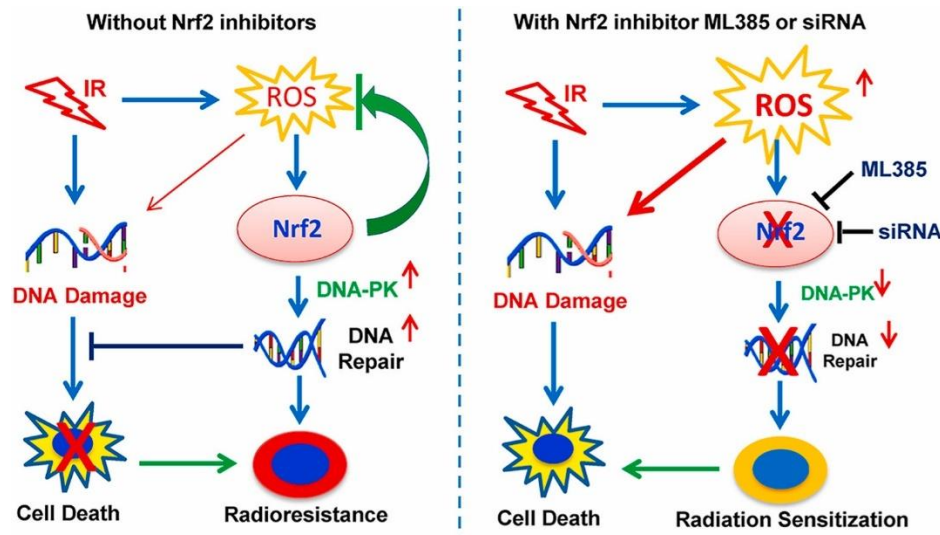


Figure 1.11 L'inhibition de Nrf2 potentialise les traitements de radiations dans le cancer du sein. Lorsque Nrf2 est activé (à gauche), il agit pour réduire la quantité d'ERO (ROS) induits par radiation (IR). La radiation cause aussi des dommages à l'ADN (DNA Damage). Nrf2 active les protéines kinases dépendantes de l'ADN (DNA-PK), et promeut la réparation des dommages causés par la radiation, menant à une résistance cellulaire face aux traitements de radiation. Lorsque Nrf2 est inhibé chimiquement avec l'inhibiteur ML385, ou génétiquement avec de l'ARN interférant (siRNA) (à droite), il ne réduit pas la quantité d'ERO, et ne stimule pas les DNA-PK. Suivant cela, les dommages à l'ADN s'accumulent et mènent à la mort cellulaire par radiation. Tiré de Qin *et al.* (2021)

1.2.3 Nrf2 et l'hypoxie

L'hypoxie, caractérisée par une réduction dans la disponibilité de l'oxygène, a contre intuitivement la tendance à stimuler la production d'ERO (Chen *et al.*, 2018). En conditions de normoxie, le STE fonctionne avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons (voir Origine mitochondriale des ERO). Lors de l'hypoxie, l'accepteur terminal d'électron devient limité causant des dommages au STE. Considérant ce manque, les électrons ont tendance à s'échapper du STE et à se lier à l'oxygène libre, créant non seulement une réduction en ATP utilisable, mais aussi une augmentation proportionnelle importante dans le niveau

d'ERO (Liu *et al.*, 2020). En particulier, l'accumulation du superoxyde devient problématique. Ce radical libre a un impact direct sur la membrane mitochondriale. Il oxyde les lipides membranaires, causant une augmentation de la perméabilité. Ceci résulte en une baisse du potentiel membranaire mitochondrial. L'instabilité de la membrane causée par la perméabilité accrue permet au cytochrome *c*, habituellement présent à dans l'espace intermembranaire mitochondrial, de s'échapper et d'induire l'apoptose cellulaire via caspase 3 (Jiang et Wang, 2004; Liu *et al.*, 2020). Le contrôle du superoxyde mitochondrial, formé en condition d'hypoxie, est alors essentiel pour permettre la survie de la cellule. Sans considérer les facteurs inductibles d'hypoxie (HIF), le superoxyde mitochondrial créé entraînera la déstabilisation de l'hétérodimère Keap1-Nrf2 par oxydation de cystéine. Ainsi, il y aura alors une activation de la voie cellulaire antioxydante dans l'optique de ramener le niveau de superoxyde à des niveaux homéostasiques (Bae *et al.*, 2024).

1.2.4 Nrf2 et les métaux

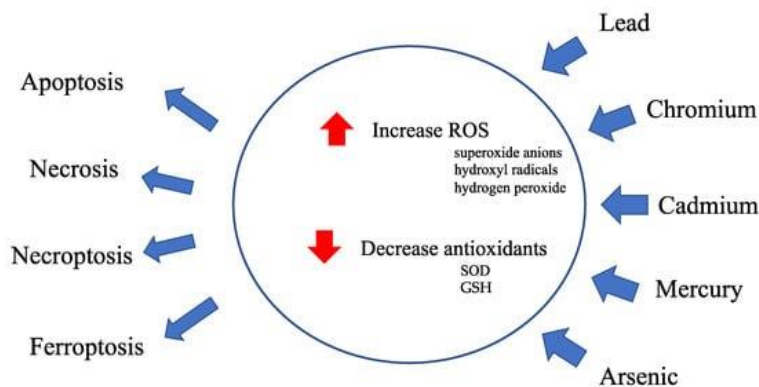


Figure 1.12 Résumé bref de l'impact cellulaire d'une exposition à des métaux lourds. Les métaux lourds augmentent le niveau d'ERO telles que le superoxyde, le radical hydroxyle, et le peroxyde d'hydrogène. Parallèlement, il y a une réduction du niveau cellulaire d'antioxydants comme la superoxyde dismutase (SOD), ou le glutathion (GSH). Conséquemment, il y a une induction de la mort cellulaire par voie d'apoptose, de nécrose, de nécroptose, ou de ferroptose. Tiré de Koyama *et al.* (2024)

Les métaux lourds sont omniprésents dans notre environnement et leur présence est amplifiée par l'activité anthropique (Tripathi *et al.*, 2024). Les métaux lourds les plus communs incluent le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le mercure (Hg), et le chrome (Cr), le fer (Fe), et le cuivre (Cu) (Figure 1.12) (Tripathi *et al.*,

2024). L'effet des métaux lourds peut être très variable et dépend entièrement de la concentration environnementale ainsi que du métal spécifique auquel la cellule est exposée. Par exemple, le cadmium, un contaminant industriel commun, est présent dans le tabac et, en moins grande partie, dans certains aliments (Tripathi *et al.*, 2024). Après consommation, il y a une bioaccumulation continue de ce métal. Il a été démontré que l'activation cellulaire de Nrf2 peut être dose-dépendante à la concentration de cadmium. Le cadmium peut se lier à des groupes sulfhydryles (-SH) de protéines. Ceci inclut les protéines mitochondriales (Branca *et al.*, 2020). Spécifiquement, le cadmium se lie au CI et cause un blocage menant à l'échappement des électrons du STE via le CI. Il peut aussi causer une inversion du flux d'électrons du CII vers le CI menant à l'échappement des électrons (Branca *et al.*, 2020). L'accumulation de ces électrons échappés causent la formation du superoxyde telle que décrite ci-haut. Sans système antioxydant, le superoxyde peut causer le relâchement de cytochrome c et la mort cellulaire via la caspase 3, mais potentiellement aussi par nécrose, nécroptose ou ferroptose (Figure 1.12) (Koyama *et al.*, 2024).

En contrepartie, il a déjà été démontré que le Cd peut inactiver la SOD, tandis que le Hg peut perturber l'activité de la GPx (Koyama *et al.*, 2024; Tripathi *et al.*, 2024). Les métaux lourds vont aussi se lier au GSH et causer une déplétion de son pouvoir antioxydant (Tripathi *et al.*, 2024). La régulation antioxydante à la hausse par Nrf2 devient primordiale pour contourner l'inhibition des enzymes par les métaux lourds. Les ERO créées par perturbation du STE activent Nrf2 afin de maintenir l'homéostasie en les éliminant rapidement. Les explications mécanistiques de l'activation de Nrf2 et la source d'ERO peuvent varier selon le type de métal et la concentration, mais ils passent principalement par la signalisation du stress oxydatif (Liu *et al.*, 2022a; Tripathi *et al.*, 2024). Le fer, sous sa forme ferreuse (Fe^{2+}) ou ferrique (Fe^{3+}), peut promouvoir la croissance cellulaire, mais une suraccumulation de fer peut augmenter la production d'ERO (Liu *et al.*, 2022a). Spécifiquement, le fer réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former des hydroxydes et des radicaux hydroxyles. Un exemple de cette réaction de formation de radical d'hydroxyle est décrit par la réaction de Fenton ayant cette équation : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{OH}^-$. Ce radical sensibilise la cellule à la mort par ferroptose (Liu *et al.*, 2022a). L'hypothèse prédominante stipule que le métabolisme cellulaire du fer est particulièrement sensible aux ERO produites par le STE des mitochondries ainsi que les NOX, et que ces deux sources d'ERO peuvent servir de signaux précurseurs pour induire la ferroptose (Liu *et al.*, 2022a). La détoxification rapide du H_2O_2 par les antioxydants cellulaires, sous contrôle de Nrf2, est d'autant plus pertinente pour inhiber la réaction de Fenton, et maintenir un environnement homéostatique en présence de fer. En conditions de base, la catalase réagit

plus rapidement avec le H₂O₂ cellulaire que le fer lui-même, car son efficacité détoxifiante, même à basse concentration est très élevée (Anwar *et al.*, 2024).

1.2.5 Nrf2 et la température

Le stress causé par une exposition au froid induit d'importants changements au niveau cellulaire. En particulier, il a été démontré que ces changements passent par des modifications de l'état oxydatif cellulaire, surtout dans les cellules du myocarde murin, mais aussi au niveau des cellules du foie, du rein, du muscle squelettique, et de l'intestin (Selman *et al.*, 2000). Précisément, il a été noté qu'il y a un remodelage métabolique qui a pour but d'augmenter la production d'ATP. Ce pic métabolique est accompagné d'une production accrue d'ERO. En particulier, nous retrouvons une présence de peroxyde d'hydrogène, de superoxyde, et du radical hydroxyle. En conséquence, il y a une augmentation de la peroxydation des membranes lipidiques (Kong *et al.*, 2020; Selman *et al.*, 2000). Ces processus sont aussi accompagnés par la formation réduite d'antioxydants tels que la SOD-1, la catalase, ou le GSH, menant à l'hypothèse que les dommages cellulaires causés par une exposition à des températures basses sont causés, du moins en partie, par le stress oxydatif (Sahin et Gümüşlü, 2004). Ces trouvailles ont été confirmées plus tard par une gamme d'études plus récentes (Feng *et al.*, 2023; Jain *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012a; Zhang *et al.*, 2012b).

Il est normalement attendu que le niveau de Nrf2 augmente en réponse au stress, mais une étude a trouvé que le stress froid, en particulier, causait une réduction dans le niveau protéique de Nrf2 et de Keap1, ainsi que dans le niveau de leurs ARNm respectifs (Cong *et al.*, 2018). Cette réduction cause un affaiblissement du système antioxydant (Cong *et al.*, 2018; Sahin et Gümüşlü, 2004). De plus, le stress oxydatif induit par le froid peut mener à des modifications au niveau des acides aminés composant Keap1. En particulier, les cystéines C273 et C288 de Keap1 sont susceptibles d'être structurellement affectées par le froid, notamment en altérant les thiols par la formation de liens disulfides. Conséquemment, leur sensibilité au stress oxydatif est réduite (Cong *et al.*, 2018). Ces modifications réduisent ainsi la capacité de Keap1 à réagir aux dommages oxydatifs. Elles limitent la dissociation de Nrf2 et sont directement responsables des défauts au niveau du système antioxydant (Barančík *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2015). Ces changements aggravent les dommages causés par une exposition à des températures froides. Il est alors hypothétisé que l'activité potentiellement défectueuse de Nrf2-Keap1 peut être au cœur de pathologies résultant d'un stress hypothermique, et que la restauration de cet axe crucial pourrait mitiger les impacts néfastes (Cong *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2020).

Au contraire du stress thermique froid, l'exposition à des températures élevées a été associée à une augmentation importante des niveaux de Nrf2 au niveau cellulaire (Glory et Averill-Bates, 2016; Grondin *et al.*, 2024; Tchouagué *et al.*, 2019). Le stress thermique est un sujet très vastement étudié. Tant dans le contexte d'animaux faisant face aux changements climatiques, que dans le contexte biomédical où les traitements d'hyperthermie sont utilisés à des fins de traitements anticancers, l'exposition à la chaleur suscite un intérêt particulier. Ce type de stress sera le point focal de cette thèse, et son lien avec les ERO et Nrf2 sera explicité dans le prochain chapitre de cette introduction (1.3). Brièvement, la chaleur, tout comme les autres stress mentionnés plus haut, mène à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène. Ces ERO activent la voie de Nrf2. Cependant, le niveau d'activation est intimement lié avec la température utilisée et la durée du stress (Glory *et al.*, 2014; Grondin *et al.*, 2024). Le tout sera donc détaillé dans la section 1.3 de l'introduction.

1.2.6 Nrf2 et le métabolisme

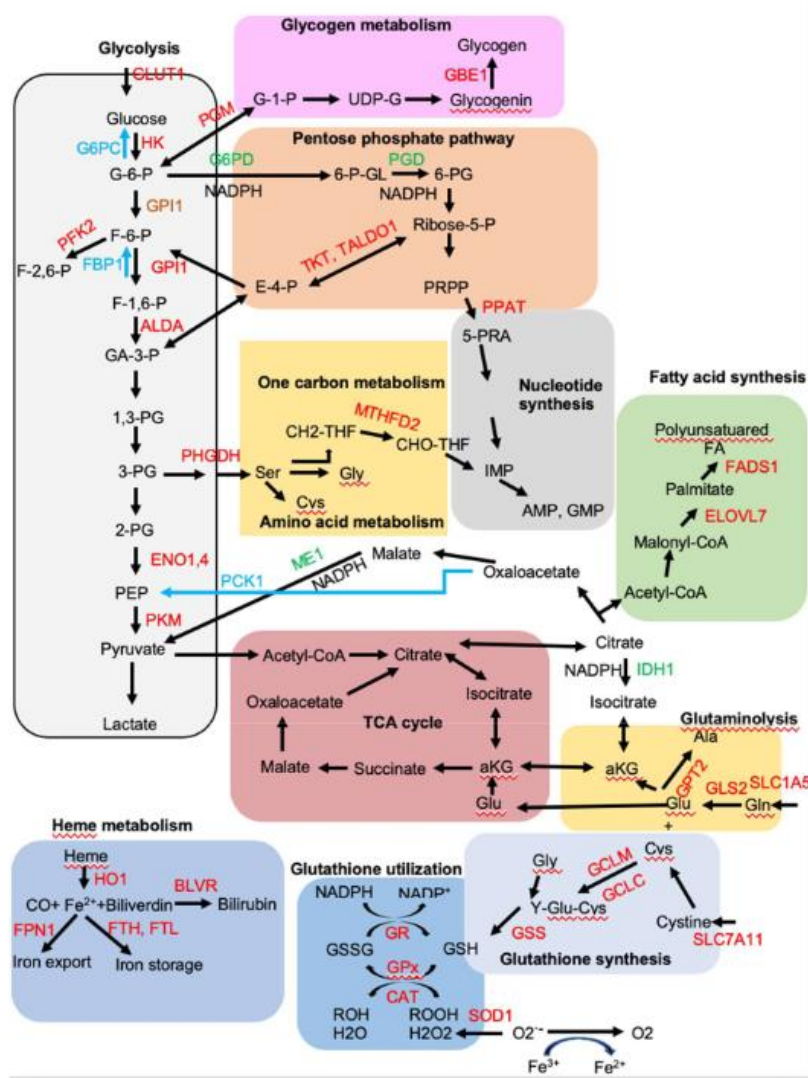


Figure 1.13 Les gènes métaboliques affectés par Nrf2. Nrf2, malgré qu'elle soit régulateur maître du système cellulaire antioxydant, impacte fortement plusieurs voies métaboliques. Notamment, nous retrouvons des gènes régulés à la hausse au niveau de la glycolyse (gris léger), du métabolisme du glycogène (rose), de la voie du pentose phosphate (orange), du métabolisme d'acides aminés et des molécules contenant un seul carbone (jaune), de la synthèse des nucléotides (gris foncé), des acides gras (vert), du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) (rose foncé), de la synthèse (bleu léger) et de l'utilisation du glutathion (bleu foncé), ainsi que du métabolisme de l'hème (bleu moyen). Les gènes régulés à la hausse sont en rouge et les gènes sous-régulés sont en bleu. Pour des détails sur toutes les abréviations, voir l'article original. Tiré de He et *al.* (2020b)

Différents types de stress abiotiques ont été brièvement décrits ci-haut. Leur effet au niveau de l'équilibre rédox cellulaire est variable, mais ils impliquent tous la voie de signalisation cellulaire antioxydante de Keap1-Nrf2. Il faut noter, en revanche, que Nrf2 n'est pas seulement impliqué dans des voies de réponses antioxydantes. Cette protéine peut agir sur plusieurs systèmes cellulaires (Esteras et Abramov, 2022; He *et al.*, 2020b). Un intérêt particulier ici est dans la relation entre Nrf2 et le métabolisme énergétique cellulaire. Nrf2 peut affecter plusieurs branches du métabolisme énergétique. En particulier, il peut impacter l'apport des nutriments, l'anabolisme, et la biosynthèse macromoléculaire destinée à la croissance et la prolifération (Hanahan et Weinberg, 2011; He *et al.*, 2020b). Par exemple, l'activation constitutive de Nrf2 dans plusieurs types de cancers régule à la hausse la glycolyse aérobie et la synthèse du glycogène, mais a tendance à inhiber la gluconéogenèse (He *et al.*, 2020a). Cette relation n'est pas le point focal de cette thèse, mais son impact sur la production d'ERO est directe, car la production d'ERO est proportionnelle au taux métabolique (Mailloux, 2020). Ainsi, lors de l'analyse d'études sur Nrf2, il faut considérer son impact au niveau métabolique. À cet effet, un résumé visuel a été ajouté ci-dessous pour expliciter l'information (Figure 1.13).

L'importance thérapeutique de Nrf2 réside alors non seulement dans son rôle primordial contre le stress induit par dommages oxydatifs, ni sa capacité à moduler le métabolisme cellulaire, mais aussi dans sa surexpression constitutive chez plusieurs types de cancers (Figure 1.14) (Telkoparan-Akillilar *et al.*, 2021). Dans une cellule en santé, la voie Nrf2 supprime le genèse de cancers en optimisant l'environnement oxydatif de manière qu'il reste homéostatique. Une réduction d'ERO via Nrf2 agit, en temps normal, pour supprimer l'oxydation et les dommages à l'ADN, et donc réduire l'apparition de mutations pouvant mener au cancer. Cependant, dans certaines conditions, telles qu'un stress excessif, une activation chronique et constante de Nrf2, ou une baisse d'expression du régulateur négatif Keap1, Nrf2 peut devenir un agent pro-oncogénique favorisant la croissance de tumeurs (Telkoparan-Akillilar *et al.*, 2021). Dans l'optique de maintenir un environnement élevé en ERO qui reste non cytotoxique, les cellules cancéreuses maintiennent un système antioxydant suractivé en relation aux cellules saines (Emami *et al.*, 2022; Ngo et Duennwald, 2022). Plus précisément, il a été trouvé que des mutants de Nrf2 manquant soit l'exon 2, ou 2 et 3, sont présents dans le cancer du poumon, ainsi que dans le cancer du cou et de la tête. Ces exons contribuent directement à la liaison de Nrf2 à Keap1, et leur absence aboutit à une stabilisation importante de la protéine Nrf2 menant à une suractivation chronique du système antioxydant (Goldstein *et al.*, 2016). De plus, il a été démontré qu'il y a une augmentation de dé-glycation de Nrf2 dans certains cancers,

comme les carcinomes hépatocellulaires. Ce processus augmente son affinité aux sMAF et permet une transcription plus importante des cibles de Nrf2 régulées par les ARE (Sanghvi *et al.*, 2019).

D'un autre côté, plusieurs cancers favorisent la glycolyse comme méthode de production d'ATP (He *et al.*, 2020b). C'est surtout le cas pour les cancers avec un pronostique défavorable. Cette favorisation de la glycolyse, telle que mentionnée précédemment, a été corrélée avec une suractivation constitutive de la voie cellulaire de Nrf2 (He *et al.*, 2020a). Par exemple, Nrf2 est capable d'induire l'expression du transporteur de glucose GLUT1. Ceci alimente directement la glycolyse en augmentant l'apport proportionnel de nutriments (Fu *et al.*, 2019). Indépendamment de ceci, Nrf2 favorise aussi l'expression de plusieurs enzymes glycolytiques comme l'hexokinase 1/2 (HK1/HK2), le glucose phosphate isomérase 1 (GPI1), le 6-phosphofructo-2-kinase (PKF2), le PFK4, le fructose-biphosphate aldolase A (ALDA), l'énolase 1 (ENO1), l'ENO4, ainsi que la pyruvate kinase isoforme musculaire 2 (PKM2) (voir Figure 1.13 pour un résumé plus complet des gènes métaboliques impactés par Nrf2) (Fu *et al.*, 2019). La surproduction d'ERO est associé avec la suractivation de la glycolyse dans les cancers (Liemburg-Apers *et al.*, 2015).

Nrf2 ne favorise pas seulement la glycolyse dans les cancers, mais aussi d'autres métabolismes, tels que celui des lipides ou des acides aminés. Généralement, Nrf2 réduit l'accumulation des lipides dans les cellules cancéreuses (Zhao *et al.*, 2020). Notamment, Nrf2 régule à la baisse la stearoyl CoA désaturase 1 (SCD1) ainsi que l'acétyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), deux enzymes primordiales impliquées dans la synthèse de lipides (Zhao *et al.*, 2020). De plus, la régulation négative de SCD1 et ACC1 promeut l'oxydation des acides gras en réduisant les niveaux de la malonyl-CoA, un inhibiteur d'oxydation lipidique (Zhao *et al.*, 2020). Il est important de noter que l'impact de Nrf2 sur le métabolisme des lipides est dépendant du type cellulaire ainsi que de l'environnement cellulaire (Chorley *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2019; Yates *et al.*, 2009). Les voies lipidiques, au niveau de l'énergie cellulaire, sont moins pertinentes dans le contexte de cancers prolifératifs qui favorisent la glycolyse, mais doivent être notées. De manière plus pertinente, la synthèse des acides aminés est régulée à la hausse dans les cancers par Nrf2. Dans les cellules non prolifératives, le produit final de la glycolyse, le pyruvate, se rend au cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) pour maximiser la production d'ATP. Dans les cellules très prolifératives, comme les cellules cancéreuses, le cycle TCA sert aussi de source importante de précurseurs biosynthétiques. Donc, les cellules doivent reconstituer les intermédiaires du cycle TCA dans un processus nommé anaplérose (He *et al.*, 2020b). La glutamine, un acide aminé non essentiel, présent en grande quantité dans les cellules, contribue fortement au flux anaplérotique (Lunt et Vander Heiden, 2011). La protéine transporteur de glutamine SLC1A5 est

primordiale dans cette activité, et elle est transcriptionnellement activée par Nrf2 (Romero *et al.*, 2017). De plus, deux enzymes glutaminolytiques, responsables de la génération d'énergie par dégradation de glutamine, soit GLS2 et GPT2, sont activées par Nrf2 et contrôlent, entre autres, la production de glutamate, aspartate, alanine, et α -cétoglutarate. Ces éléments sont essentiels dans la synthèse de nucléotides et d'acides aminés non essentiels dans les cellules cancéreuses (Fu *et al.*, 2019). Sommairement, dans un contexte de favorisation de la genèse de tumeurs, Nrf2 joue donc un rôle double en permettant un flux métabolique élevé et en limitant les dégâts oxydatifs causés par ce métabolisme élevé.

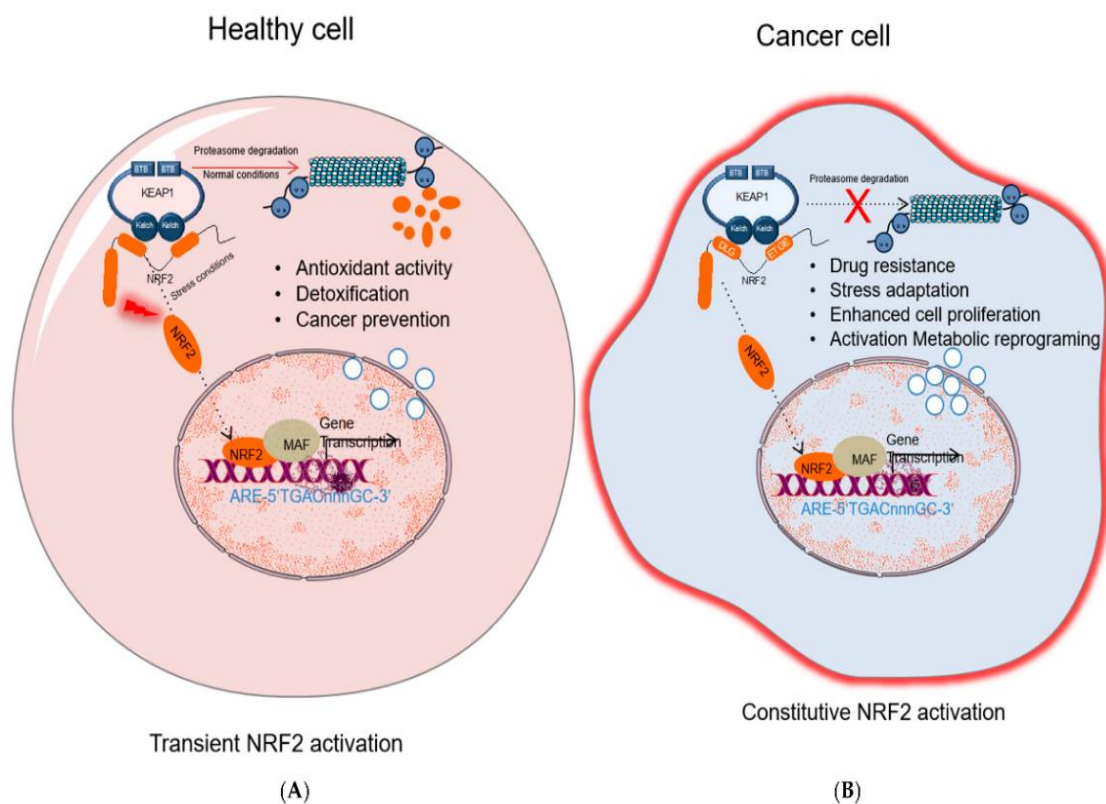


Figure 1.14 Nrf2 dans une cellule normale et dans une cellule cancéreuse. Dans une cellule non cancéreuse (A), l'activation de Nrf2 est temporellement régulée. Nrf2, par son lien à Keap1, est finement régulé et dégradé par des voies protéasomales. Il résulte une activité antioxydante saine permettant la détoxification cellulaire et la prévention de la formation des cancers. Dans une cellule présentant une activité constitutive de Nrf2 (B), la présence accrue de Nrf2 stimule la résistance aux drogues anticancères, une adaptation favorisée des cellules au stress, une prolifération accrue et non contrôlée, ainsi qu'une reprogrammation métabolique favorisant les modifications décrites ci-dessus. Nrf2, ainsi, devient alors un agent pro-oncogénique qui protège la cellule. Tiré de Telkoparan-Akillilar *et al.* (2021)

Il est hypothétisé que Nrf2, considérant son activité pro-oncogénique multidimensionnelle dans les cancers (Figure 1.14), aurait un rôle important à jouer dans l'établissement de la thermotolérance dans un

contexte de traitements d'hyperthermie. Vu sa capacité à moduler les réponses aux stress environnementaux par régulation du système antioxydant (Averill-Bates, 2024; He *et al.*, 2020b; Sies *et al.*, 2017), sa capacité à favoriser la croissance de tumeurs (Fu *et al.*, 2019; Sanghvi *et al.*, 2019) ainsi que sa présence naturellement accrue par mutation de certains exons dans plusieurs cancers (Goldstein *et al.*, 2016), son impact dans l'établissement de la thermotolérance pourrait être primordial. Finalement, vu le lien intime entre ERO et activation de Nrf2 (Averill-Bates, 2024), il y aurait raison d'hypothétiser que la thermotolérance serait non seulement modulée par Nrf2, mais aussi par les ERO. Le prochain chapitre de l'introduction se penche donc sur la chaleur (1.3), ainsi que le lien de plusieurs voies de stress avec Nrf2 dans un contexte de stress thermique. Suivant cela, le lien entre Nrf2 et la thermotolérance sera décrit (1.4).

1.3 La chaleur, le stress, et Nrf2

1.3.1 La chaleur

Le stress induit par exposition à la chaleur est d'un intérêt particulier dans cette thèse. Au niveau médical, l'hyperthermie repose sur l'effet pro-apoptotique de la chaleur envers les tumeurs solides (Crezee *et al.*, 2021; Fiorentini *et al.*, 2020). Dans ce chapitre de l'introduction, les impacts du stress thermiques seront brièvement décrits. Ces impacts seront contextualisés et centrés autour de Nrf2, des ERO, et de la thermotolérance.

À haute température (40°C et plus), plusieurs systèmes cellulaires subissent des altérations importantes. Au niveau des membranes phospholipidiques, les queues d'acides gras deviennent moins rigides par le fait qu'elles sont bombardées d'énergie thermique. Les phospholipides, après un certain temps, possèdent une quantité suffisante d'énergie cinétique pour surmonter les forces intermoléculaires qui maintiennent l'intégrité des membranes. Ceci augmente la perméabilité ainsi que la fluidité des membranes (Fan et Evans, 2015). D'un autre côté, les chocs thermiques peuvent, par l'énergie apportée, dénaturer les protéines présentes dans la membrane (Lepock, 2005; Lepock *et al.*, 1993). Les changements aux acides gras et aux protéines peuvent mener certaines molécules, potentiellement dangereuses lorsque non contenues, comme le cytochrome c, à traverser les membranes et à altérer/endommager la machinerie cellulaire finement réglée (Fan et Evans, 2015). De plus, ces changements membranaires peuvent déstabiliser une gamme de gradients ioniques en endommageant les pompes ioniques présentes dans la membrane, telles que les pompes Na^+/K^+ -ATPase, les pompes calciques (Ca^{2+}), ou les pompes de protons (Gadsby, 2009; Karunanithi et Brown, 2015). Ceci a pour conséquence une perturbation

importante de plusieurs systèmes cellulaires dépendants d'ions comme l'homéostasie calcique, la signalisation cellulaire dépendante d'ions, et le transport des nutriments dépendants d'ions (Karunanithi et Brown, 2015). Dans les neurones, ceci peut aussi inhiber les potentiels d'actions en dissipant le potentiel membranaire (Touska *et al.*, 2018).

La dénaturation des protéines par la chaleur n'est pas seulement pertinente au niveau de la membrane phospholipidique. Les protéines dépendent fortement de leur conformations uniques pour maintenir leur activité homéostatique. Que ce soient des enzymes dénaturées qui ne reconnaissent plus leurs substrats, ou des facteurs de transcription qui ne peuvent plus promouvoir l'expression de gènes cibles, la dénaturation protéique déstabilise fortement le rôle inné de plusieurs systèmes cellulaires (Leuenberger *et al.*, 2017). Par exemple, le STE, maintenu en place par plusieurs complexes protéiques, est très sensible aux variations de chaleur. Lorsqu'il y a déstabilisation, causée par des changements membranaires ou dénaturations protéiques, il y a une exacerbation de dysfonction mitochondriale au niveau de la production d'ATP. Conséquemment, les électrons présents dans le STE ont tendance à s'échapper plus facilement et réagissent avec l'oxygène ambiant pour former des ERO. Ces derniers amplifient, par oxydation, les dommages à la mitochondrie/cellule et créent une boucle par laquelle les cellules sont exponentiellement perturbées (Yang *et al.*, 2010a). Ces dommages sont aggravés par la déformation accentuée des protéines/enzymes antioxydantes, telle que la glutathion peroxydase, causées par la chaleur (Zeng *et al.*, 2014). Le STE ne représente qu'un exemple de système cellulaire affecté par la chaleur, et les effets décrits ne sont pas exhaustifs.

La structure hélicoïdale de l'ADN à deux brins peut aussi subir des altérations délétères en réponse à la chaleur. Cette structure, tenue en place par des liens intermoléculaires, subit une déstabilisation proportionnelle à la chaleur administrée (Driessen *et al.*, 2014). Passée une température critique déterminée par la composition en nucléotides, les deux brins d'ADN se séparent complètement. De plus, la température augmente la flexibilité des brins d'ADN. Elle affecte aussi les fonctions des protéines de la chromatine en dénaturant leurs structures essentielles. Ces facteurs, combinés ensemble, mènent à dégradation de l'ADN causée par perturbation de sa stabilité au niveau des liens intermoléculaires ainsi qu'au niveau de son repliement (Driessen *et al.*, 2014). La cellule ainsi peut subir des dommages causés par la perte ou l'altération délétère de ses instructions primaires au niveau de l'ADN. Cependant, tout stress de chaleur n'est pas égal et ne cause pas les mêmes dommages. La nature du stress est dépendante de la température elle-même.

Le stress induit par haute température peut être classifié en deux grandes catégories. Premièrement nous retrouvons les stress légers à des températures physiologiquement pertinentes. Ce genre de stress est activé par des chocs de température de 1-3°C au-dessus du 37°C homéostasique (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Grondin *et al.*, 2024). Un exemple biologiquement important est la réponse immunitaire régulée par la fièvre chez l'humain (Heintzman *et al.*, 2024). Généralement, ces stress ne sont pas considérés toxiques. En effet, il n'y a pas de mort cellulaire induite par des températures allant jusqu'à 40°C *in vitro* (Grondin *et al.*, 2024). La deuxième catégorie est représentée par les stress de très haute température. Généralement, ces stress sont induits par une exposition à des températures au-dessus de 42.5°C et peuvent être très cytotoxiques (Glory *et al.*, 2014; Grondin *et al.*, 2024). Quelle que soit la catégorie de stress, la chaleur induit une panoplie de changements transitoires qui optimisent la survie cellulaire, et plus largement, la survie de l'organisme. En général, la réponse au stress thermique aura pour but quatre changements majeurs. Premièrement, la réponse vise à restaurer et maintenir l'intégrité des systèmes macromoléculaires. Par exemple, cela peut impliquer le maintien de la protéostasie (homéostasie protéique) ou la réparation de dommages à l'ADN (Driessen *et al.*, 2014; Somero, 2020). Deuxièmement, il faudra moduler le métabolisme énergétique cellulaire dans l'optique de fournir assez d'ATP et de pouvoir réducteur antioxydant. Troisièmement, il y aura un ralentissement de la prolifération cellulaire en activant des inhibiteurs du cycle cellulaire (Somero, 2020). Quatrièmement, si les trois autres mécanismes ne peuvent pas maintenir l'intégrité ou les fonctions cellulaires, il y aura induction de mort programmée cellulaire (Somero, 2020).

Le développement évolutif d'une réponse au stress thermique dénote une sensibilité aigüe de nos systèmes aux perturbations engendrées par ces chocs. En particulier, les protéines, les acides nucléiques et les membranes subissent des dérangements assez rapides en réponse à la chaleur. Certaines archéobactéries hyperthermophiles possèdent des membranes et des protéines pouvant fonctionner à près de 120°C (Somero, 2020; Somero *et al.*, 2016). Il y a donc des exemples de systèmes biologiques adaptés aux chaleurs considérées létales à tout autre être vivant. Alors pourquoi est-ce que les systèmes eucaryotes ne le sont pas? Quels sont les facteurs biologiques causant des perturbations énormes à des températures quelques degrés plus hauts que l'idéal homéostasique?

La réponse intégrative ici est dans le compromis entre la stabilité moléculaire et la flexibilité des structures, tels que les conformations des protéines, dans l'optique de maintenir des fonctions optimales (Somero *et al.*, 2016). La stabilité moléculaire est primordiale pour les processus impliquant la reconnaissance de deux

ou plus molécules spécifiques comme la liaison d'un substrat à son enzyme spécifique, l'assemblage de protéines en complexes protéiques, ou même la liaison entre des protéines régulatrices et leurs cibles dans l'ADN. Cependant, les événements de reconnaissance moléculaires ne sont typiquement que la première étape dans un processus. Une autre nécessité à la complétion d'un processus moléculaire, en général, est le changement réversible de la conformation macromoléculaire. Ce genre de changement requiert une flexibilité accrue de la part des macrostructures moléculaires. Les liaisons non-covalentes stabilisant les structures tri-dimensionnelles ne doivent pas être si puissantes qu'elles empêchent les changements rapides de conformations requis dans les processus biochimiques. C'est cette faiblesse nécessaire des liaisons qui rendent nos systèmes biologiques vulnérables à la chaleur, qui, par son énergie relâchée, peut rapidement les déstabiliser (Somero, 2020; Somero *et al.*, 2016).

Tel que mentionné plus tôt, les stress thermiques peuvent être légers ou létaux. En revanche, la réponse cellulaire au stress doit, de façon innée, posséder une plasticité phénotypique qui lui permet de répondre adéquatement au stress. Il n'y a pas une réponse qu'on peut qualifier d'universelle. Les types de processus activés en réponse au stress ainsi que l'intensité de ces processus reflètent fortement les dommages engendrés par la chaleur (Somero, 2020). Tenant compte de cela, les réponses aux stress thermiques qui seront décrites ci-dessous ne fonctionnent pas de manière « 0 ou 1 » où le zéro représente un système inactif et le un représente une activation totale. Il existe une ligne continue entre ces deux états où les systèmes peuvent réagir de manière phénotypiquement plastique pour correspondre à la sévérité du stress vécu.

1.3.2 Protéines de chocs thermique

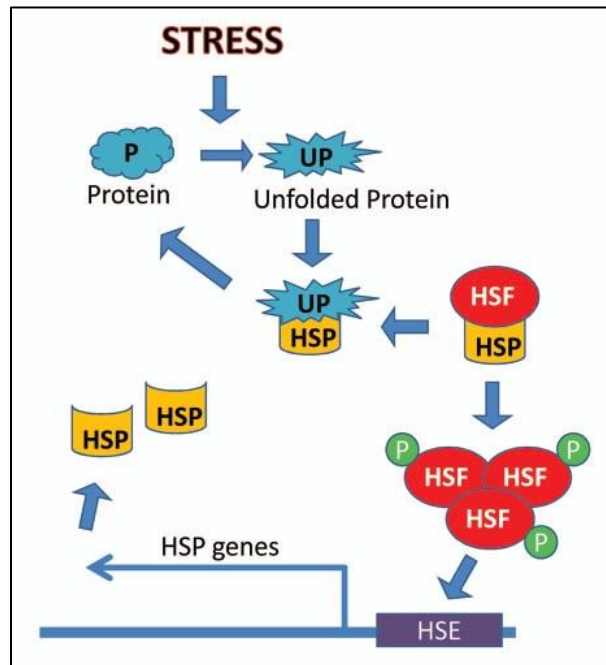


Figure 1.15 Une visualisation de base des fonctions des HSP. Lors d'un stress thermique, les protéines (P) peuvent devenir dépliées, et perdre leur conformation optimale (UP). Dans cette optique, les HSP peuvent chaperonner ces protéines et les aider à réadopter leur conformation optimale. Pour ce faire, les HSF phosphorylés peuvent se lier à l'ADN (HSE) et stimuler la transcription de gènes HSP. HSP représente les protéines de choc thermique. HSF représente les facteurs de transcriptions associés aux HSP. HSE représente les éléments de choc thermique dans l'ADN auxquels se lient les HSF. Tiré de Krivoruchko & Storey (2010)

Le premier système décrit est le système de protéines de chocs thermique ('heat shock proteins' ou HSP) (Figure 1.15). Découverts en 1962 par le généticien italien Ferruccio Ritossa, les HSP sont une famille de protéines produites en réponse à plusieurs stress, comme le froid, la radiation, la chaleur, et même durant la cicatrisation de blessures (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Krivoruchko et Storey, 2010; Landry *et al.*, 1982; Zhang et Bi, 2024). Leur nom vient du fait qu'ils ont premièrement été décrits en relation avec un stress thermique. On caractérise ces protéines de chaperonnes, car elles ont pour rôle primaire la stabilisation de nouvelles protéines ou la restauration de la conformation originale chez des protéines endommagées par quelque stress (De Maio, 1999). Elles peuvent aussi chaperonner les protéines en « amenant » celles qui ne peuvent plus reprendre leur conformation originale vers un protéasome pour

se faire dégrader et recycler. Les HSP sont nommées en fonction de leur poids moléculaire (en kDa). Par exemple, les trois HSP les plus connues, soit HSP60, HSP70, et HSP90, réfèrent à des familles de protéines qui pèsent respectivement 60, 70, ou 90 kDa (De Maio, 1999).

Ce système de HSP peut être activé par Nrf2. En effet, les HSP 27, 40, 60, 70, et 90 peuvent interagir avec la voie cellulaire de Nrf2. HSP27 contribue directement à la stabilité de Nrf2, et son inhibition pharmacologique réduit l'expression de gènes cibles de Nrf2, tels que la HO-1 (Chen *et al.*, 2024a). L'expression de HSP70 est affectée par le niveau de Nrf2, car l'inhibition pharmacologique de Nrf2 réduit les niveaux de HSP70 dans les cellules HT22 (Bozaykut *et al.*, 2016). De plus, la répression de Nrf2 augmente la dégradation protéasomale de HSP70 via HSP40. Donc Nrf2 semble maintenir l'activité de HSP70 en inhibant sa dégradation via HSP40 (Bozaykut *et al.*, 2016). HSP60 semble avoir un effet répresseur sur l'activité de Nrf2, car son inhibition via des lignées « Knockdown ou KD » dans des cellules de type « Clear cell renal cell carcinoma 786-O et 769-P » mène à une expression importante de Nrf2 ainsi que de ces cibles antioxydantes (Teng *et al.*, 2019). Cependant, il n'est pas clair si l'expression de Nrf2 est réduite par HSP60, ou si son expression représente un mécanisme compensatoire dans les cancers pour pallier le manque d'une HSP. Finalement, dans un modèle de levure, il a été démontré que la stabilité de l'hétérodimère Nrf2-Keap1 est amplifiée par HSP90, et que sa répression exacerbe une toxicité causée par un excédent de Nrf2 (Ngo *et al.*, 2022). Dans la même étude, des résultats supplémentaires démontrent, par co-immunoprécipitation, une détection modeste d'interactions entre Nrf2 et HSP90 dans des cellules HeLa. Il se peut alors, qu'un phénomène similaire soit présent dans des cellules animales. En résumé, les HSP sont essentielles à la réponse de stress à la chaleur, et peuvent interagir de manières très diversifiées avec Nrf2. En parallèle avec les HSP, d'autres mécanismes de réponse envers la chaleur sont activés. En particulier, certains, comme l'autophagie, visent à recycler la machine cellulaire endommagée dans le but de maintenir ou restaurer l'homéostasie (section 1.3.3).

1.3.3 Autophagie

Il y a été démontré que la chaleur engendre une activation significative de l'autophagie (Grondin *et al.*, 2024; Kassis *et al.*, 2021). Brièvement, l'autophagie est un processus catabolique qui résulte dans la dégradation en masse de contenu cytoplasmique (Codogno *et al.*, 2011; Debnath *et al.*, 2023). Généralement activée par le manque de nutriments cellulaires, l'autophagie peut aussi être activée par d'autres conditions telles que la différenciation, la prolifération, l'infection pathologique, le cancer, et plusieurs stress variés (Codogno *et al.*, 2011; Debnath *et al.*, 2023), dont la chaleur (Grondin *et al.*, 2024).

La cascade cellulaire derrière l'autophagie est complexe, impliquant des dizaines de gènes autophagiques (*AtgX*, où X représente un chiffre), mais la description détaillée de cette voie n'est pas particulièrement pertinente dans le contexte de cette thèse. Donc, de manière simplifiée, un régulateur clef de l'autophagie est « mechanistic target of rapamycin » ou mTOR. Cette protéine inhibe l'autophagie en conditions homéostasiques. Lorsqu'un stress, tel que la chaleur, devient cytotoxique, mTOR peut être lui-même inhibé par p53 ou par « AMP-activated protein kinase » (AMPK) (Alers *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2022). Cette inhibition active la voie autophagique, et, en aval, les phagophores peuvent séquestrer le contenu cytoplasmique en formant un autophagosome (Alers *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2024). Des lysosomes, contenant une gamme d'enzymes cataboliques, se fusionnent aux autophagosomes, formant des autolysosomes. Ces derniers peuvent alors dégrader leur contenu et recycler les éléments constitutifs cellulaires (Codogno *et al.*, 2011). Il a récemment été démontré que Nrf2 peut altérer l'activation des voies autophagiques dans un contexte thermique (Grondin *et al.*, 2024).

Il est intéressant de noter que cette activation n'est pas dépendante de l'équilibre rédox cellulaire, car elle ne dépend pas de modifications oxydatives de résidus de cystéine de Keap1 (Grondin *et al.*, 2024). La protéine réceptrice d'autophagie se liant à l'ubiquitine (p62) est le pont crucial entre Nrf2 et la voie d'autophagie (Jain *et al.*, 2010). La phosphorylation de p62 favorise la formation d'autophagosomes (Jain *et al.*, 2010). Cette protéine peut aussi inhiber l'association de Nrf2 aux DGR de Keap1 (Bellezza *et al.*, 2018; Komatsu *et al.*, 2010). De plus, p62 contient un ARE et est donc une cible génétique de Nrf2 (Jain *et al.*, 2010). L'activation constitutive de Nrf2, et donc de p62, permet de renforcer l'activité autophagique cellulaire lors d'un choc thermique. L'autophagie est une réponse qui précède l'apoptose, car elle permet d'augmenter la survie cellulaire en recyclant les éléments constitutifs cellulaires endommagés (Grondin *et al.*, 2024). La régulation autophagique à la hausse par Nrf2 démontre alors son implication dans la réponse au stress de manière indépendante au système antioxydant. Cependant, la dissociation facilitée de Nrf2 de Keap1 via p62 peut aussi renforcer la réponse antioxydante (Bellezza *et al.*, 2018). Il y a donc un contrôle fin entre l'autophagie et la réponse antioxydante régulé par Nrf2. Cependant, la relation entre Nrf2 et autophagie n'est pas linéaire, car sa déplétion ainsi que sa surexpression ont mené à une augmentation de l'activité des voies autophagiques (Grondin *et al.*, 2024). Il se peut alors que l'activation de l'autophagie lors de la déplétion de Nrf2 représente un mécanisme compensatoire par lequel la cellule maintient l'homéostasie (Grondin *et al.*, 2024), mais ceci reste à clarifier.

1.3.4 Réponse de protéines mal repliées

La réponse de protéines mal repliées ('Unfolded Protein Response' ou UPR) est un mécanisme d'adaptation au stress basé sur la dégradation de protéines et le repliement des protéines via les chaperonnes (Botrus *et al.*, 2022). Cette voie de stress est particulièrement pertinente dans un contexte de choc thermique, car la chaleur est connue pour sa capacité à dénaturer les protéines (Leuenberger *et al.*, 2017). Sommairement, des protéines aberrantes, dénaturées par la chaleur, peuvent activer trois voies modulées par trois senseurs différents, soit l'enzyme requérant l'inositol de type 1 (IRE1), « protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase » (PERK), ou le facteur de transcription activateur 6 (ATF6). L'accumulation de protéines mal repliées cause la dissociation de la chaperonne GRP78 des senseurs, et l'activation des voies UPR (Botrus *et al.*, 2022). IRE1 devient oligomérisée et autophosphorylée, causant une activation du facteur de transcription nommé protéine liant la boîte-X 1 (XBP1s). PERK fonctionne similairement, avec une oligomérisation et une autophosphorylation qui active le facteur d'initiation eucaryotique de la traduction 2 alpha (eIF2 α). Ceci résulte en l'activation du facteur de transcription ATF4. PERK peut aussi phosphoryler Nrf2, lui permettant de se dissocier de Keap1 (Botrus *et al.*, 2022). Pour sa part, le facteur de transcription ATF6 est transporté dans l'appareil de Golgi où il est clivé et activé avant de se rendre au noyau. Tous ces facteurs de transcription, activés par des voies UPR parallèles, favorisent une réduction de l'expression protéique générale, l'expression augmentée de chaperonnes, ainsi que l'activation de la voie de dégradation protéinique via le réticulum endoplasmique (ERAD) (Botrus *et al.*, 2022). L'ERAD permet le transport des protéines mal repliées qui ne peuvent être réparées par les chaperonnes dans le réticulum endoplasmique (RE), où elles seront ubiquitinées et ensuite dégradées par un protéasome 26S dans le cytosol pour recycler leurs acides aminés (He *et al.*, 2020b).

En plus de l'activation via PERK, les protéines mal repliées causent une augmentation d'ERO qui peuvent aussi mener à une dissociation subséquente entre Keap1 et Nrf2 (He *et al.*, 2020b). L'action de Nrf2 au niveau de l'UPR semble requérir sa protéine sœur « nuclear factor, erythroid 2-like 1 » ou Nrf1, car sa déplétion réduit l'activation de l'UPR via Nrf2 (Zhu *et al.*, 2019). Ce facteur de transcription est similaire à Nrf2, mais il faut noter que ce facteur est totalement distinct du facteur de respiration nucléaire 1, portant le même acronyme de Nrf1. Il est dans la même famille de protéines (bZip), mais en contraste avec Nrf2, qui est cytosolique, Nrf1 est transmembranaire. Dans le contexte de l'UPR, Nrf2 forme un hétérodimère avec ATF4, et ce dimère peut induire la transcription de gènes cibles, telles que HO-1, qui protègent contre un stress protéotoxique (He *et al.*, 2001; He *et al.*, 2020b; Zhu *et al.*, 2019). Nrf2 peut aussi induire la

transcription, via ARE, de sous-unités protéiques qui constituent le noyau 20S du protéasome 26S dans le cytosol (He *et al.*, 2020b).

1.3.5 Réponse antioxydante

Un stress thermique peut, tel que décrit plus tôt, induire une surproduction d'ERO dans la cellule. Outre toutes les autres voies de réponse au stress, la voie antioxydante elle-même est fortement suscitée de manière proportionnelle à l'intensité de la chaleur (Grondin *et al.*, 2024). Grondin *et al.* (2024) ont démontré que l'activation de Nrf2 en réponse à un stress thermique de 40°C peut induire la transcription de gènes cibles antioxydants tels la GCL, la CAT, le MnSOD, ainsi que la HO-1. Ces protéines, une fois exprimées, vont directement contribuer à restaurer l'équilibre rédox cellulaire éliminant les ERO. Cependant, ce système doit fonctionner en concomitance avec les autres voies de réponses aux stress, car les antioxydants ne vont pas cibler la cause de la surproduction d'ERO; ils vont seulement contribuer à les éliminer en aval de tout stress.

Sommairement, un stress thermique élevé de plus de 42.5°C cause des dommages à l'ADN, aux membranes phospholipidiques, et dénature les protéines (Somero, 2020). Ceci a pour conséquence d'induire l'expression de plusieurs voies de réponse aux stress comme les HSP (Somero, 2020), l'autophagie (Grondin *et al.*, 2024), l'UPR (Somero, 2020; Zhou *et al.*, 2022a), ainsi que les antioxydants (Grondin *et al.*, 2024). Ces exemples ont été décrits, mais cette liste de réponses aux stress n'est pas exhaustive. Seules les voies les plus biologiquement pertinentes dans un contexte de stress thermique ont été décrites. De plus, Nrf2, qui est normalement régulateur maître antioxydant, peut avoir un impact significatif sur ces voies de stress.

Pour la cellule, un stress de chaleur n'est pas nécessairement négatif. En effet, plusieurs études ont démontré l'impact favorable d'un stress thermique léger de 40°C sur la survie face à une exposition subséquente à un stress léthal de chaleur de 42-43°C (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Glory et Averill-Bates, 2016; Glory *et al.*, 2014; Grondin *et al.*, 2024; Tchouagué *et al.*, 2019). Ce phénomène, nommé thermotolérance, sera décrit dans la prochaine section de l'introduction (Section 1.4).

1.4 La thermotolérance, le défi Nrf2, et les partenaires d'interactions potentiels

La thermotolérance est une réponse à un stress thermique hormétique par lequel un système biologique augmente son taux de survie lorsqu'exposé subséquentement à un stress léthal, dont la chaleur. Lors d'un

traitement d'hyperthermie, les cellules tumorales peuvent développer une thermotolérance transitoire qui réduit significativement l'impact pro-apoptotique/pro-nécrotique du traitement (Crezee *et al.*, 2021; Glory *et al.*, 2014; Kok *et al.*, 2020; Landry *et al.*, 1982). Nrf2, considérant son impact vaste et essentiel dans les multiples systèmes de stress cellulaires, a été hypothétisé à jouer un rôle primordial dans l'établissement de la thermotolérance. Cette hypothèse, jusqu'à aujourd'hui, semble avérée vraie (Glory et Averill-Bates, 2016; Grondin *et al.*, 2024; Kassis *et al.*, 2021; Redza-Dutordoir *et al.*, 2016; Tchouagué *et al.*, 2019).

Malgré qu'on connaisse l'implication de Nrf2, les voies de signalisations sont si complexes et vastes, que les processus impliqués en aval et en amont demeurent non-élucidés. Nous avons identifié l'implication autophagique dans ce processus (Grondin *et al.*, 2024). D'un côté plus fondamental, il a été démontré que les ERO, à faible dose, peuvent activer des mécanismes de résistance au stress tels que la protéine suppresseur de tumeurs p53 (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). Lors d'un stress, p53 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire et activer des voies de réparation de l'ADN, ou, si ce n'est pas possible, initier la mort cellulaire pour protéger les cellules environnantes (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). L'effet à faible dose des ERO ne s'arrête pas à p53. À concentration modérée, les ERO peuvent activer Nrf2 (Averill-Bates, 2024; Grondin *et al.*, 2024) et ont alors le fort potentiel d'être impliquées dans la thermotolérance Nrf2-dépendante (Averill-Bates, 2024; Grondin *et al.*, 2024). Cependant, la provenance de ces ERO ainsi que les espèces biologiquement pertinentes dans ce processus demeurent inconnues.

L'implication de Nrf2 ne représente qu'un début dans la recherche fondamentale associée avec l'hyperthermie et la thermotolérance transitoire. Il est connu que, pour l'instant, la manipulation pharmacologique de Nrf2 dans un contexte thérapeutique n'est pas particulièrement efficace (He *et al.*, 2020b). Son effet est contexte et dose-dépendant. Il peut avoir une activité antioxydante anticancer, mais devenir un élément pro-oncogénique sous contexte d'activation constitutive (He *et al.*, 2020a). Beaucoup d'agents utilisés pour manipuler l'activité de Nrf2 en travaux pré-cliniques, comme le sulforaphane ou le tert-butylhydroquinone, ont une faible biodisponibilité (Gharavi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2022b). Dans l'optique de contrer cette faiblesse, les doses théoriques qui devraient être utilisées pour optimiser la biodisponibilité sont elles-mêmes toxiques et potentiellement pro-oncogéniques. Là est le défi de manipuler pharmacologiquement un axe qui affecte une vaste gamme de processus cellulaires cruciaux. Cette problématique souligne, entre autres le besoin thérapeutique d'identifier des partenaires d'interaction directs avec Nrf2. Ceci pourrait non seulement nous éclaircir sur les voies signalétiques

impliquées dans la thermotolérance, mais pourrait aussi aboutir à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques qui sont plus spécialisées, et donc ont moins le potentiel d'induire des effets secondaires indésirables suivant une manipulation pharmacologique.

Après une revue de littérature exhaustive, plusieurs cibles potentiellement impliquées avec Nrf2 dans l'induction de la thermotolérance ont été identifiées. Les plus pertinentes, telles que DJ-1, PGAM5, Nrf1, et ATF5, seront décrites ci-dessous. Ces protéines ont toutes été impliquées, d'une manière ou d'une autre, dans certaines réponses aux stress variés, ou dans la régulation métabolique. Ainsi, leur pertinence potentielle dans le stress thermique, et dans la thermotolérance, découle d'un rôle préalablement identifié au sein de plusieurs stress.

1.4.1 Nrf2 et Nrf1

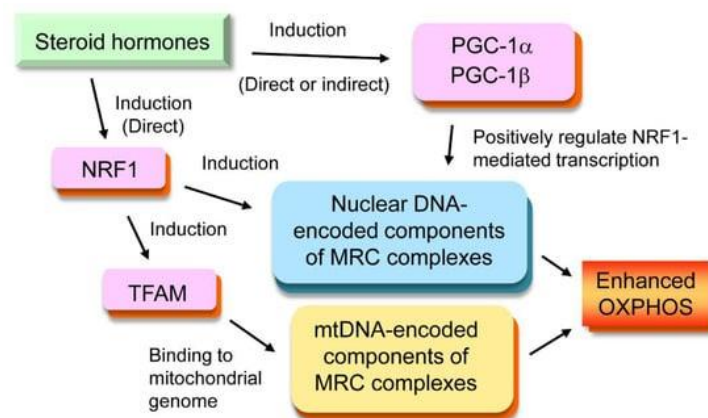


Figure 1.16 L'induction de Nrf1 par hormone stéroïde peut moduler le métabolisme énergétique cellulaire. Les hormones stéroïdiennes peuvent artificiellement induire l'activation du facteur de respiration nucléaire 1 (Nrf1). L'hormone peut agir directement sur Nrf1 pour le stimuler, ou indirectement via « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha/beta » (PGC-1α/β). Ces derniers régulent positivement Nrf1. Pour sa part, Nrf1 stimule la genèse de protéines mitochondriales encodées dans le génome nucléaire. Il stimule aussi le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM), qui agit pour stimuler des protéines mitochondriales encodées dans le génome mitochondrial. En combinaison, la phosphorylation oxydative (OXPHOS) est stimulée à la hausse. Tiré de Kobayashi *et al.* (2020)

Le facteur de respiration nucléaire 1 (Nrf1, à ne pas confondre avec le Nrf1 antioxydant décrit plus tôt), est une protéine associée avec le métabolisme cellulaire (Figure 1.16) (Priya *et al.*, 2013). Son expression peut être induite de diverses manières, dont par signalisation hormonale, par exemple (Kobayashi *et al.*, 2020). Elle peut réguler l'expression de sous-unités protéiques de l'OXPHOS qui sont encodés par soit

l'ADN nucléaire, ou l'ADN mitochondrial (Kobayashi *et al.*, 2020). L'OXPPOS requiert 70 sous-unités protéiques pour composer les complexes du STE ainsi que l'ATP synthase (Nargund *et al.*, 2015). Sur ces 70, 57 sont encodés par le génome nucléaire, et sont donc directement sous contrôle du facteur de transcription Nrf1 (Kobayashi *et al.*, 2020). Nrf1 peut aussi réguler l'expression des 13 sous-unités encodés par le génome mitochondrial. Spécifiquement, Nrf1 stimule la transcription du facteur mitochondrial de transcription A (TFAM). TFAM peut se transloquer à la mitochondrie, et ensuite lier l'ADN mitochondrial (ADNmt) d'une manière séquence-indépendante (Kang *et al.*, 2007). Il a été démontré que, une fois lié à l'ADNmt, TFAM peut protéger son intégrité, augmenter la quantité d'ADNmt, et stimuler la transcription de gènes mitochondriaux liés à l'OXPPOS (Ikeuchi *et al.*, 2005). Ainsi, par proxy de TFAM ou directement, Nrf1 peut moduler les dynamiques bioénergétiques mitochondriales en contrôlant l'expression protéique liée à l'OXPPOS. De plus, « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha/beta » (PGC-1 α et PGC-1 β) peuvent initier la transcription de sous-unités encodés par génome nucléaire en augmentant l'activité de Nrf1.

Il a déjà été décrit plus tôt (section 1.1 de l'introduction, Figure 1.4) que les ERO peuvent impacter l'activité de ces protéines et ainsi affecter l'OXPPOS. Cependant, il existe aussi un lien direct entre Nrf1 et Nrf2. Dans la région promotrice de Nrf1, il existe quatre ARE auxquels Nrf2 peut se lier dans le but de stimuler sa transcription (Piantadosi *et al.*, 2008). Ceci crée un axe direct par lequel Nrf2 peut influencer les dynamiques métaboliques en conditions homéostasiques ainsi que durant un stress. Un mécanisme indirect par lequel la production d'ERO peut être régulée à la baisse implique la réduction du taux métabolique (Mailloux, 2020). Tandis que l'axe Nrf1-Nrf2 a déjà été décrit, son implication lors de stress thermique et de thermotolérance n'est pas connue. La dynamique Nrf1-Nrf2 pourrait être cruciale dans cette réponse cellulaire et mérite d'être élucidée.

1.4.2 Nrf2 et DJ-1

« Parkinson disease protein 7/protein deglycase » (DJ-1) est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la réponse à des stress variés (Neves *et al.*, 2022). En général, elle inhibe les processus apoptotiques et améliore la réponse aux stress en stimulant plusieurs voies cellulaires de défense (Figure 1.17 pour un survol des voies modulées par DJ-1), dont l'axe Nrf2-Keap1 (Milani *et al.*, 2013). Elle régule Nrf2 à la hausse, et est considérée un activateur en amont (Milani *et al.*, 2013). Elle peut stabiliser Nrf2 en interférant avec le processus d'ubiquitination impliquant Keap1 et CUL3 (Clements *et al.*, 2006). L'importance de cette protéine a premièrement été notée lorsqu'on a découvert sa mutation dans certains phénotypes

pathologiques. En particulier, nous avons noté une mutation de DJ-1 dans certaines formes autosomales de la maladie de Parkinson (Repici et Giorgini, 2019). DJ-1 a aussi été impliquée dans la pathogenèse de la maladie de Huntington (Sajjad *et al.*, 2013), de certains cancers (Cao *et al.*, 2017), la maladie d'Alzheimer (Hijioka *et al.*, 2017), la sclérose latérale amyotrophique (Sandrelli et Bisaglia, 2023), ainsi que le diabète et autres pathologies métaboliques (Eberhard et Lammert, 2017; Mao *et al.*, 2022). En plus, DJ-1 est sensible à l'équilibre rédox cellulaire (Milani *et al.*, 2013), et l'oxydation excessive de ses résidus de cystéine peut inhiber sa fonction pro-survie (Neves *et al.*, 2022).

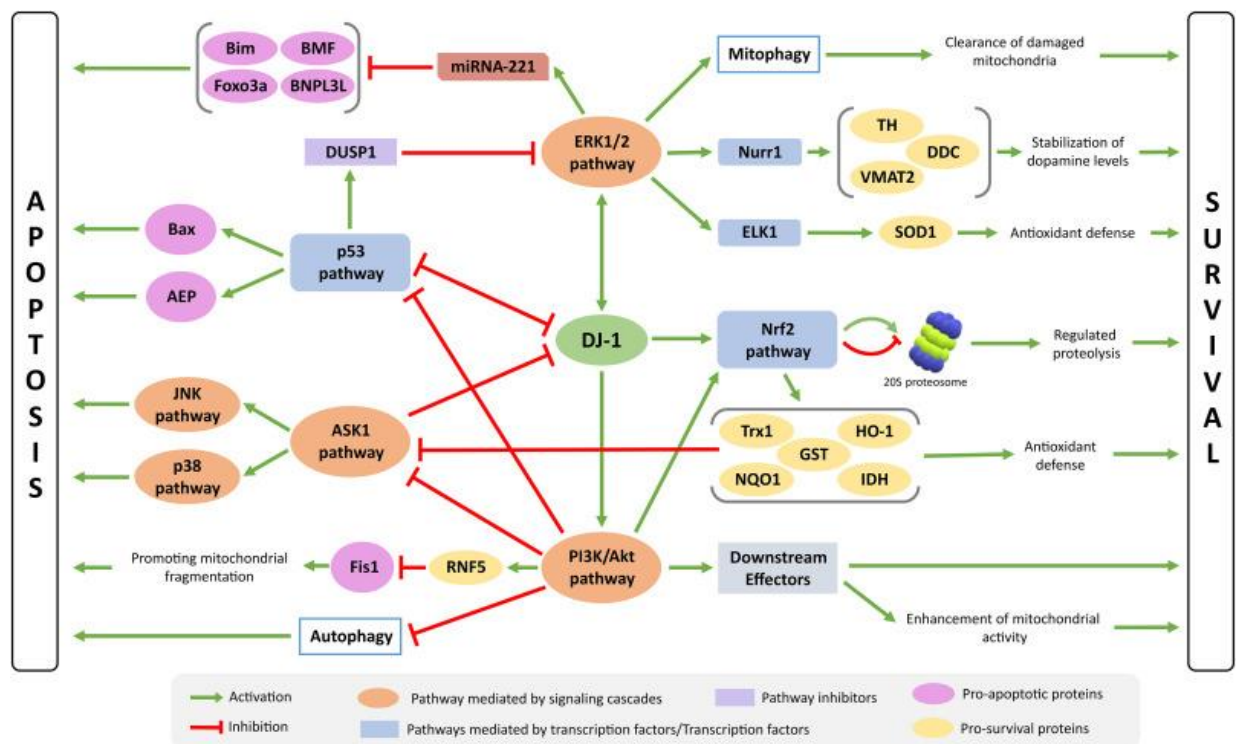


Figure 1.17 Un survol des voies de signalisation du stress liées à DJ-1. DJ-1 est une protéine centrale dans la réponse cellulaire au stress. Son activation ou son inhibition peuvent déterminer le destin cellulaire, et mener à la survie ou l'apoptose. Elle peut interagir avec des voies de cascades signalétiques (orange), des facteurs de transcriptions (bleu), des protéines de survie (jaune), des protéines pro-apoptotiques (rose), et des inhibiteurs (mauve). Les flèches vertes indiquent une activation, tandis que les lignes rouges indiquent une relation d'inhibition. Le lecteur est invité à visualiser l'article original pour une description détaillée des abréviations de protéines. Tiré de Neves *et al.* (2022)

Considérant sa sensibilité aux ERO, son potentiel activateur de Nrf2, son rôle global au sein d'une réponse au stress, et le fait qu'elle est surexprimée de manière constitutive dans plusieurs cancers (Cao *et al.*, 2017), DJ-1 pourrait jouer un rôle primordial dans la réponse au stress thermique dans le contexte

d'établissement de la thermotolérance. Vu l'intérêt comme cible potentielle thérapeutique, sa contribution et sa coordination avec Nrf2 doivent être investigués.

1.4.3 Nrf2 et PGAM5

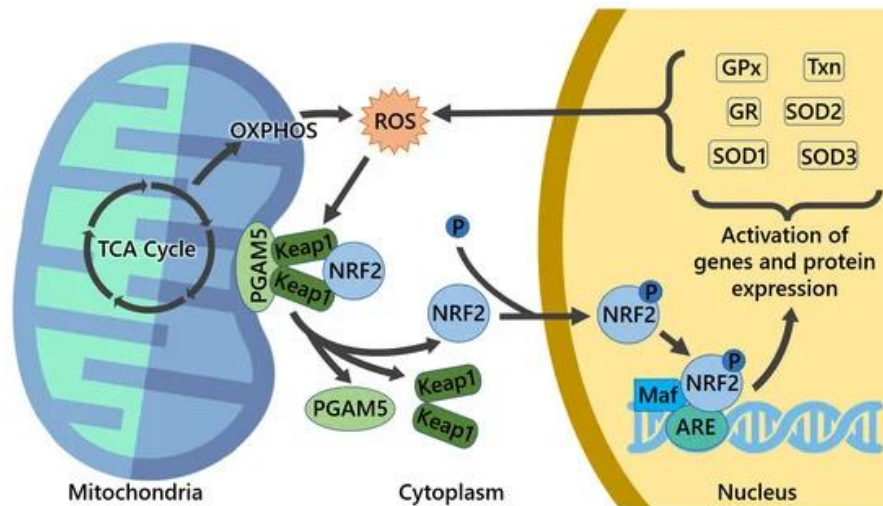


Figure 1.18 PGAM5 lie le complexe Nrf2-Keap1 à la mitochondrie, et ce complexe ternaire devient un senseur rédox mitochondrial. Phosphoglycérate mutase, membre de la famille 5 (PGAM5) se lie à l'hétérodimère Keap1-Nrf2 à la membrane externe mitochondriale. Ce complexe ternaire devient un senseur rédox-sensible. Une fois exposé à un stress oxydatif assez important (ROS), le complexe se dissocie, et Nrf2 pénètre dans le noyau pour se lier aux ARE avec les sMaf, menant à la transcription de gènes cibles de Nrf2, telles la superoxyde dismutase 1/2/3 (SOD1/2/3), la glutathion peroxydase (GPx), la thioredoxine (Txn), et la glutathion réductase (GR). Ces dernières viendront réduire le niveau cellulaire d'ERO pour rétablir l'homéostasie. Tiré de Panieri et *al.* (2022)

Phosphoglycérate mutase, membre de la famille 5 (PGAM5) est une protéine mitochondriale impliquée dans plusieurs processus, dont la réponse au stress et l'initiation de mort cellulaire (Liang *et al.*, 2021). Nous reconnaissons de plus en plus la contribution du réseau mitochondrial à la pathogenèse de plusieurs maladies (Liang *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2018b). De plus, il a été démontré que la mitochondrie peut répondre de manière très rapide (quelques secondes) à certains stimuli externes (Liang *et al.*, 2021). PGAM5 a été identifiée, entre autres, pour son rôle de senseur de stress permettant cette réponse rapide. En effet, lorsque la capacité mitochondriale à ressentir des stimuli devient perturbée, cela peut engendrer

un effet papillon par lequel le stress cellulaire quelconque devient amplifié (Liang *et al.*, 2021). À cet effet, le rôle de PGAM5 est très diversifié. Dans le contexte de cette thèse, la pertinence de PGAM5 est particulièrement notée par son interaction directe avec l'hétérodimère Nrf2-Keap1 (Figure 1.18). Brièvement, PGAM5 va lier Nrf2-Keap1 et créer un complexe protéique ternaire lié à la membrane mitochondriale. Le complexe PGAM5-Nrf2-Keap1 devient un senseur rédox mitochondrial (Lo et Hannink, 2008). Lorsque l'environnement mitochondrial et cytosolique deviennent inondés en ERO, PGAM5 se clive et libère Nrf2-Keap1 (Panieri *et al.*, 2022). La forme clivée de PGAM5, par son activité phosphatase, peut déphosphoryler Keap1 et interférer dans la stabilité de sa liaison avec Nrf2 (Liang *et al.*, 2021). Cette interaction permet à Nrf2 de se dissocier de Keap1 et activer les ARE dans le noyau. Bref, PGAM5 joue un rôle double en permettant un complexe ternaire de Nrf2 avec une fonction de senseur rédox ainsi qu'en déstabilisant le dimère Keap1-Nrf2 une fois clivée (Cheng *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2021; Lo et Hannink, 2008).

Outre son rôle avec Nrf2, PGAM5 agit comme un couteau à double tranchant. En réponse à des stress légers (sub-létaux), PGAM5 a été démontrée à promouvoir des mécanismes de survie mitochondriaux tels que la mitophagie et le biogénèse mitochondriale (Cheng *et al.*, 2021). Conséquemment, PGAM5 augmente la survie cellulaire lors d'un stress léger. En revanche, lors de stress sévères, PGAM5 a été noté comme un point de convergence de plusieurs voies de mort cellulaire indépendantes de la caspase (Cheng *et al.*, 2021; Hennig *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2012). Certaines études ont démontré une réduction de mort cellulaire induite par ERO, TNF- α , ou reperfusion ischémique lors d'une déplétion totale de PGAM5 (Wang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018a). D'autres études associent sa déplétion avec une réduction du taux de survie, causée par une inhibition de la mitophagie par voie de PINK1/Parkin (Holze *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2016). Son rôle semble alors très contexte-dépendant. Il y a très peu de littérature qui étudie le rôle de PGAM5 lors d'un stress thermique, et encore moins dans un contexte de traitement hyperthermique anticancer. Considérant son interaction avec Nrf2, son activité pro-survie lors de stress légers, et son rôle double lors d'un stress léthal, PGAM5 pourrait contribuer de manière active à la thermotolérance et cette contribution potentielle mérite d'être clarifiée.

1.4.4 Nrf2 et ATF5

Il est connu que la mitochondrie est une source principale d'ERO sous conditions basales homéostatiques ainsi que durant certains stress (Mailloux, 2020; Skulachev, 2012). Il existe un axe de communication critique entre Nrf2 et la mitochondrie qui régule les dynamiques bioénergétiques cellulaires, et par

conséquence impacte fortement la production d'ERO (Au *et al.*, 2024; Esteras et Abramov, 2022; Holmström *et al.*, 2016). Cependant, considérant la complexité de ces interactions et le potentiel régulateur entre Nrf2 et le réseau mitochondrial, les interactions entre Nrf2 et la mitochondrie sont loin d'être complètement élucidées. Nrf2 a déjà été démontré à impacter les dynamiques ainsi que le contrôle de qualité mitochondriaux (Au *et al.*, 2024; Esteras et Abramov, 2022; Panieri *et al.*, 2022; Shilovsky et Ashapkin, 2022; Zakic *et al.*, 2023). En revanche, certains métabolites mitochondriaux, tels que le succinate et le fumarate, ont un impact sur l'expression de Nrf2 (Shilovsky et Ashapkin, 2022). La communication entre ces deux joueurs permet d'établir un système par lequel le métabolisme des ERO pourraient être finement régulés (Shilovsky et Ashapkin, 2022). Alors, tout processus ayant le potentiel de moduler soit l'activité du réseau mitochondrial, soit Nrf2, pourrait indirectement modifier l'autre acteur et ainsi promouvoir/dégrader les réponses de stress Nrf2/mitochondrie-dépendantes (Shilovsky et Ashapkin, 2022). À cet égard, un joueur clef est le facteur de transcription activant 5 (ATF5).

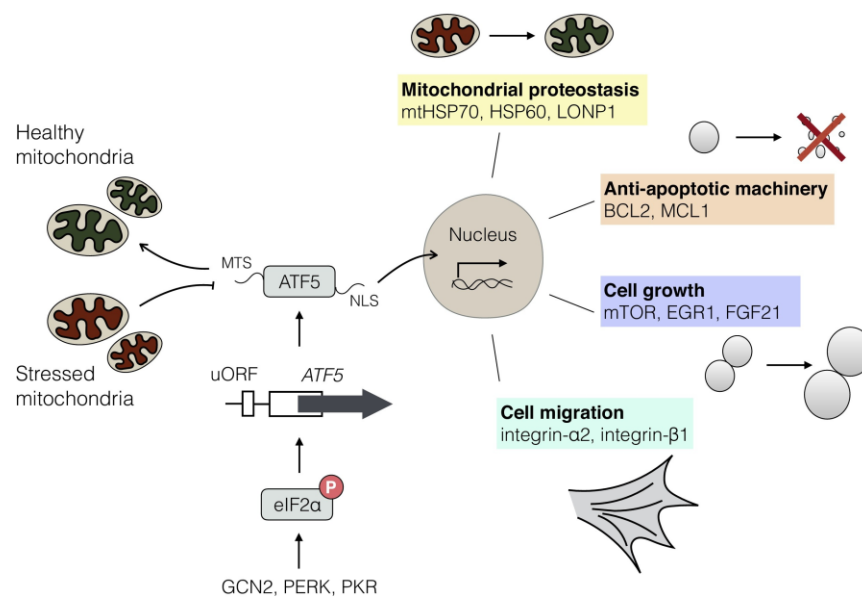


Figure 1.19 ATF5 régule une réponse UPR mitochondriale multifactorielle. MTS représente le signal de translocation mitochondrial. NLS représente le signal de localisation nucléaire. Tiré de Deng & Haynes (2017)

ATF5 est un facteur de transcription clef dans la régulation de la réponse UPR mitochondriale (mtUPR) (Fiorese *et al.*, 2016). Sa régulation est intégrée au réseau mitochondrial (Figure 1.19). Son expression est régulée par la phosphorylation en amont de eIF2α, et donc par les kinases régulatrices en

amont de eIF2 α : « general control nonderepressible 2 » (GCN2), PERK, et la protéine kinase R (PKR) (Deng et Haynes, 2017). ATF4 et la protéine homologue à C/EBP (CHOP) sont aussi requises en amont pour la transcription de ATF5 (Teske *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2008). Une fois exprimée, ATF5 est régulée par l'efficacité d'import mitochondrial. ATF5 est, en conditions de bases, transloquée à la mitochondrie par sa séquence amino-terminale de translocation mitochondriale (MTS dans la Figure 1.19). Lors de dysfonction mitochondriale, l'efficacité d'import mitochondrial chute fortement, et ATF5 est donc localisée au noyau via son signal de localisation nucléaire (NLS dans la Figure 1.19). Une fois dans le noyau, ATF5 induit la transcription de gènes influençant de manière primaire la protéostasie mitochondriale, mais aussi la machinerie anti-apoptotique, ainsi que la prolifération et migration cellulaire (Deng et Haynes, 2017; Fiorese *et al.*, 2016).

ATF5 est, principalement, une protéine de réponse au stress. Par ce fait, elle joue un rôle parallèle dans la cellule à celui de Nrf2. Malgré cela, quasiment aucune étude s'est penchée sur la communication potentielle entre ATF5 et Nrf2. Considérant les rôles parallèles de réponses aux stress et de régulation de l'homéostasie mitochondriale, il se pourrait qu'il y ait un lien régulateur entre Nrf2 et ATF5. Conséquemment, ATF5 et la mtUPR pourraient être impliquées dans le phénomène de thermotolérance. Cependant, pour l'instant, seule une étude a exploré la possibilité de ce lien (Guo *et al.*, 2024), et elle a été menée sur un modèle de cardiomyocytes. De plus, elle n'implique pas un stress environnemental thermique. Cependant, elle a démontré que la mtUPR pouvait être régulée par Nrf2 à la baisse. Considérant ces résultats prometteurs et l'absence de littérature, cette thèse visera, entre autres, à pallier ce manque en explorant l'impact régulateur de Nrf2 sur ATF5 dans un contexte de stress thermique. Nous savons que Nrf2 régule finement les dynamiques mitochondriales, et vice-versa. Nous avons, dans cette thèse, la chance de démontrer un nouveau mécanisme par lequel cette communication pourrait se traduire.

1.5 Objectifs et Hypothèses

L'environnement rédox des cellules cancéreuses est beaucoup plus oxydatif que dans une cellule saine (Schieber et Chandel, 2014). De plus, il y a une activation constitutive de Nrf2 dans les cancers, et cette protéine est considérée oncogénique dans un contexte de traitements de cancers (Bae *et al.*, 2024; Ngo et Duennwald, 2022; Panieri *et al.*, 2022; Schieber et Chandel, 2014). Il est connu qu'un traitement d'hyperthermie non espacé peut mener au développement d'une thermotolérance transitoire dans les cellules tumorales (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Glory *et al.*, 2014). De plus, des études ont démontré

l'implication de Nrf2 dans la thermotolérance induite par stress thermique subléta (Glory et Averill-Bates, 2016; Grondin *et al.*, 2024; Tchouagué *et al.*, 2019). Nous savons aussi que les ERO sont des molécules très réactives qui peuvent induire, par des mécanismes décrits plus tôt dans l'introduction, l'activation de Nrf2. Les ERO ont aussi été démontré à pouvoir activer plusieurs voies de réponse aux stress, telles que les voies impliquant Nrf1, PGAM5, DJ-1 et ATF5 (Au *et al.*, 2024; Lian *et al.*, 2024; Ngo et Duennwald, 2022; Sies *et al.*, 2022; Su *et al.*, 2023; Tripathi *et al.*, 2024; Tsui et Li, 2023). Il est connu qu'il y a une importante production d'ERO durant un stress thermique proportionnelle à la force du stress (Glory et Averill-Bates, 2016; Kassis *et al.*, 2021; Tchouagué *et al.*, 2019). Cependant, il n'est pas encore clair si les ERO formées sont nécessaires pour induire la thermotolérance par stress thermique léger de 40°C. De plus, advenant que la production de ces ERO soit démontrée, la nécessité et l'origine de ces ERO n'est pas connue. Finalement, plusieurs protéines de stress ayant soit un lien avec Nrf2, ou le potentiel d'être liées avec Nrf2, ont été décrites, mais ni leur implication dans un stress thermique, ni leur régulation par Nrf2 dans ce contexte ont été démontrées.

1.5.1 Hypothèses primaires

1. L'exposition de cellules à un choc thermique léger de 40°C mène à l'induction de la thermotolérance, qui elle-même est activée par la production accrue d'ERO activant le facteur de transcription Nrf2.
2. Selon les connaissances actuelles, durant un choc thermique léger, les ERO ont des fortes chances de provenir majoritairement de la mitochondrie ainsi que de la protéine membranaire NADPH oxydase.
3. Considérant le lien intime entre Nrf1, DJ-1, PGAM5, ATF5 et la réponse cellulaire au stress, ces protéines ont le potentiel de jouer un rôle clef dans l'établissement de la thermotolérance de manière Nrf2/ERO dépendante.

1.5.2 Objectifs

L'objectif général de cette thèse vise à clarifier le phénomène de la thermotolérance impliquant les ERO et Nrf2. En termes d'objectifs spécifiques :

- Premièrement, la thèse vise à caractériser la production d'ERO durant un stress subléta thermique de 40°C, car cette température a déjà été démontré à pouvoir induire une thermotolérance protectrice contre un stress léta subséquent de 42°C dans des cellules HeLa (Glory et Averill-Bates, 2016; Grondin *et al.*, 2024).

- Deuxièmement, cette thèse vise aussi à caractériser la production d'ERO durant un stress léthal de 42°C et à comprendre comment le prétraitement de thermotolérance affecte la production d'ERO.
- Troisièmement, nous visons à démontrer l'implication directe de Nrf2 dans la thermotolérance en modulant génétiquement son expression.
- Quatrièmement, nous voulons caractériser l'implication ERO- et Nrf2-dépendante de Nrf1, PGAM5, DJ-1, et ATF5 dans la réponse cellulaire à des stress thermiques de 40°C, et de 42°C.

De plus, nous voulons valider l'implication des protéines Nrf1, PGAM5, DJ-1, et ATF5 dans des cellules thermotolérantes exposées à 40°C et ensuite exposées à une température létale tel que 42°C. L'étude de ces protéines servira à proposer une explication mécanistique plus étendue de la thermotolérance que celle que nous possédons en ce moment. Dernièrement, une fois caractérisées, nous voulons démontrer l'implication directe des ERO en tant que molécules signalétiques dans l'induction de la thermotolérance. Tous ces objectifs, si accomplis, vont vastement bonifier notre compréhension de la thermotolérance. Ils nous permettront de créer un modèle compréhensif dont les approches thérapeutiques pourraient bénéficier à long terme.

Pour accomplir tous les objectifs ci-hauts, la thèse a été divisée en deux grands chapitres expérimentaux. Le premier chapitre vise à comprendre le phénomène de stress léger induit à 40°C, et vise à démontrer l'implication mécanistique de Nrf2 et des ERO, ainsi que l'implication potentielle des protéines secondaires Nrf1, DJ-1, et PGAM5 dans la réponse au stress léger.

Le deuxième chapitre, pour sa part, va se pencher sur les stress létaux à 42°C. Il va directement comparer la biochimie mécanistique de Nrf2/ERO dans des cellules HeLa exposées seules à 42°C avec des cellules préalablement exposées à 40°C pendant 3h avant stress à 42°C dans le but de comprendre les différences fondamentales induites par la thermotolérance. Ensuite, ce chapitre visera à démontrer l'implication d'ERO de différentes sources cellulaires à l'établissement de la thermotolérance.

Pour le premier chapitre, nous hypothétisons que :

1) la provenance des ERO à 40°C serait liée, entre autres, à deux sources spécifiques. En premier lieu, nous nous attendons à ce que le réseau mitochondrial contribue significativement à la production d'ERO, car il produit environ 90% des ERO en conditions homéostasiques (Sies *et al.*, 2022; Sies et Jones, 2020;

Skulachev, 2012). Dans le contexte de cette thèse, tous les sites de production potentiels d'ERO de la mitochondrie seront considérés comme une source unique, car l'étude approfondie de chacun de ces sites requiert un temps et des ressources qui sont hors du cadre disponible de cette thèse, et il serait physiquement impossible de valider les 41 sources uniques d'ERO (Averill-Bates, 2024) dans un projet doctoral. Deuxièmement, nous pensons que la protéine membranaire NADPH oxydase contribuerait aussi significativement à la production d'ERO à 40°C, car la chaleur a déjà été démontrée à augmenter le niveau d'ARNm des NOX (Slimen *et al.*, 2014). De plus, la chaleur peut augmenter le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, menant à une activation rapide des NOX (Vermot *et al.*, 2021). Une fois activées, les NOX produisent une poussée respiratoire d'ERO et amplifient le stress oxydatif (Chocry et Leloup, 2020; Muthuramalingam *et al.*, 2020; Vermot *et al.*, 2021). Ensuite nous pensons que Nrf2 interagirait de manière directe avec Nrf1, DJ-1, et PGAM5 lors d'un stress thermique léger de 40°C. De plus, Nrf2 utiliserait ces interactions protéiques pour réagir au stress thermique léger de manière ERO-dépendante (Lo et Hannink, 2008; Milani *et al.*, 2013; Piantadosi *et al.*, 2008; Zeb *et al.*, 2021).

2) Pour le deuxième chapitre, nous pensons que les ERO devraient être produites en plus grande quantité à 42°C qu'à 40°C. De plus, nous hypothétisons que la thermotolérance induite par pré-traitement de 3h à 40 °C réduirait le taux de mortalité cellulaire subséquent à 42°C en agissant pour prévenir la surproduction d'ERO. Nous hypothétisons aussi que les ERO, produites à plus faible quantité à 40°C, seront essentielles pour activer la thermotolérance Nrf2-dépendante, et que l'inhibition des ERO avant cette exposition pourrait inhiber l'acquisition des mécanismes de défense au stress. Selon nos hypothèses, les ERO mitochondriaux ainsi que les ERO dérivés des NOX seront essentielles à l'établissement de la thermotolérance, considérant leurs contributions proportionnelles immenses au stress oxydatif sous plusieurs conditions (Averill-Bates, 2024; Mailloux, 2020; Skulachev, 2012). Nous estimons aussi que la thermotolérance serait régulée, en partie, par une activation ERO- et Nrf2-dépendante de DJ-1 et ATF5. Considérant son rôle variable mais primordial au sein des dynamiques mitochondriales et de la mort cellulaire caspase-indépendante (Cheng *et al.*, 2021; Tsui et Li, 2023), nous nous attendons à ce que PGAM5 soit différemment exprimée dans les cellules thermotolérantes en comparaison aux cellules contrôles, et que cette différence d'expression contribuerait à la réduction de mort cellulaire.

Toutes ces manipulations seront menées sur des cellules HeLa. Les cellules d'adénocarcinome cervicaux humaines (HeLa) sont la première lignée immortelle humaine utilisée en recherche. Elles sont des cellules humaines transformées (en cancer), et originalement, constituaient des cellules épithéliales de col de

l'utérus (Lucey *et al.*, 2009). L'utilisation de ce modèle comporte deux avantages principaux. Premièrement, elles sont les cellules les plus utilisées en recherche biomédicale. Ceci permet une possibilité de reproduction des résultats avec un modèle facilement obtainable. De plus, la fonctionnalité biochimique de ces cellules a été largement caractérisée au courant des dernières décennies, permettant une base scientifique importante sur laquelle se pencher pour le montage expérimental (Lucey *et al.*, 2009). Le col de l'utérus, chez l'humain, est un des sites cancéreux qui répond bien en clinique aux traitements par l'hyperthermie (Melgarejo Segura *et al.*, 2024). Ensuite, les cellules HeLa répondent très bien au stress thermique et représentent un modèle cellulaire idéal pour comprendre le phénomène de la thermotolérance par ce fait, ainsi que par le fait qu'elles soient des cellules cancéreuses (Grondin *et al.*, 2024).

En fin de compte, cette thèse espère contribuer de manière significative à nos connaissances scientifiques en clarifiant le phénomène de la thermotolérance transitoire ainsi que son lien avec Nrf2, les ERO, et plusieurs protéines de stress dans un contexte de traitement d'hyperthermie. Nous espérons pouvoir proposer une explication mécanistique viable qui servira de base dans le futur pour le développement potentiel de thérapies anticancers.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1: NRF2 MEDIATES MITOCHONDRIAL AND NADPH OXIDASE-DERIVED ROS DURING MILD HEAT STRESS AT 40°C

Biochemica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research, 2025 Mar;1872(3):119897, doi:
10.1016/j.bbamcr.2025.119897.

Words: mild heat shock at 40°C, reactive oxygen species, mitochondria

Special issue: Oxidative Stress in Health and Disease: 11th Meeting of the Canadian Oxidative Stress Consortium (COSC2023)

Georges Hraoui^{1,2}, Mélanie Grondin¹, Sophie Breton² & Diana A. Averill-Bates^{1,*}

¹Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

²Département de sciences biologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H2V 0B3

*Corresponding Author: averill.diana@uqam.ca

Dr Diana A. Averill-Bates, Ph.D.
Département des sciences biologiques
Université du Québec à Montréal
CP 8888, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec
Canada H3C 3P8
Email: averill.diana@uqam.ca
Tel: (514) 987-3000 (4811)
Fax: (514) 987-4647

Keywords: Oxidative Stress, Mitochondria, Thermal Shock, Nrf2, Thermotolerance

Contribution des auteurs :

Georges Hraoui: Écriture du manuscrit original, visualisation, validation, méthodologie, investigation (toutes les figures), analyse formelle, curation des données.

Mélanie Grondin: Visualisation, supervision, méthodologie, investigation, analyse formelle, curation des données.

Sophie Breton: Écriture, supervision, révisions et modifications.

Diana A Averill-Bates: Écriture, révisions et modifications, visualisation, validation, supervision, ressources, administration du projet, méthodologie, investigation, acquisition des fonds, curation des données, conception.

Abstract :

Hyperthermia is an adjuvant to chemotherapy and radiotherapy and sensitizes tumors to these treatments. However, repeated heat treatments result in acquisition of heat resistance (thermotolerance) in tumors. Thermotolerance is an adaptive survival response that appears to be mediated by upregulated cellular defenses. However, the mechanisms of activation remain unclear. When HeLa cells were exposed to mild heat shock at 40°C for 3 h, levels of superoxide and peroxides increased. Cells were treated with mitochondrial antioxidant MitoQ and NADPH oxidase (NOX) inhibitor apocynin to characterize the contribution of these two sources to the total reactive oxygen species (ROS) pool. We found that both mitochondria and NOX are sources of ROS during mild heat shock at 40°C. Heat-derived ROS are thought to activate the adaptive survival response at 40°C. Nrf2, the master regulator of the cellular antioxidant response, is thought to play a pivotal role in establishing the adaptive survival response. Nrf2 was overexpressed or knocked down to assess its role. Moreover, Nrf2 levels correlate with the cellular redox state, and do so via scavenging of mitochondria- and NOX-derived ROS. Knockdown of Nrf2 markedly increased levels of ROS that were scavenged by either apocynin or MitoQ. Finally, critical defense proteins such as DJ-1 and PGAM5 seemed to require a two-key activation system mediated by Nrf2 and mitochondrial ROS. Our study characterized mitochondrial and NOX-derived ROS as being essential in activating cellular defenses alongside Nrf2 and underlines potential therapeutic targets that may contribute to the acquisition of thermotolerance.

Résumé:

L'hyperthermie constitue un adjuvant à la chimiothérapie et à la radiothérapie, et sensibilise les tumeurs à ces traitements. Cependant, des expositions répétées à la chaleur entraînent l'acquisition d'une résistance thermique (thermotolérance) par les tumeurs. La thermotolérance est une réponse adaptative de survie qui semble être médiée par l'activation des défenses cellulaires. Toutefois, les mécanismes responsables de cette activation restent mal compris. Lorsque des cellules HeLa ont été soumises à un stress thermique modéré à 40°C pendant 3 heures, les niveaux de superoxyde et de peroxydes ont augmenté. Les cellules ont été traitées avec l'antioxydant mitochondrial MitoQ et l'inhibiteur de la NADPH oxydase (NOX), l'apocynine, afin de caractériser la contribution de ces deux sources à l'ensemble total d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Nous avons constaté que les mitochondries et la NOX sont toutes deux des sources de ROS lors d'un stress thermique modéré à 40°C. Il est supposé que les ERO induits par la chaleur activent la réponse adaptative de survie à cette température. Nrf2, le régulateur principal de la réponse antioxydante cellulaire, jouerait un rôle central dans l'établissement de cette réponse adaptative. L'expression de Nrf2 a été soit augmentée, soit inhibée pour évaluer son rôle. Les niveaux de Nrf2 sont corrélés à l'état rédox de la cellule, et ce via l'élimination des ERO d'origine mitochondriale et de la NOX. L'inhibition de Nrf2 a entraîné une augmentation marquée des niveaux de ERO, qui ont été neutralisés par l'apocynine ou MitoQ. Enfin, des protéines de défense essentielles telles que DJ-1 et PGAM5 semblent nécessiter un système d'activation à double signal, impliquant Nrf2 et les ERO mitochondriaux. Notre étude caractérise les ERO d'origine mitochondriale et NOX comme étant essentiels à l'activation des défenses cellulaires en synergie avec Nrf2, et souligne des cibles thérapeutiques potentielles susceptibles de contribuer à l'acquisition de la thermotolérance.

2.1 Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive oxygen-derived molecules such as superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). They can be generated as metabolic by-products and by exposure to environmental stresses such as UV radiation (Leach *et al.*, 2001), hypoxia (Solaini *et al.*, 2010), heavy metals (Fu & Xi, 2020), and heat shock (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). Most cellular ROS are thought to originate from mitochondria and the membrane protein NADPH oxidase, although other sources such as flavin-centered oxidases in peroxisomes and the endoplasmic reticulum, and β -oxidation of fatty acids in peroxisomes also contribute to their production (Thannickal & Fanburg, 2000; Sies *et al.* 2022). In mammalian cells, it was reported that there are 41 sources of H_2O_2 and/or $O_2^{\bullet-}$ -generating enzymes (Sies & Jones, 2020). Two examples are xanthine oxidase and glucose oxidase. The effects of ROS in the cell are diverse, and concentration dependent (Thannickal & Fanburg, 2000). At low concentrations, ROS possess functions in vital cellular processes such as growth, differentiation, proliferation, cell signaling, the activation or repression of transcription factors and gene expression, programmed cell death, regulation of phosphorylation cascades, cell cycle regulation, migration and adhesion, energy metabolism, embryonic development, cytoskeletal rearrangements, and immune function (Averill-Bates, 2024; Mailloux, 2020; Sies & Jones, 2020). At high concentrations, ROS generally disrupt cellular homeostasis by oxidizing DNA, lipid membranes and proteins leading to various potential pathological conditions (Sies & Jones, 2020).

At low concentrations, ROS have been associated with induction of the cellular adaptive response (Pallepati & Averill-Bates, 2010; Tchouague *et al.*, 2019), but the mechanisms and modalities underlying this activation have yet to be completely elucidated. The cellular adaptive response consists of a dynamic and multi-faceted cell signaling cascade that is activated when the cell is exposed to a sub-lethal environmental stress such as heat shock, or toxic substances (Calabrese & Baldwin, 2002; Calabrese *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2019; Roy *et al.*, 2009). This process encompasses, but is not limited to, activation of antioxidant pathways (Pallepati & Averill-Bates, 2010; Tchouague *et al.*, 2019), induction of autophagy pathways (Glick *et al.*, 2010), and the accumulation of heat shock proteins (Somero, 2020). These pathways are often upregulated during a sub-lethal environmental stress. The cellular adaptive response also improves survival following subsequent exposure of the cell to a lethal stressor (Crawford & Davies, 1994). Despite recent advances in the field, the mechanisms underlying activation of the cellular adaptive response are not fully understood (Velichko *et al.*, 2013; Calabrese *et al.*, 2021).

A key player in mediation of adaptive responses is the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). This transcription factor has been linked to protective effects of the cellular adaptive response acquired through mild heat stress (Glory & Averill, 2016). Under homeostatic conditions, Nrf2 is bound to a Keap1 dimer in the cytosol, which promotes its ubiquitination and targets it for proteasomal degradation (Averill-Bates, 2024; Belezza et al., 2018). An increase in oxidative stress causes oxidation of cysteine residues on Keap1, allowing Nrf2 to dissociate from Keap1 (Suzuki et al., 2023). Nrf2 then undergoes phosphorylation and translocates to the nucleus where it binds to antioxidant response elements (ARE) alongside small Maf proteins (Katsuoka et al., 2005). This, in turn, allows the transcription of a variety of antioxidant and cytoprotective genes, which are responsible for Nrf2's protective properties (Belezza et al., 2018; Glory & Averill, 2016). Because Nrf2 is linked to cellular antioxidant processes, it likely plays a role in mediating activation of the cellular adaptive response through ROS, although the mechanisms involved have not been fully elucidated.

To better clarify the cellular adaptive response, we targeted several proteins that could be implicated in this phenomenon. Parkinson disease protein 7/protein deglycase (DJ-1) is a redox-sensitive positive regulator of Nrf2. DJ-1 has been shown to activate antioxidant defenses through the Nrf2 pathway (Milani et al., 2013). Specifically, DJ-1 stabilizes Nrf2 by interfering with the ubiquitination process involving Keap1 (Clements et al., 2006). While DJ-1 is a protein with multi-faceted roles (Raniga et al., 2017), its close relationship with Nrf2 underlines its potential implication in the cellular adaptive response.

Another protein, phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5), has recently emerged as a key player in mitochondrial homeostasis (Liang et al., 2021). PGAM5 has been shown to promote mitophagy and mitochondrial biogenesis in response to sublethal stress. However, more severe cellular insults have been linked to PGAM5-mediated excessive mitochondrial fission, disruption of mitochondrial movement, and increased apoptotic/necroptotic signals (Hennig et al., 2018; Cheng et al., 2021). Interestingly, PGAM5 also acts as a crucial link between Nrf2 and mitochondria. PGAM5 tethers the Keap1/Nrf2 complex to mitochondria by binding to the Keap1 dimer through their conserved E(S/T)GE motifs. This allows the ternary Keap1/Nrf2/PGAM5 complex to act as a mitochondrial redox sensor (Lo & Hannink, 2008; Zeb et al., 2021).

Of the many AREs targeted by Nrf2 in response to oxidative stress, four of them are found in the promoter region of Nuclear respiratory factor 1 (Nrf1) (Piantadosi et al., 2008). This redox-sensitive transcription

factor regulates many mitochondrial metabolic processes, such as oxidative phosphorylation (OXPHOS) via regulation of the mitochondrial transcription factor A (TFAM) (Fan et al., 2021). Given that mitochondria are presumed to be one of the key producers of cellular ROS, and Nrf1 is directly regulated by the ARE, it may play a role in the cellular adaptive response through upstream regulation of mitochondrial metabolism, and as such, of oxidative stress.

Elevated temperatures ($> 42.5^{\circ}\text{C}$) are relevant to cellular adaptive response research, because hyperthermia is a promising treatment often administered in combination with radiotherapy and/or chemotherapy in many different types of cancers (Van der Zee, 2002; Baronzio, 2014; Issels et al., 2016; Datta et al., 2020). Short exposures (e.g. ≤ 1 h) of cells to high temperatures ($41.5\text{--}45^{\circ}\text{C}$) and longer exposures (e.g. ≥ 3 h) to lower temperatures ($39\text{--}41^{\circ}\text{C}$) induce transient resistance to subsequent lethal heat shock ($> 42.5^{\circ}\text{C}$) (Landry et al., 1982; Bettaieb & Averill-Bates, 2008). This phenomenon, known as thermotolerance, is detrimental to hyperthermia treatment because it dampens its effectiveness by increasing cancer cell resistance to the cytotoxic effects of heat stress. The acquisition of thermotolerance has been associated with increased expression of defense mechanisms like heat shock proteins (Landry et al., 1982; Bettaieb & Averill-Bates, 2008), which allow the cell to maintain homeostatic functions during heat stress (Zhou et al., 2019). Because thermotolerance is transient, hyperthermia treatments are usually administered at intervals of time to allow for heat resistance to decline.

Heat stress and thermotolerance are but one example of the cellular adaptive response in action, but they present an interesting model of research, because the environmental stressor in play (temperature) is easily modulated in vitro. Thus, this study aims to improve understanding of the interplay between ROS produced in response to a mild heat stress of 40°C and the subsequent acquisition of thermotolerance. Specifically, we aim to characterize the putative ROS producers implicated in mild heat stress at 40°C and to uncover how Nrf2 mediates these ROS. We hypothesized that mitochondria and the NADPH oxidase (NOX) family of membrane proteins were the most probable sites of ROS production, because these sites have been previously implicated in ROS production in response to heat stress (Shin et al., 2008; Belhadj et al., 2014; Yu et al., 2020). We aimed to investigate the role of these two putative ROS sources in establishment of the cellular adaptive response using selective inhibitors, apocynin, and Mitoquinone mesylate (MitoQ). Apocynin inhibits NOX activity by binding to its p47phox subunit and preventing assembly of the protein (Yu et al., 2008). MitoQ is a mitochondria-targeted antioxidant that mimics and

enhances endogenous levels of Coenzyme Q10 (Tauskela, 2007). It contains an antioxidant quinone moiety covalently bound to a lipophilic, triphenyl phosphonium cation (Smith & Murphy, 2010).

The novelty of this study lies in the identification of mitochondria and NOX as probable sources of ROS during mild heat stress induced at 40°C. Moreover, the regulatory impact of Nrf2 on multiple stress response proteins, such as PGAM5, Nrf1, and DJ-1, has been outlined by using Nrf2 knockdown cells. This study adds to the crucial body of literature surrounding transient thermotolerance and highlights potential therapeutic targets that may be targeted to bypass or diminish its effect in the context of anticancer treatments using hyperthermia.

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Cell Culture

Human cervical adenocarcinoma HeLa cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; ATCC no. CCL-2) were grown in monolayer cultures in tissue culture flasks (Sarstedt, Saint-Laurent, QC, Canada). These flasks contained Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Canada, ThermoFisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Canada), penicillin (50 units/mL), and streptomycin (50 µg/mL) (Hyclone Laboratories, ThermoFisher Scientific). All cells used in experiments were between the 10th and 20th passages. Cell cultures were maintained in an incubator at 37°C with a humidified atmosphere of 5% CO₂ (model MCO-19AIC, Sanyo, ESBE Scientific, Markham, ON, Canada) (Glory et al., 2014; Grondin et al., 2024). The temperature control was $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ and CO₂ control was $\pm 0.15\%$. Twenty-four hours before experiments, cell culture medium was replaced with fresh medium. After experimentation, cells were harvested using 0.5 mg/mL trypsin / 0.2 mg/mL EDTA in phosphate buffered saline (PBS). Cells were then washed by centrifugation (1000 x g) for 3 min.

2.2.2 Cell Lines with Overexpression or Knockdown Expression of Nrf2

Two modified HeLa cell lines were created, with overexpression (OE) or knockdown (KD) of the *Nrf2* gene, using Nrf2-specific CRISPR/Cas9 (sc-400017-NIC) and Nrf2 Lentiviral Activation Particles (sc-400017-LAC), as recommended by the manufacturer (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) (Grondin et al., 2024). For the Nrf2 KD cells, a pair of plasmids was designed to knockout gene expression of *Nrf2*. Each of the plasmids encoded a D10A-mutated Cas9 nuclease and a target-specific RNA (gRNA) (Santa Cruz

Biotechnology). For overexpression of Nrf2, a synergistic activation mediator (SAM) transcriptional activation system designed to upregulate gene expression specifically and efficiently via lentiviral transduction was used (Santa Cruz Biotechnology).

2.2.3 Chemical and Heat Treatments

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Canada Co. (Oakville, ON, Canada) unless specified otherwise. Twenty-four hours before experiments, freshly harvested cells were resuspended in DMEM/10% FBS at 1×10^6 cells/mL in a final volume of 5 mL. HeLa cells were then separated into three chemical treatment groups, where applicable. The first group was untreated. The second group was treated with apocynin (1 mM) (Cayman Chemical, Cedarlane Canada, Burlington, ON, Canada) for 30 min before experimentation. The third group was treated with MitoQ (300 nM) (Cayman Chemical) for 18 h before experimentation. Apocynin was diluted in 95% ethanol to a final concentration of 0.75%. Ethanol concentrations under 1% do not affect cell viability (Kar et al., 2021). To select the apocynin concentration, we chose the highest non-toxic concentration (1 mM) shown in a previous study (Krupashree et al., 2024). A 30 min exposure was used, because we found that it was the shortest time to have an inhibitory effect in HeLa cells. MitoQ was diluted in nanopure water. A concentration range of 100-1000 nM Mito Q was tested during 18 h for inhibition of basal levels of MitoSOX fluorescence at 37°C (Suppl. Fig. 2.S1). The minimum concentration of MitoQ that inhibited ROS fluorescence (300 nM) was selected for experiments.

Where appropriate, cells were pre-treated with either polyethylene-glycol superoxide dismutase (PEG-SOD) (100 units/mL) or polyethylene-glycol catalase (PEG-CAT) (300 units/mL) for 3 h at 37°C before heat treatment at 40°C. Controls were untreated for 3 h at 37°C prior to heat treatment.

To induce a mild, sublethal heat shock, the three groups of cells were transferred to a humidified incubator at 40°C, with 5% CO₂, and heated for times from 30 to 180 min (Redza-Dutordoir et al., 2016). Cells were then washed by centrifugation (1000 x g) for 3 min to remove chemicals, and analyzed for levels of Nrf2, DJ-1, PGAM5, and Nrf1.

We determined if mild heat shock at 40°C could affect cell survival. There was no loss of cell viability, and no induction of cell death by apoptosis (Suppl. Fig. 2.S2A) or caspase-3 activation during 3 h at 40°C (Suppl. Fig. 2.S2B). These results agree with our previous work (Grondin et al. 2024). Therefore, heat treatment at 40°C for up to 3 h was a non-toxic preconditioning treatment that does not decrease cell survival.

2.2.4 Flow Cytometry Analysis

Cells were labeled with for 15 min with the following fluorescent ROS probes before analysis by flow cytometry: dihydroethidium (DHE) (0.5 μ M) and PeroxiYellow 1 (PY1) (15 μ M), or their mitochondrial equivalents MitoSOX (0.5 μ M) and MitoPY1 (10 μ M). At least 10,000 cells were analyzed for each sample. The flow rate was set at 35 μ L/min (BD AccuriTM C6, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). PY1 and MitoPY1 were detected using the FL1 channel, while DHE and MitoSOX were detected using the FL3 channel. For the C6 flow cytometer, pre-optimizing voltage and gain settings did not reduce the fluorescence detection range (Grondin et al., 2024). Data analysis was carried out using the BD AccuriTM C6 software. Doublet exclusion was performed by plotting the height or width against the area for forward scatter or side scatter (Suppl. Fig. 2.S3A). Doublets will have double the area and width of single cells, while the height remains almost the same. Therefore, disproportions between height, width, and area can be used to discriminate doublets (Bio-Rad, flow cytometry guide) (Grondin et al., 2024).

2.2.5 Live Cell Imaging by Confocal Microscopy

Twenty-four hours before experiments, 0.2×10^6 cells/mL were plated in a μ -Slide 8-well plate for 24 h (Ibidi, Fitchburg, WI, USA). For live cell imaging by confocal microscopy, cells in 8-well plates were incubated in a micro-incubator with control of temperature, CO₂, and humidity (Grondin et al., 2024). Live cell imaging was conducted at 5 min intervals from 5 to 180 min at 40°C. Cells were labeled with multiple fluorescent probes in parallel for confocal analysis. To stain nuclei, cells were labeled with Hoechst 33258 (1.25 μ M) (Sigma-Aldrich Canada Co.) for 15 min at 37°C. For detection of cellular ROS, cells were labeled in parallel with DHE (0.5 μ M) (Molecular Probes, Invitrogen Canada) and PY1 (15 μ M) (Sigma-Aldrich Canada Co.) for 15 min. For mitochondrial ROS levels, cells were labeled with MitoSOX (0.5 μ M), and MitoPY1 (10 μ M) (Molecular Probes) for 15 min. For mitochondrial membrane potential, cells were labeled with JC-1 (7.5 μ M) (Molecular Probes, Invitrogen Canada) for 15 min. Where indicated, cells were pretreated with 3 μ M carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) for 5 min. Live cell imaging at 40°C was conducted with NIS-Element AR4 software using standard excitation and emission filters for visualizing the fluorescent probes, using a Confocal inverted microscope Nikon A1+ high sensitivity (cathode GaAsP) (Nikon Canada, Montréal, QC) with a 60X objective (Plan Apo λ , Oil) (Nikon) (Grondin et al., 2024). It is composed of a multispectral detector on 32 channels with resolutions from 2.6 to 10 mm and is equipped with a XY motorized platinum and piezoelectric system for fast movement in Z-

stack. The sample area is scanned at a resolution of 512 x 512 pixels in 0.6 sec. Images were analyzed using FIJI software (National Institutes of Health (NIH), Maryland, USA). Fluorescence intensities were reported to the number of cells and compared between different treatments and untreated controls (37°C). Multiple replicates were performed per experiment and at least 500 cells were analyzed per condition. Due to variability in the fluorescent signal between different experiments, the analysis was consistently referenced to the baseline (zero point) of the normal control condition for accurate analysis and comparison. The temporal trend of each condition remained similar across experiments.

For live cell imaging, the same cells were followed during a 3-hour kinetic run using multiple fluorescent probes that were added simultaneously. All 7 treatment conditions (WT, WT + MitoQ, WT + Apocynin, Nrf2 KD, Nrf2 OE, Nrf2 KD + MitoQ, Nrf2 KD + Apocynin) were recorded at the same time using cells in 8-well plates. The experimental setup is shown in Suppl. Fig. S4. Cellular and mitochondrial ROS-stained cells, respectively, were separated onto two separate plates and assessed in series. Data was thus collected in parallel for all 7 conditions, and experiments were repeated between 4 and 7 times. However, we have separated the analyses and presentation across different figures to improve clarity and understanding of the data. Merge channels show the overlap between different fluorescent probes. As such, repetition of data for WT cells as well as for Nrf2 KD cells arises from this process and is clarified in the appropriate figure legends.

2.2.6 Western Blot Analysis

After experiments, cells were harvested and washed by centrifugation (1000 x g) in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid (MOPS), pH 7.4) (Samali et al., 1999). The supernatant was then discarded. The remaining pelleted cells were resuspended in a lysis buffer (20 mM MOPS, 80 mM β -glycerol phosphate, 10% glycerol, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 , 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM NaF, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1% Triton X-100, pH 7, and a cocktail of protease inhibitors containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM aprotinin, 10 μM pepstatin A, 10 μM leupeptin, and 25 μM calpain inhibitor, pH 7.4 (Complete Mini, Roche, Millipore Sigma, Etobicoke, ON, Canada). They were then frozen overnight at -80°C. They were thawed on ice for 30 min with constant vortexing, and then a 10 min centrifugation (2500 x g). Whole cell lysates were then collected, while allowing the removal of nuclei, and unbroken cells. Proteins were quantified using the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd, St Laurent, QC), and 30 μg of protein were separated by SDS-

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (15%) (Laemmli, 1970). For Western blotting, proteins were detected using rabbit primary antibodies recognizing Nrf1 (D9K7R), DJ-1 (DN9E5), PGAM5 (E8C3L) (1:500) (Cell Signaling Technology Inc, New England Biolabs Canada, Whitby, ON, Canada), or Nrf2 (1:500) (Medimabs, Montreal, QC, Canada). Horseradish peroxidase-conjugated polyclonal mouse and rabbit secondary antibodies (1:5000) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) were used. Protein expression was analyzed relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) (1:5000, Medimabs) using a laser scanning densitometer (Fusion Fx7, Montréal Biotech (MBI), Montreal, QC) and Quantity one software (Bio-Rad Laboratories) (Glory et al., 2014; Grondin et al., 2024). Each primary antibody was quantified using the appropriate GAPDH loading control from the same membrane. All 7 conditions presented (WT, WT + MitoQ, WT + Apocynin, Nrf2 KD, Nrf2 OE, Nrf2 KD + MitoQ, Nrf2 KD + Apocynin) were detected and quantified in parallel. Data was separated into different figures to improve clarity and understanding. Each sample was split onto two membranes wherein one was analysed for Nrf1 and DJ-1, while the other membrane was analysed for Nrf2 and PGAM5. As such, levels of Nrf1/DJ-1 as well as Nrf2/PGAM5 used the same loading control from their two respective membranes. To reprobe for the next antibody, membranes were stripped using 0.2 M glycine at pH 2.2 for 1h.

2.2.7 Cell death

Cell death was evaluated by three independent methods following heat treatment at 40°C for up to 3 h. (1). For caspase 3 activity, cells were harvested and suspended in a caspase buffer (10% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 20 mM 1,4-piperazinediethanesulfonic acid, 100 mM sodium chloride (NaCl), 10 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, pH 7.2), and then frozen at -80°C. Enzymatic activity was determined in thawed cell lysates using 200 µM Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin (Calbiochem, MilliporeSigma, Sigma-Aldrich Canada) as substrate for caspase-3 (Grondin et al., 2024). The kinetic reaction used to generate 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) (λ_{ex} : 380 nm, λ_{em} : 460 nm) was detected by spectrofluorometry (Varioskan Lux, ThermoScientific, St Laurent, QC, Canada). Enzymatic activity was normalized to activity of unheated controls at 37°C. (2). Apoptosis was evaluated by calculating the percentage of cells with nuclear chromatin condensation (25 µg/ml Hoechst 33342 staining (Sigma-Aldrich Canada co.)) in confocal microscope images. (3). For viability,

cells were labeled with 2 μ M propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich Canada co.) for 5 min and detected using the FL3 channel on the BD Accuri™ C6 flow cytometer. PI is excluded from live cells.

2.2.8 Statistics

Data shown represents means $\pm$ SEM from a minimum of three to twelve independent experiments that were performed in duplicate. Statistical analyses and figures were made using the software GraphPad Prism8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For comparisons among the different time points and groups, one-way and two-way analysis of variance (ANOVA), which measures the linear contrast of means, were respectively performed to test for significant differences between treatments. To control the family-wise error rate at the desired level ($\alpha = 5\%$), the Bonferroni-Holm method was used. For significant differences between time points, # represents $p < 0.05$, ## represents $p < 0.01$, ### represents $p < 0.001$ and #### represents $p < 0.0001$ between cells heated at 40°C compared to controls at 37°C. For significant differences between treatments, * represents $p < 0.05$, ** represents $p < 0.01$, *** represents $p < 0.001$ and **** represents $p < 0.0001$ between cells heated at 40°C compared to controls at 37°C.

2.3 Results

2.3.1 Mild heat shock at 40°C increased cellular and mitochondrial ROS levels

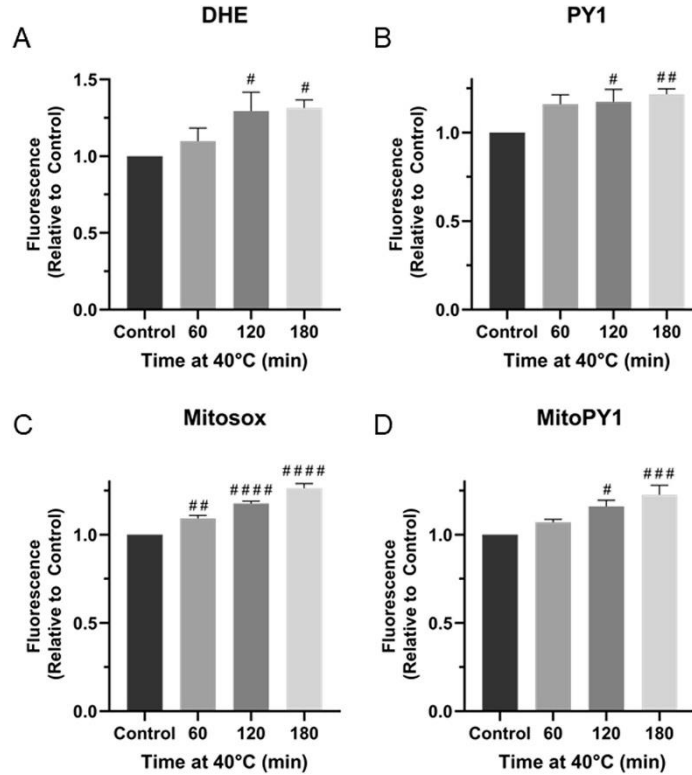


Figure 2.1 Mild heat shock at 40°C increases levels of cellular and mitochondrial ROS. Cells were exposed to mild heat shock at 40°C for 60, 120 and 180 min and analyzed by flow cytometry. Cellular levels of superoxide (n = 4) (A), and peroxides (n = 4) (B), and mitochondrial levels of superoxide (n = 6) (C), and peroxides (n = 6) (D). Data was expressed as fluorescence relative to unheated controls at 37°C (Control). Data was expressed as means $\pm$ SEM. (# p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001). Pound symbols denote a statistically significant difference between the control and different time points.

We evaluated if a survival response induced by mild heat shock at 40°C could increase the production of ROS in HeLa cells. Indeed, ROS levels increased in cells that were heated at 40°C, compared to untreated controls at 37°C (Fig. 2.1). Cellular levels of superoxide were detected using DHE fluorescence (Fig. 2.1A, Suppl. Fig. 2.S3B to 2.S3F), and peroxides with PY1 fluorescence (Fig. 2.1B). Cellular levels of superoxide and peroxides increased gradually after 60 and 120 min and remained stable after 120 min. Increases in cellular ROS levels were significant after 120 to 180 min compared to controls. After 120 min at 40°C, superoxide levels were 30% higher, while peroxide levels increased by 17%, compared to controls.

To determine if the mitochondrial network contributed to this increase in cellular oxidative stress, superoxide and peroxide levels were ascertained using mitochondria-targeted fluorescent probes, MitoSOX and MitoPY1, respectively. The increases in mitochondrial superoxide (Fig. 2.1C) and peroxides (Fig. 2.1D) at 40°C were statistically significant. The increase in MitoSOX fluorescence (+ 9%) was significant after 60 min, while MitoPY1 fluorescence (+16%) increased significantly after 120 min. Superoxide levels were 26% higher after 180 min and peroxides 23% higher, relative to controls. Considering the similarity between increases in cellular (Fig. 2.1A, 2.1B) and mitochondrial ROS (Fig. 2.1C, 2.1D), we surmised that the mitochondrial network was a likely contributor to overall ROS production during mild heat shock at 40°C.

2.3.2 ROS fluorescence at 40°C was partially inhibited by selective antioxidants

The increases in levels of superoxide and peroxides during mild heat shock at 40°C were confirmed by confocal microscopy using live cell imaging (Fig. 2.2A-2.2D, Suppl. Fig. 2.S5). To validate the selectivity of the fluorescent probes DHE, PY1, MitoSOX, and MitoPY1 for ROS, cells were pre-treated with either PEG-SOD or PEG-CAT. Cells were then exposed to mild heat shock at 40°C for different times from 5 to 90 min. There was a significant reduction in DHE fluorescence in cells pre-treated with PEG-SOD relative to the non-antioxidant-treated control (Fig. 2.2A, Suppl. Fig. 2.S5A, 2.S5E). At time = 0, cells treated with PEG-SOD showed 12% lower DHE fluorescence relative to the control. After 90 min at 40°C, levels of DHE fluorescence in untreated control cells had increased by 15%, while PEG-SOD-treated cells revealed a smaller increase of 4%. Cells stained with MitoSOX did not show significant differences relative to untreated control cells when treated with PEG-SOD (Fig. 2.2C, Suppl. Fig. 2.S5B, 2.S5F). Furthermore, there was no difference in DHE or MitoSOX fluorescence in cells pre-treated with PEG-CAT, relative to controls that were untreated with the antioxidant (Fig. 2.2A, 2.2C, Suppl. Fig. 2.S5A to 2.S5D).

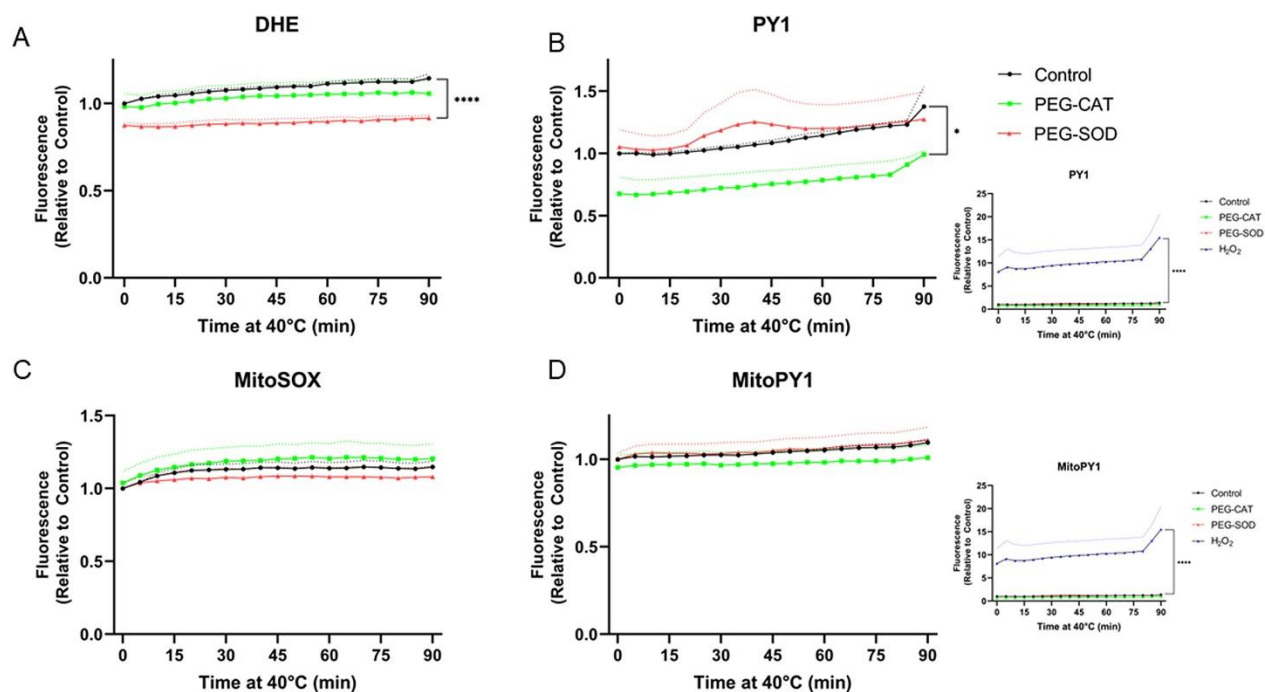


Figure 2.2 Antioxidant treatment reduces fluorescence levels of ROS probes at 40°C. Untreated cells (Control at 37°C) and cells pre-treated with antioxidants PEG-CAT or PEG-SOD were subjected to mild heat shock at 40°C for different times from 0 to 90 min. Fluorescence measurements were collected every 10 min using live cell imaging with a confocal microscope. Data for cellular levels of superoxide (A), and peroxides (B), and mitochondrial levels of superoxide (C), and peroxides (D) were expressed as fluorescence relative to untreated controls (T = 0) (n = 4). Hydrogen peroxide was used as a positive control. Data was expressed as means $\pm$ SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Asterisks denote a statistically significant group difference of the treatment condition from the control.

Cells pre-treated with PEG-CAT displayed significantly lower levels of PY1 fluorescence during heating at 40°C for 90 min, compared to non-antioxidant-treated controls (Fig. 2.2B, Suppl. Fig. 2.S5A, 2.S5B). PY1 levels in the PEG-CAT group were 33% lower at t = 0. There was a tendency for a small decrease in MitoPY1 levels in PEG-CAT-treated cells (Fig. 2.2D, Suppl. Fig. 2.S5B, 2.S5D). Cells stained with PY1 (Fig. 2.2B) or MitoPY1 (Fig. 2.2D) showed no differences in fluorescence with PEG-SOD treatment, compared to non-antioxidant-treated controls (Suppl. Fig. 2.S5A, 2.S5E; 2.S5B, 2.S5F). H₂O₂ reacted with both the PY1 and MitoPY1 probes and showed significant 700% and 400% increases in fluorescence, respectively, relative to untreated controls at t = 0 (Fig. 2.2B, 2.2D insets; Suppl. Fig. 2.S5G, 2.S5H). In summary, the decreases in levels of PY1 fluorescence with PEG-CAT treatment, and DHE fluorescence with PEG-SOD treatment, confirm the selectivity of these probes for detecting cellular ROS. MitoPY1 and MitoSOX are mitochondria-targeted ROS probes, which were essentially unaffected by antioxidant treatments. It is unlikely that PEG-SOD or PEG-CAT could enter mitochondria, although this is not clear.

2.3.3 MitoQ scavenges cellular and mitochondrial ROS during mild heat shock at 40°C

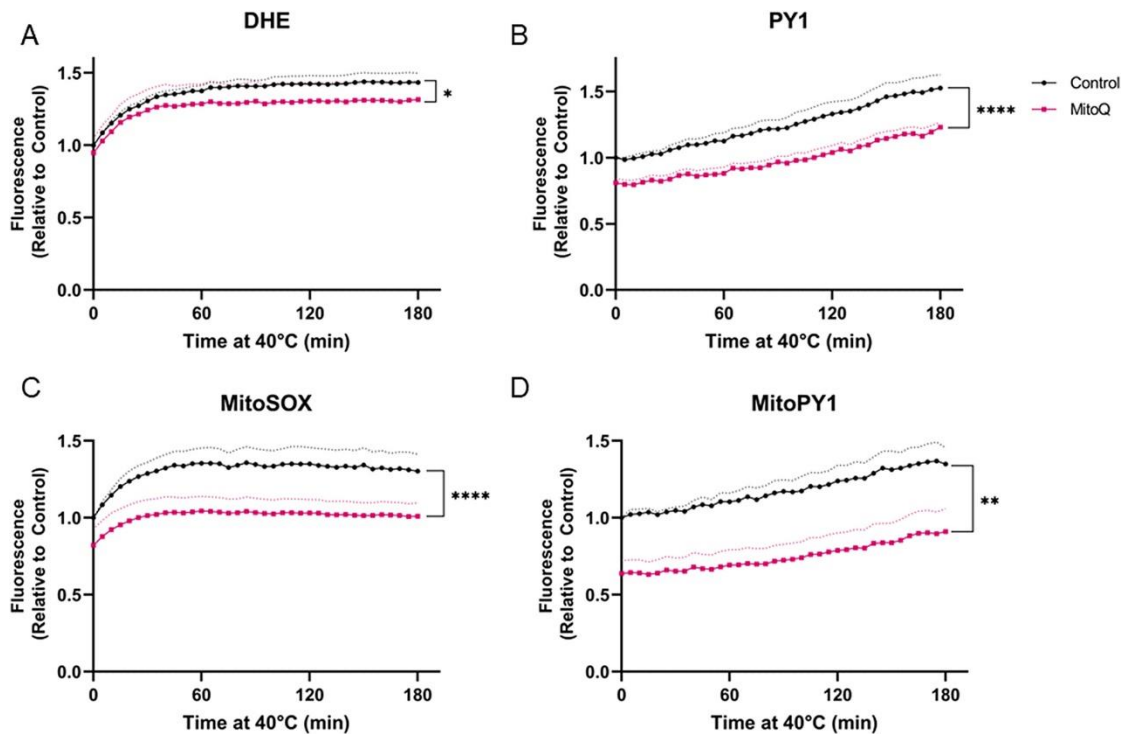


Figure 2.3 MitoQ scavenges cellular and mitochondrial ROS during mild heat shock at 40°C. Untreated cells and cells pre-treated with MitoQ were exposed to mild heat shock at 40°C for different times up to 180 min. Fluorescence measurements were collected using live cell imaging with a confocal microscope every 5min. Cellular superoxide (n = 7) (A), cellular peroxides (n = 7) (B), mitochondrial superoxide (n = 6) (C), and mitochondrial peroxides (n = 6) (D) were expressed as fluorescence relative to unheated control (T = 0). Data was expressed as means $\pm$ SEM. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). Asterisks denote a statistically significant group difference of the treatment condition from the control.

The results from Fig. 2.1 suggest that mitochondria contribute to the increase in ROS production at 40°C. To confirm this, we determined if MitoQ, a mitochondrial antioxidant, could decrease ROS production during mild heat shock. Cells were pre-treated with MitoQ, and then subjected to mild heat shock at 40°C for different times from 5 to 180 min. Cellular levels of superoxide (Fig. 2.3A) and peroxides (Fig. 2.3B) increased significantly during 180 min at 40°C and were reduced significantly when cells were treated with MitoQ, compared to controls (Suppl. Fig. 2.S6A, 2.S6C). MitoQ-treated cells possessed significantly less superoxide (-12%), and peroxides (-19%) after 180 min, relative to non-treated cells (Fig. 2.3A, 2.3B).

To determine if the decreases in ROS levels following MitoQ treatment (Fig. 2.3A, 2.3B) could be attributed to a decrease in mitochondrial ROS, cells were stained with mitochondrial ROS probes. The inhibitory

effect of MitoQ treatment was more pronounced on mitochondrial ROS levels (Figs. 2.3C, 2.3D, Suppl. Fig. 2.S6B, 2.S6D). Mitochondrial superoxide levels were reduced significantly by 18% following MitoQ treatment at $t = 0$ (Fig. 2.3C). After 180 min at 40°C, levels of superoxide in untreated controls increased by 31%, while the increase was smaller (17%) in MitoQ-treated cells. Mitochondrial peroxide levels at time = 0 were 36% lower in MitoQ-treated cells relative to the untreated control (Fig. 2.3D). After 180 min at 40°C, mitochondrial peroxide levels in MitoQ-treated cells were significantly lower by 43%, compared to controls. These results reinforced our hypothesis that the mitochondrial network was a likely contributor to increased ROS production during mild heat shock at 40°C.

2.3.4 Apocynin scavenges cellular and mitochondrial ROS during mild heat shock at 40°C

NOXs are a family of membrane proteins known for their capacity to induce an oxidative burst and are an important cellular source of ROS (Vermot *et al.*, 2021). These enzymes reduce oxygen to produce superoxide and hydrogen peroxide, which is coupled to NADPH oxidation. To determine if NOXs could be a source of ROS during mild heat shock, cells were pre-treated with the NOX inhibitor apocynin, before exposure to 40°C for different times up to 180 min. Cellular and mitochondrial ROS levels were evaluated by live cell imaging via confocal microscopy (Fig. 2.4, Suppl. Fig. 2.S6A, 2.S6E; 2.S6B, 2.S6F). Cells treated with apocynin showed significant 22% lower levels of basal superoxide (Fig. 4A) and 24% lower levels of cellular peroxides (Fig. 2.4B), relative to untreated controls at time = 0 (Suppl. Fig. 2.S6A, 2.S6E). After 180 min at 40°C, apocynin-treated cells had 30% less cellular superoxide, and 47% less cellular peroxides in comparison to non-apocynin-treated controls. Interestingly, apocynin also imparted a protective effect on levels of mitochondrial superoxide (Fig. 2.4C) and peroxides (Fig. 2.4D) at 40°C (Suppl. Fig. 2.S6B, 2.S6F). Mitochondrial ROS levels were significantly lower by 20-45% in apocynin-treated cells, relative to untreated controls during the 180 min heat shock. Together, these results indicate that both mitochondria and NOXs are sources of ROS production during mild heat shock at 40°C (Figs. 2.3, 2.4). However, other sources of ROS cannot be ruled out.

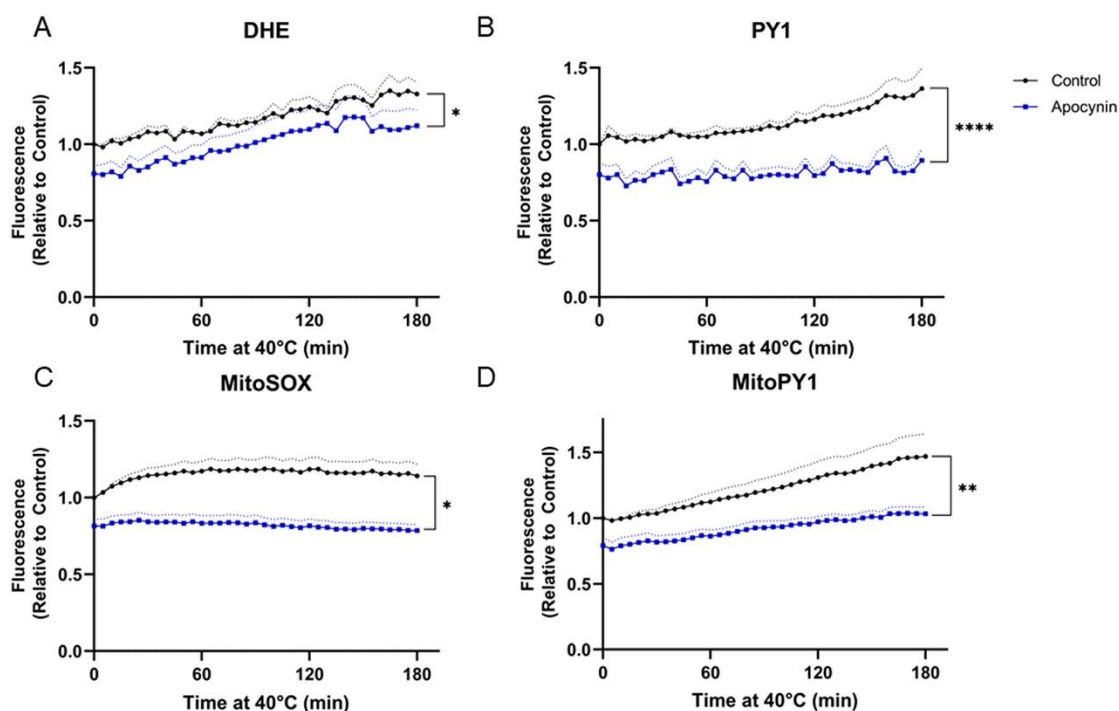


Figure 2.4 Apocynin scavenges cellular and mitochondrial ROS during mild heat shock at 40°C. Untreated cells (Control at 37°C) and cells pre-treated with apocynin (1 mM) for 30 min were exposed to mild heat shock at 40°C for different times up to 180 min. Measurements were collected using live cell imaging with a confocal microscope every 5min. Cellular superoxide (n = 4) (A), cellular peroxides (n = 4) (B), mitochondrial superoxide (n = 6) (C), and mitochondrial peroxides (n = 6) (D) were expressed as fluorescence relative to unheated controls. Data was expressed as means $\pm$ SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Asterisks denote a statistically significant group difference of the treatment condition from the control.

2.3.5 Transcription factor Nrf2 mediates ROS levels in a mitochondria-dependent manner during mild heat shock

Nrf2 is a critical part of the cellular antioxidant response (Belezzza et al., 2018; Averill-Bates, 2024). Therefore, it is expected to have a vital role in regulating ROS levels during mild heat shock. Moreover, Nrf2 expression increased gradually by 35% during mild heat shock at 40°C from 30 to 180 min (Fig. 2.5C, 2.5D).

Nrf2 has been shown to induce a protective effect on mitochondria in different cell lines (Strom et al., 2016; Goodfellow et al., 2020). It was suggested that, in intestinal epithelial cells, the antioxidant MitoQ exerted its protective effect through Nrf2 activation (Hu et al., 2018). To better comprehend the processes at work, it is paramount to elucidate how Nrf2 mediates ROS production during mild heat shock at 40°C.

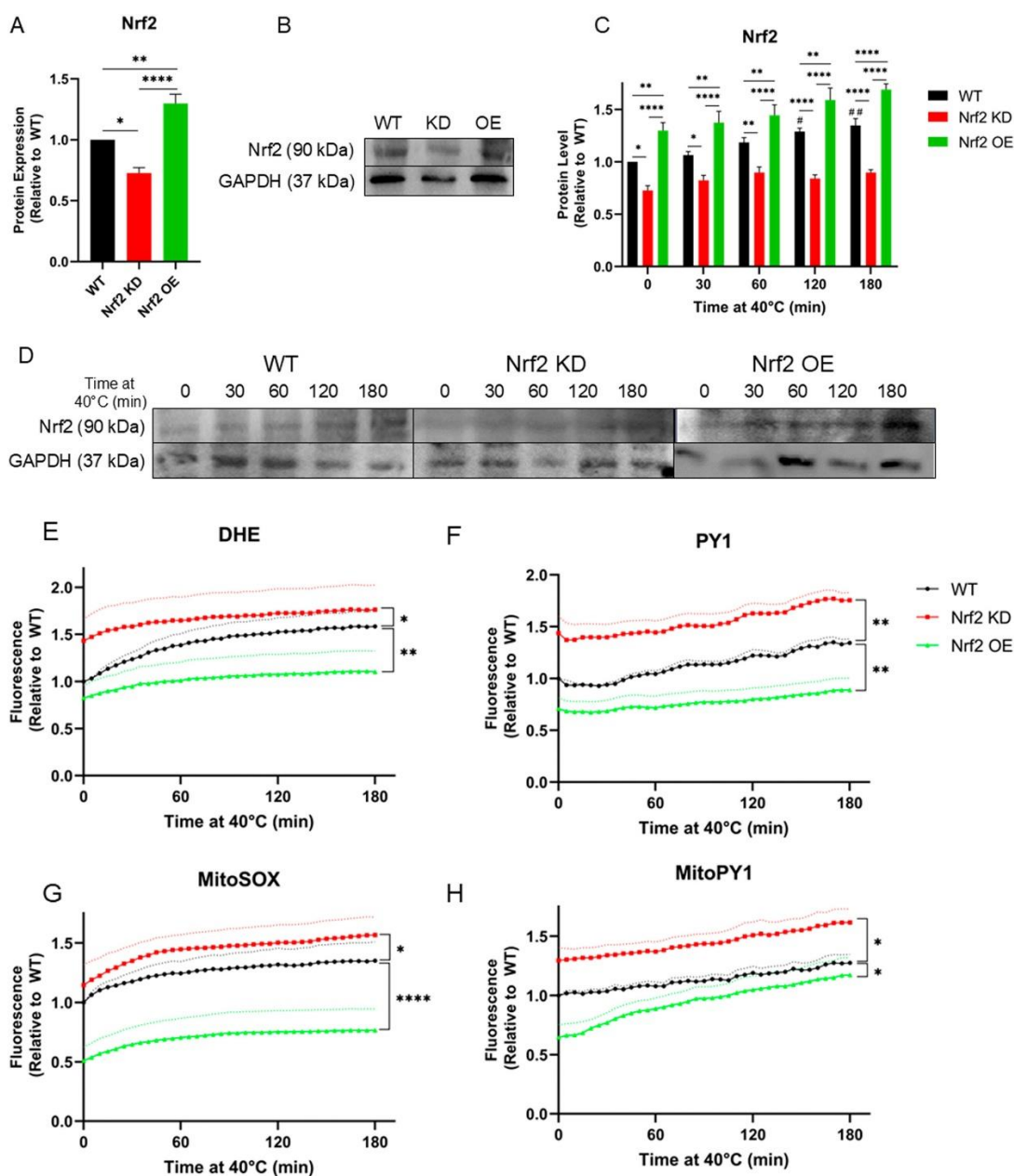


Figure 2.5 Nrf2 mediates cellular and mitochondrial ROS production during mild heat shock at 40°C. Nrf2 protein expression was determined via Western blotting in WT, Nrf2 Knockdown (Nrf2 KD), and Nrf2 overexpressor (Nrf2 OE) cells ($n = 12$) (A). A representative Western blot and its GAPDH loading control is shown (B). These three cell lines were exposed to mild heat stress at 40°C for different times up to 180 min, and Nrf2 levels were acquired via Western blotting ($n = 12$) (C) alongside representative gels and respective loading controls (D). Western blotting data was expressed relative to unheated controls (C). Fluorescence measurements for ROS levels in these three cell types were collected using live cell imaging with a confocal microscope every 5 min. Cellular superoxide ($n = 7$) (E), cellular peroxides ($n = 7$) (F), mitochondrial superoxide ($n = 6$) (G), and mitochondrial peroxides ($n = 6$) (H) were expressed as fluorescence relative to unheated WT controls. Data was expressed as means $\pm$ SEM. (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Pound symbols denote a statistically significant difference between the control and different time points. Asterisks denote a statistically significant group difference of the treatment condition from the control.

Consequently, we investigated Nrf2's function during mild heat shock at 40°C by using knockdown (Nrf2 KD) and overexpressor (Nrf2 OE) HeLa cell lines (Fig. 2.5A to 2.5D). In KD cells, Nrf2 expression decreased significantly by 27%, while expression increased by 30% in Nrf2 OE cells, compared to WT cells (Fig. 2.5A, 2.5B). We reported earlier that mRNA levels of Nrf2 targets catalase, manganese SOD, heme oxygenase 1, and gamma-cysteine ligase were downregulated significantly in Nrf2 KD cells, while they were all upregulated in Nrf2 OE cells (Grondin et al., 2024). When Nrf2 KD cells were heated at 40°C, there was a small increase in Nrf2 levels during 180 min (Fig. 2.5C). Nrf2 levels were significantly higher in OE cells and increased further during heat shock at 40°C, similar to the increase in WT cells (Fig. 2.5C).

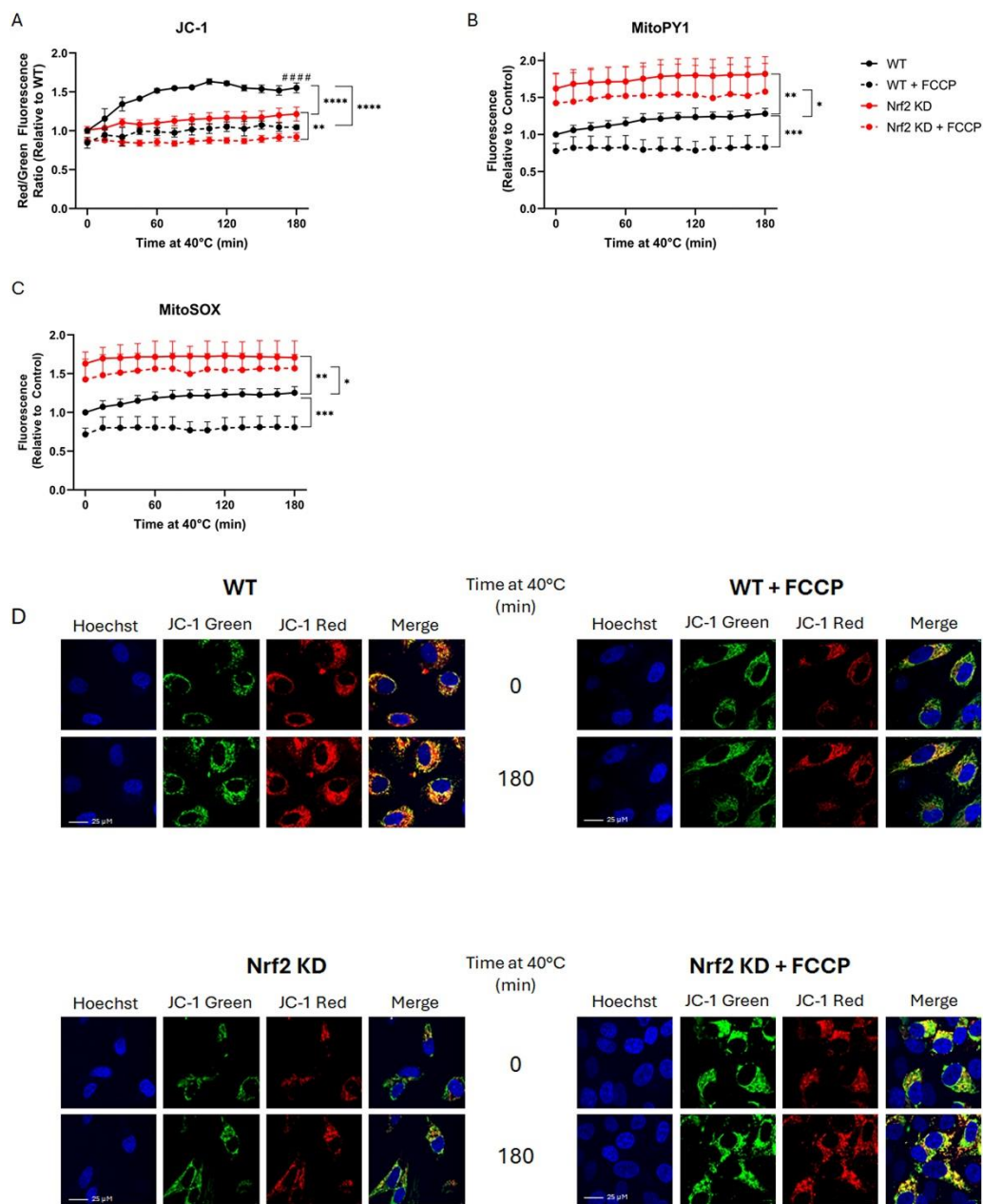
To determine the effect of altered Nrf2 levels on ROS production during mild heat shock at 40°C, WT, Nrf2 KD and Nrf2 OE cells were each heated at 40°C for up to 180 min. Then, cellular (Fig. 2.5E, 2.5F) and mitochondrial (Fig. 2.5G, 2.5H) ROS levels were monitored by live cell imaging. At $t = 0$, Nrf2 KD cells displayed significantly higher basal levels of cellular superoxide (+43%) (Fig. 2.5E) and peroxides (+44%) (Fig. 2.5F), relative to WT cells (Suppl. Fig. 2.S6A, 2.S6G). On the contrary, Nrf2 OE cells displayed significantly lower basal levels of cellular superoxide (-18%) (Fig. 2.5E) and peroxides (-29%) (Fig. 2.5F) (Suppl. Fig. 2.S6A, 2.S6I). During a 180 min heat shock at 40°C, these overall trends were maintained. After 180 min at 40°C, Nrf2 KD cells showed significant 17% higher levels of cellular superoxide than WT cells, while peroxide levels were 40% higher (Fig. 2.5E, 2.5F). In Nrf2 OE cells, cellular superoxide and peroxide levels increased slightly at 40°C but were significantly lower than in WT cells. These results indicate that Nrf2 directly mediates cellular ROS levels during mild heat shock at 40°C.

To determine how Nrf2 modulated cellular ROS during mild heat shock, we probed Nrf2's impact on mitochondria; these organelles were previously shown to significantly increase ROS production during mild heat shock at 40°C (Fig. 2.1C, 2.1D). WT, Nrf2 KD, and Nrf2 OE cells were exposed to 40°C for different times up to 180 min, and mitochondrial ROS levels were monitored by live cell imaging. Similar to results with cellular ROS, Nrf2 KD cells exhibited significantly higher basal levels of mitochondrial superoxide (+15%) (Fig. 2.5G) and peroxides (+30%) (Fig. 2.5H), relative to WT cells (Suppl. Fig. 2.S6B, 2.S6H). Nrf2 KD cells had higher levels of mitochondrial superoxide (+21%) and peroxides (+34%) after 180 min at 40°C, compared to WT cells. Nrf2 OE cells, on the other hand, had significantly lower basal levels of mitochondrial superoxide (-49%) (Fig. 2.5G) and peroxides (-35%) (Fig. 2.5H) (Suppl. Fig. 2.S6B, 2.S6J). These differences were maintained for mitochondrial superoxide during 180 min of mild heat shock,

although Nrf2 OE cells displayed a sharper increase in mitochondrial peroxides. These results suggest that Nrf2 may partially mediate cellular ROS levels through mechanisms that modulate ROS production at the mitochondrial level.

2.3.6 Mild heat shock at 40°C causes hyperpolarization of the mitochondrial membrane

Because it appears that mitochondria may contribute to the increase in ROS production at 40°C, we determined if mild heat shock at 40°C could alter mitochondrial membrane potential (MMP) by detecting fluorescence of the ratiometric probe JC-1. Indeed, significant hyperpolarization of the mitochondrial membrane potential occurred during 3 h at 40°C (Fig. 2.6A, 2.6D). This effect was abolished by the mitochondrial uncoupler of oxidative phosphorylation, FCCP. The level of hyperpolarization was much lower in Nrf2 KD cells and was also inhibited by FCCP (Fig. 2.6A, 2.6D). Further, the increases in levels of MitoSOX (Fig. 2.3B, 2.3E) and MitoPY1 (Fig. 2.6C, 2.6E) fluorescence at 40°C were inhibited significantly by FCCP. The higher levels of MitoSOX (Fig. 2.6B, 2.6E) and MitoPY1 (Fig. 2.6C, 2.6E) fluorescence in Nrf2 KD cells were also inhibited by FCCP. These results show that mild heat shock at 40°C causes mitochondrial membrane hyperpolarization that could lead to increased ROS levels.



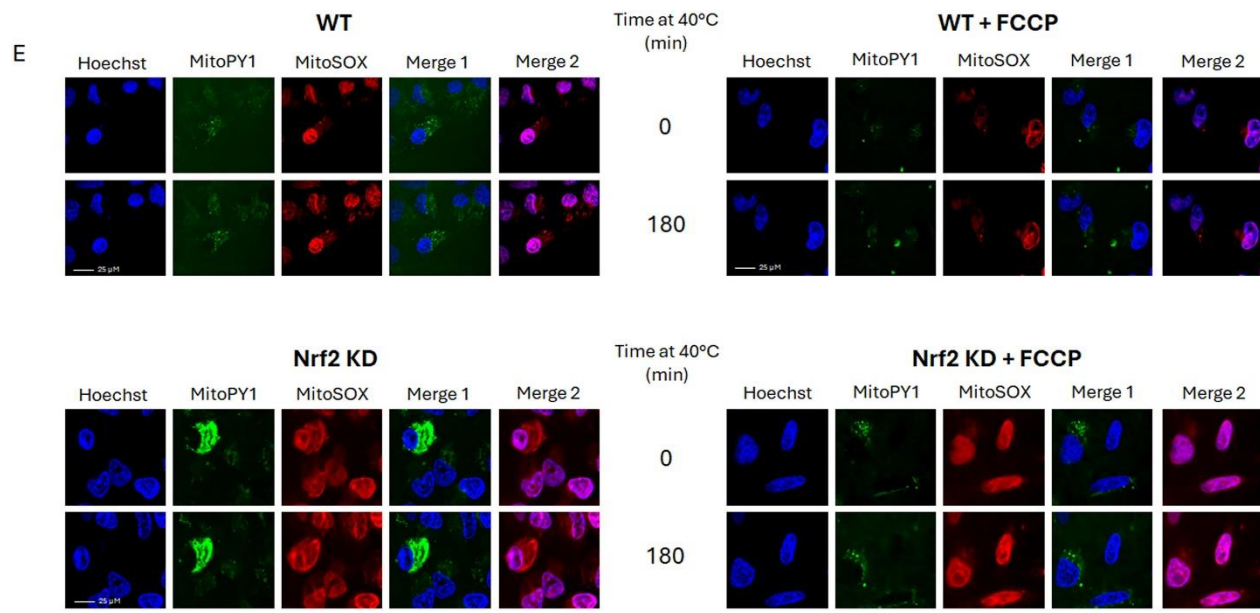


Figure 2.6 Hyperpolarization of mitochondrial membrane potential (MMP) occurred during mild heat shock at 40°C. MMP was evaluated during 180 min of heat shock at 40°C in WT and Nrf2 KD cells ($n = 3$) using the cationic carbocyanine dye JC-1, with or without treatment with FCCP (A). In healthy mitochondria, JC-1 accumulates as aggregates in mitochondrial membranes, resulting in red fluorescence. When mitochondrial membrane potential diminishes, JC-1 exists in the green, fluorescent monomeric form. Data was expressed as a Red/Green ratio relative to unheated WT cells. Representative images are shown for times 0 and 180 min. Scale bars are 25 μm (D). Levels of mitochondrial superoxide (B), and mitochondrial peroxides (C) in WT and Nrf2 KD cells were collected every 15 min during 180 min at 40°C, with or without FCCP, and expressed as fluorescence relative to unheated WT controls ($n = 3$). Representative images are shown for times 0 and 180 min (E). Data was expressed as means $\pm$ SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Asterisks denote a statistically significant group difference of the treatment factor from the control. Pound symbols denote a statistically significant difference between the control and different time points.

2.3.7 MitoQ and apocynin scavenge cellular and mitochondrial ROS in Nrf2 KD cells during mild heat shock at 40°C

Given that Nrf2 KD cells exhibited consistently higher production of superoxide and peroxides relative to WT cells (Fig. 2.5E to 2.5H), we next evaluated if MitoQ and apocynin could scavenge these excess ROS. Indeed, MitoQ significantly decreased the excess levels of both superoxide (Fig. 2.7A) and peroxides (Fig. 2.7B) in Nrf2 KD cells (Suppl. Fig. 2.S6A, 2.S6K). Moreover, pre-treatment of Nrf2 KD cells with MitoQ resulted in significant scavenging of the excess ROS at the mitochondrial level (Fig. 2.7C, 2.7D; Suppl. Fig. 2.S6B, 2.S6L). Mitochondrial superoxide levels in Nrf2 KD cells treated with MitoQ were significantly reduced to levels similar to those in WT cells after 180 min at 40°C (Fig. 2.7C). However, MitoQ significantly reduced mitochondrial peroxide levels in Nrf2 KD cells to lower levels than in WT cells (Fig. 2.7D).

In addition, pre-treatment with apocynin scavenged cellular and mitochondrial ROS in Nrf2 KD cells during mild heat shock (Fig. 2.8A-2.8D, Suppl. Fig. 2.S6A, 2.S6M; 2.S6B, 2.S6N). Cellular (Fig. 2.8A, 2.8B) and mitochondrial (Fig. 8C, 8D) ROS levels in Nrf2 KD cells pre-treated with apocynin were significantly reduced to levels similar to those in WT cells. These results indicate that the protective effects exerted by apocynin and MitoQ were potent enough to scavenge excess ROS levels caused by a weakened antioxidant response in Nrf2 KD cells (Fig. 2.7A-2.7D; 2.8A-2.8D).

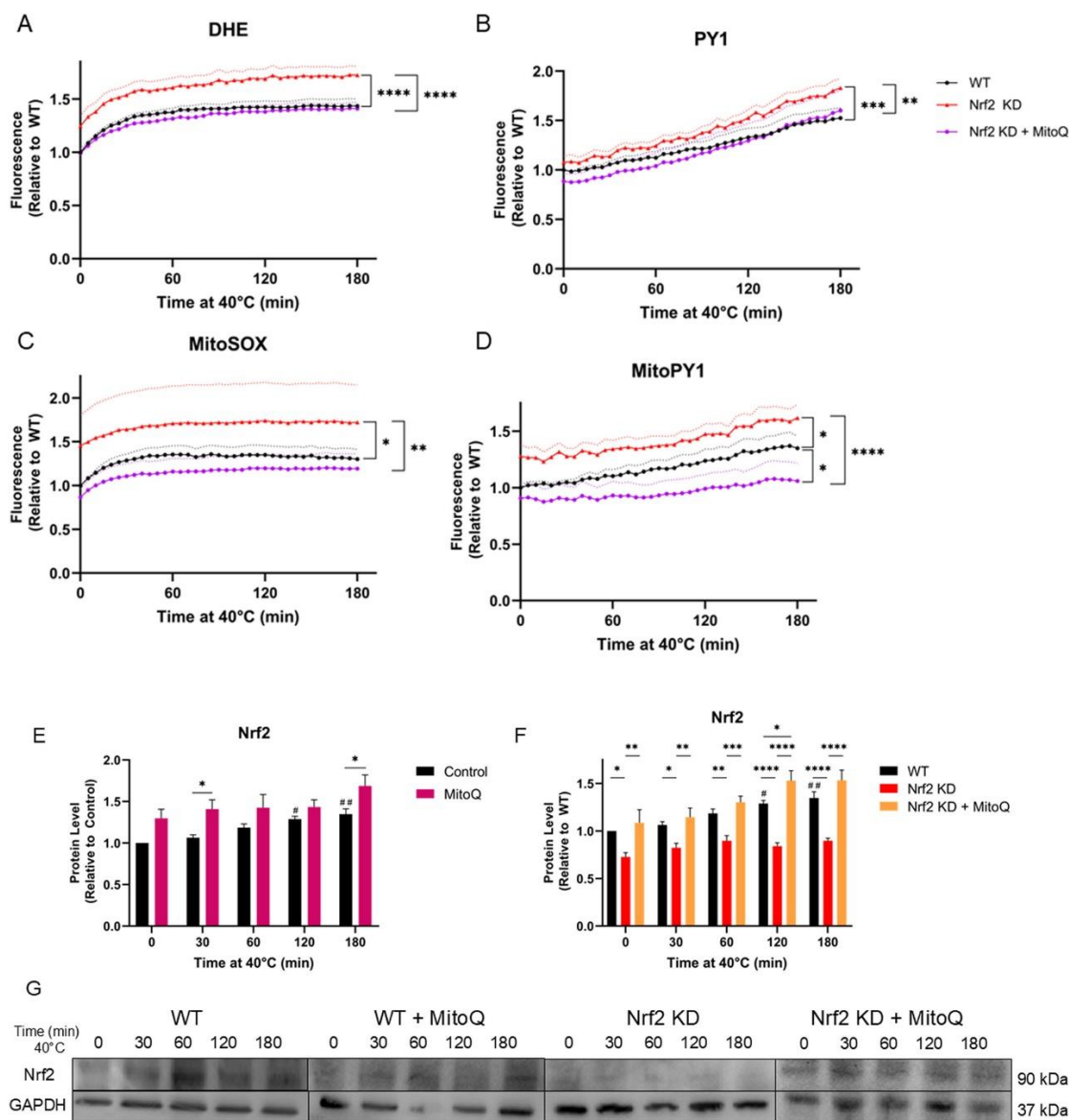


Figure 2.7 MitoQ scavenges cellular and mitochondrial ROS in Nrf2 KD cells during mild heat shock at 40°C. Control/WT, WT + MitoQ, Nrf2 Knockdown (Nrf2 KD), and Nrf2 KD cells treated with MitoQ (Nrf2 KD + MitoQ) were exposed to mild heat shock at 40°C for different times up to 180 min. Fluorescence measurements for cellular and

mitochondrial ROS were collected using live cell imaging with a confocal microscope every 5 min. Cellular superoxide (n = 7) (A), cellular peroxides (n = 7) (B), mitochondrial superoxide (n = 6) (C), and mitochondrial peroxides (n = 6) (D) were expressed as fluorescence relative to unheated WT controls. Nrf2 levels were acquired via Western blotting following MitoQ treatment of WT cells (n = 12) (E) and MitoQ treatment of Nrf2 KD cells (n = 12) (F). Nrf2 controls/WTs (in black) presented in this figure are the same data set in all histograms (control data is presented in Fig. 5, Fig. 7, and Fig. 8). Data has been separated into multiple graphs to improve clarity, and interpretation of the data. All 4 experimental conditions were carried out at the same time. Western Blotting data was expressed relative to unheated controls. Representative images alongside GAPDH loading controls were presented. Nrf2 and PGAM5 were detected on the same membrane (strip-reprobe). As such, levels of Nrf2 (Fig. 2.7G) and PGAM5 (shown in Fig. 2.10E) used the same loading control from the same membrane (G). Data was expressed as means $\pm$ SEM. (# p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001, ##### p < 0.00001; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). Pound symbols denote a statistically significant difference between the control and different time points. Asterisks denote a statistically significant group difference of the treatment condition from the control.

Treatment with MitoQ (Fig. 2.7E, 2.7G) significantly enhanced Nrf2 levels in WT cells, while apocynin (Fig. 2.8E, 2.8G) had no effect. In addition, Nrf2 levels in MitoQ-treated WT cells were 35% higher relative to non-antioxidant-treated cells after 180 min at 40°C. This agrees with previous literature showing that MitoQ exerted a protective effect against oxidative insult via Nrf2 activation (Hu *et al.*, 2018). Nrf2 KD cells had significantly lower Nrf2 levels (28-45%) relative to WT cells (Fig. 2.7F, 2.7G). Moreover, Nrf2 levels increased with time at 40°C in WT cells, but this did not occur in Nrf2 KD cells. However, treatment of Nrf2 KD cells with MitoQ (Fig. 2.7F, 2.7G) and apocynin (Fig. 2.8F, 2.8G) restored Nrf2 levels back to those of WT cells.

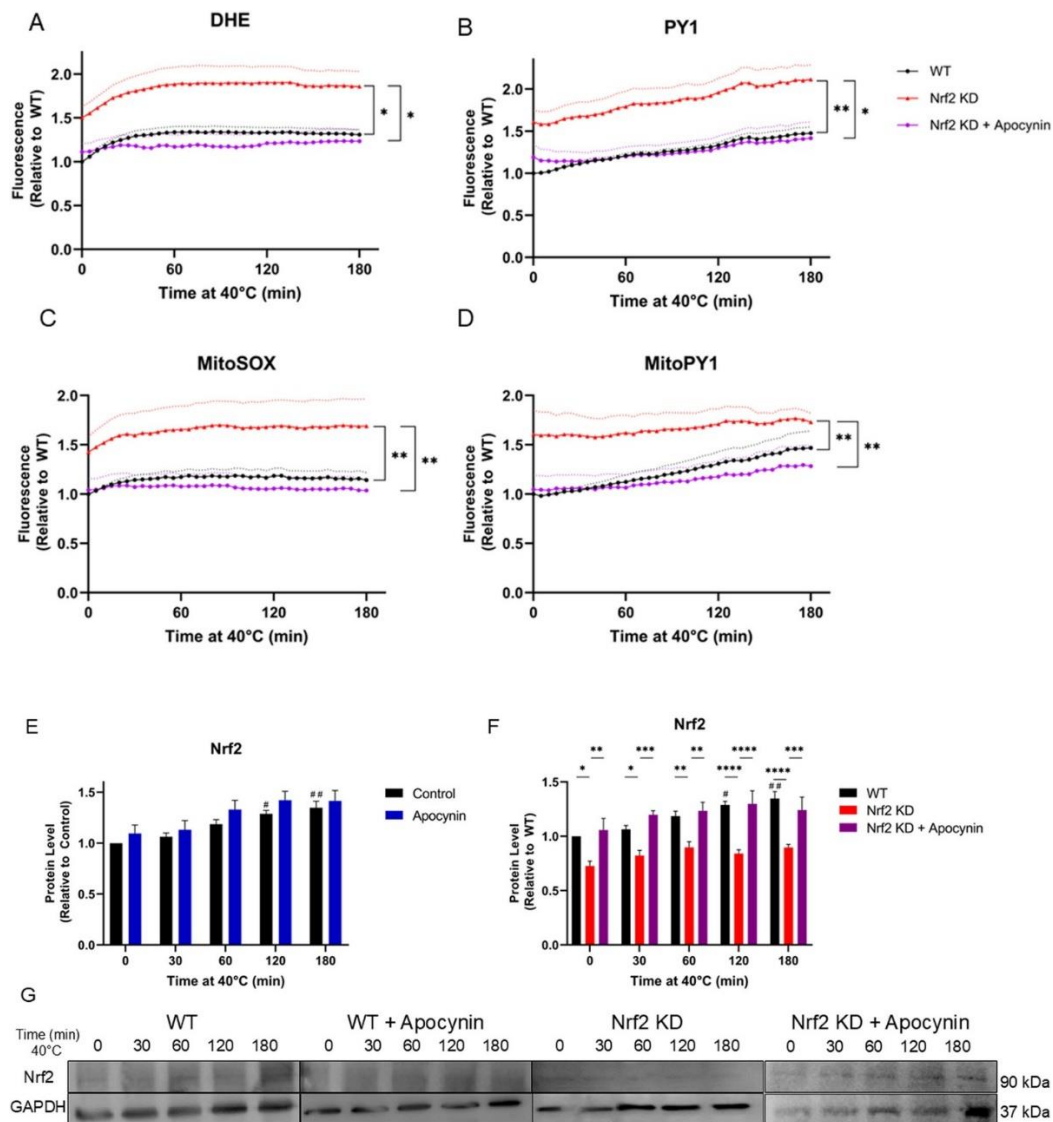


Figure 2.8 Apocynin scavenges cellular and mitochondrial ROS in Nrf2 KD cells during mild heat shock at 40°C. Control/WT, WT + apocynin, Nrf2 Knockdown (Nrf2 KD), and Nrf2 KD cells treated with apocynin (Nrf2 KD + Apocynin) were exposed to mild heat shock at 40°C for different times up to 180 min. Fluorescence measurements for cellular and mitochondrial ROS were collected using live cell imaging with a confocal microscope every 5 min. Cellular superoxide (n = 7) (A), cellular peroxides (n = 7) (B), mitochondrial superoxide (n = 6) (C), and mitochondrial peroxides (n = 6) (D) were expressed as fluorescence relative to unheated WT controls. Nrf2 levels were acquired via Western Blotting following apocynin treatment of WT cells (n = 12) (E) and apocynin treatment of Nrf2 KD cells (n = 12) (F). Nrf2 controls/WTs (in black) presented in this figure are the same data set in all histograms (control data is presented in Fig. 2.5, Fig. 2.7, and Fig. 2.8). Data has been separated into multiple graphs to improve clarity, and interpretation of the data. All 4 experimental conditions were carried out at the same time. Western blotting data was expressed relative to unheated controls. Representative images alongside loading controls were presented (G). Data was expressed as means $\pm$ SEM. (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Pound symbols denote a statistically significant difference between the control and different time points. Asterisks denote a statistically significant group difference of the treatment condition from the control.

2.3.8 Apocynin, MitoQ, and/or modulation of Nrf2 levels significantly impact protein levels of Nrf1 and DJ-1 during mild heat shock at 40°C

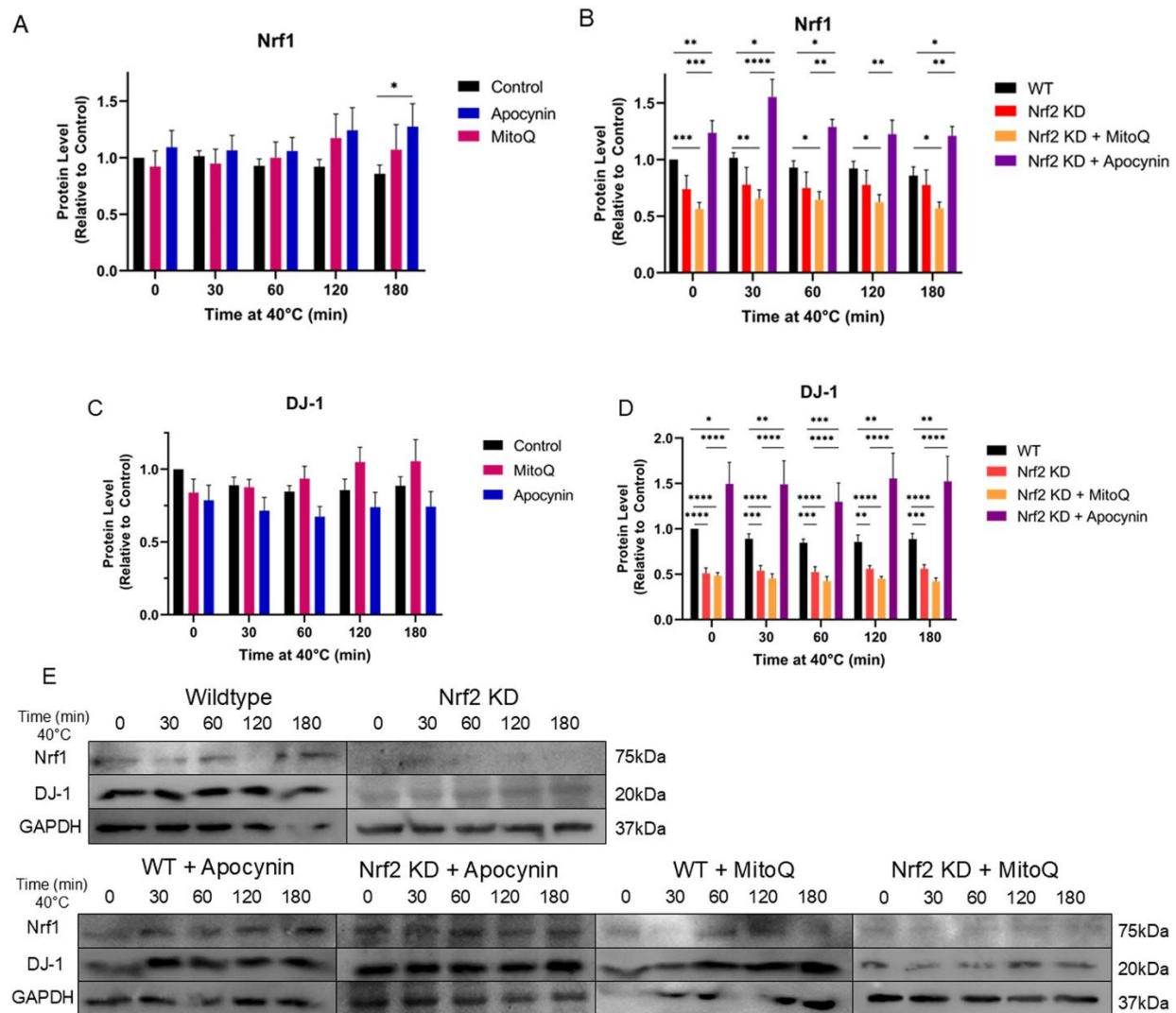


Figure 2.9 Treatment with Apocynin, MitoQ, or modulation of Nrf2 levels significantly impact protein levels of Nrf1 and DJ-1 during mild heat shock at 40°C. Control/WT cells were treated with or without apocynin or MitoQ (A, C). Nrf2 Knockdown (Nrf2 KD) cells were treated with or without apocynin (Nrf2 KD + Apocynin) or MitoQ (Nrf2 KD + MitoQ) (B, D). Then, all cells were exposed to mild heat shock at 40°C for different times up to 180 min. Levels of Nrf1 were acquired via Western blotting in WT cells treated with MitoQ or apocynin (n = 12) (A), and in Nrf2 Knockdown cells (Nrf2 KD) treated with MitoQ (Nrf2 KD + MitoQ) or apocynin (Nrf2 KD + Apocynin) (n = 12) (B). Levels of DJ-1 were acquired in WT cells treated with MitoQ or apocynin (n = 12) (C), and in Nrf2 Knockdown cells treated with MitoQ (Nrf2 KD + MitoQ) or apocynin (Nrf2 KD + Apocynin) (n = 12) (D). Nrf1/DJ-1 controls/WTs (in black) presented in this figure are the same data set in all histograms. Data has been separated into multiple graphs to improve clarity, and interpretation of the data. All 6 experimental conditions were carried out at the same time. Representative images are presented with their respective GAPDH loading controls. Nrf1 and DJ-1 were detected on the same membrane (strip-reprobe). As such, levels of Nrf1 and DJ-1 used the same loading control from the same membrane

(E). Western blotting data was expressed relative to unheated controls. Data was expressed as means $\pm$ SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.) Asterisks denote a statistically significant group difference of the treatment condition from the control.

Nrf1 is a proxy for metabolic activity and is regulated by the ARE (Piantadosi *et al.*, 2008), while DJ-1 is, among other antioxidant functions, a positive regulator of Nrf2 (Milani *et al.*, 2013). Protein levels of Nrf1 and DJ-1 were ascertained in cells during mild heat shock at 40°C (Fig. 2.9). There was a tendency for a gradual decrease in Nrf1 levels during 180 min at 40°C, with respect to the unheated control (Fig. 2.9A, 2.9E). Antioxidant treatment with MitoQ had little impact on Nrf1 levels (Fig. 2.9A, 2.9E). However, Nrf1 levels increased significantly in cells treated with apocynin after 120 and 180 min of mild heat shock (Fig. 2.9A, 2.9E). Nrf1 levels were 41% higher in apocynin-treated cells versus control cells after 180 min at 40°C (Fig. 2.9A).

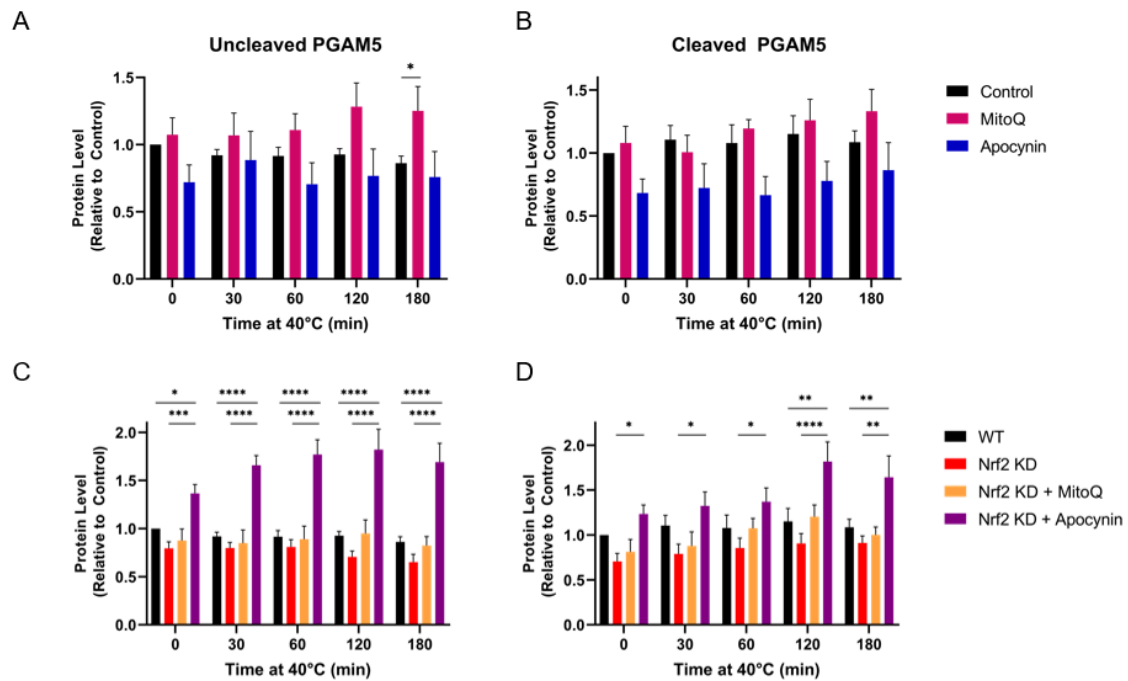
When Nrf2 was knocked down, there was a tendency for a decrease in Nrf1 levels, compared to WT cells (Fig. 2.9B, 2.9E). However, MitoQ treatment significantly decreased Nrf1 levels further in Nrf2 KD cells during heat shock at 40°C. Nrf1 levels were 28% lower than the WT after 180 min at 40°C (Fig. 2.9B). In Nrf2 KD cells, apocynin treatment caused a significant increase in Nrf1 levels, which were 30-55% higher than WT cells throughout the 180 min heat shock treatment (Fig. 2.9B, 2.9E).

DJ-1 positively regulates Nrf2 by interfering with its ubiquitination and preventing degradation (Milani *et al.*, 2013). Therefore, determining levels of this essential protein may help clarify how Nrf2 itself is activated in response to heat stress. In WT cells, there was a tendency for a small decrease in DJ-1 levels during a 180 min heat shock at 40°C (Fig. 2.9C, 2.9E). Given that DJ-1 is not upregulated at 40°C, it appears that activation of Nrf2 during heat shock at 40°C (Fig. 2.5A) may be independent of DJ-1 activity. MitoQ treatment did not affect DJ-1 levels during mild heat shock at 40°C (Fig. 2.9C, 2.9E), whereas there was a tendency towards a decrease in DJ-1 levels in apocynin-treated cells (Fig. 2.9C, 2.9E).

Levels of DJ-1 were significantly reduced by 49% in Nrf2 KD cells, compared to WT cells (Fig. 2.9D, 2.9E). DJ-1 levels in these cells did not vary throughout the 180 min heat treatment at 40°C (Fig. 2.9D, 2.9E). Surprisingly, apocynin treatment tripled levels of DJ-1 in Nrf2 KD cells, relative to untreated Nrf2 KD cells, during mild heat shock (Fig. 2.9D, 2.9E). However, treatment with MitoQ did not alter DJ-1 levels (Fig. 2.9D, 2.9E). Our data suggests that a) there are small metabolic changes during mild heat stress, and b) that Nrf2 has no significant impact in modulating these changes. Furthermore, our data shows that activation of

Nrf2 may be independent of DJ-1 activity during mild heat shock at 40°C. However, rescue of Nrf2 levels in Nrf2 KD cells with apocynin pre-treatment (Fig. 2.8F, 2.8G) may be linked to increased DJ-1 activity upstream of Nrf2, while Nrf2 rescue with MitoQ (Fig. 2.7F, 2.7G) seems to be independent of DJ-1 cell signaling.

2.3.9 MitoQ, Apocynin, and/or modulation of Nrf2 levels impact protein levels of PGAM5 during mild heat shock at 40°C



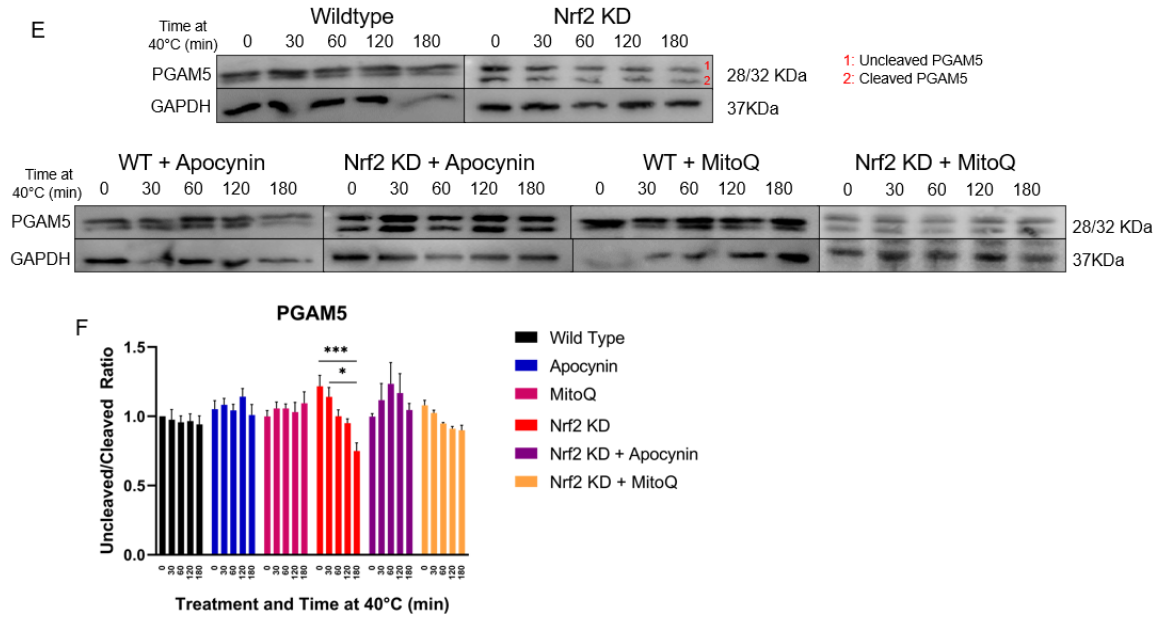


Figure 2.10 Treatment with Apocynin, MitoQ, or modulation of Nrf2 levels significantly impact protein levels of uncleaved and cleaved PGAM5 during mild heat shock at 40°C. Levels of uncleaved PGAM5 (n = 12) (A) and cleaved PGAM5 (n = 12) (B) were acquired in WT cells treated with MitoQ or apocynin via Western blotting. Levels of uncleaved PGAM5 (n = 12) (C) and cleaved PGAM5 (n = 12) (D) were acquired in Nrf2 Knockdown cells (Nrf2 KD) treated with MitoQ (Nrf2 KD + MitoQ) or apocynin (Nrf2 KD + Apocynin) (n = 12). Western blotting data was expressed relative to unheated controls. Uncleaved and cleaved PGAM5 controls/WTs (in black) presented in this figure are the same data set in all histograms. Data has been separated into multiple graphs to improve clarity, and interpretation of the data. All experimental conditions were carried out at the same time. Representative images are presented with their respective loading controls. PGAM5 and Nrf2 were detected on the same membrane (strip-reprobe). As such, levels of PGAM5 (Fig. 10E) and Nrf2 (shown in Fig. 7G) and used the same loading control from the same membrane (E). A ratio of uncleaved to cleaved PGAM5 was established to show the proportional change in levels of both forms of PGAM5 over time (n = 12) (F). Data was expressed as means $\pm$ SEM. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.) Asterisks denote a statistically significant group difference of the treatment condition from the control.

PGAM5 is a multifunctional protein in stress responses. It tethers the Nrf2/Keap1 heterodimer in a redox sensitive fashion to mitochondria (Lo & Hannink, 2008; Zeb et al., 2021), and it can initiate pro/anti-apoptotic responses depending on the severity of the stress (Cheng et al., 2021). Thus, monitoring PGAM5 levels during mild heat shock at 40°C is pertinent to understanding the initiation of cellular adaptive survival mechanisms.

Overall, there was a tendency for levels of uncleaved PGAM5 to decrease during 180 min at 40°C (Fig. 2.10A, 2.10E), while levels of cleaved PGAM5 trended towards an increase (Fig. 2.10B, 2.10E). Treatment with MitoQ significantly increased levels of uncleaved PGAM5 by 40% relative to the control after a 180 min heat shock (Fig. 2.10A, 2.10E), whereas cleaved PGAM5 levels were unaffected (Fig. 2.10B, 2.10E).

Apocynin treatment significantly reduced levels of uncleaved (5-30%) (Fig. 2.10A, 2.10E) and cleaved PGAM5 (20-40%) (Fig. 2.10B, 2.10E). However, we were only able to ascertain a general significant decrease for the curve, with no specific timepoint.

In Nrf2 KD cells, there was a tendency towards reduced levels of both uncleaved (Fig. 2.10C, 2.10E) and cleaved PGAM5 (Fig. 2.10D, 2.10E), relative to WT cells at all time points at 40°C. Treatment with MitoQ caused a small, but significant increase in both uncleaved (Fig. 2.10C, 2.10E) and cleaved PGAM5 (Fig. 2.10D, 2.10E) in Nrf2 KD cells, compared to untreated Nrf2 KD cells. However, treatment of Nrf2 KD cells with apocynin caused a large, significant increase in uncleaved PGAM5 to levels that were 35-90% higher than those in WT cells, and 50-110% higher than in untreated Nrf2 KD cells (Fig. 2.10C, 2.10E). There was a similar, significant increase in levels of cleaved PGAM5 in Nrf2 KD cells upon apocynin treatment (Fig. 2.10D, 2.10E). Cleaved PGAM5 levels were 25-65% higher in apocynin-treated Nrf2 KD cells relative to WT cells, and 55-110% higher relative to untreated Nrf2 KD cells. Finally, an uncleaved/cleaved ratio of PGAM5 was established for all experimental conditions (Fig 2.10F). Only Nrf2 KD cells had a significant change of ratio after exposure to mild heat shock at 40°C. However, the change of ratio was dissipated by treatment with either apocynin or MitoQ. Overall, it seems that Nrf2 has a significant impact on PGAM5 levels, and that reduced levels of Nrf2 could lead to a decrease in PGAM5 levels during mild heat stress at 40°C. This, in turn, could reduce the anti-apoptotic activity of PGAM5 and render cells more susceptible to accumulation of oxidative insult. Moreover, rescue of Nrf2 in Nrf2 KD cells via apocynin treatment caused a spike in PGAM5 levels, while rescue of Nrf2 via MitoQ treatment caused no change. This indicates that both mitochondrial ROS and a functional Nrf2 pathway may need to coexist to activate PGAM5.

2.4 Discussion

During the acquisition of an adaptive survival response during mild heat shock at 40°C, cellular and mitochondrial levels of superoxide and peroxides increased. Further, Nrf2 mediated levels of cellular and mitochondrial ROS at 40°C. ROS levels were lower when Nrf2 was overexpressed, while they were higher in cells with suppression of Nrf2. Nrf2 activation during mild heat shock seems to be independent of its positive regulator, DJ-1. Moreover, apocynin and MitoQ were able to scavenge the elevated cellular and mitochondrial ROS levels in Nrf2 knockdown cells through their respective inhibition of NOX-derived and mitochondria-derived ROS. Furthermore, the activation of cellular defense mechanisms at 40°C seemed to require a two-factor signaling pathway involving Nrf2 and mitochondrial ROS. These defenses may be mediated by cellular levels of the antioxidant protein DJ-1, and by PGAM5, Nrf2's physical tether to

mitochondria. DJ-1 and PGAM5 are both inhibited by knocking down Nrf2 and seem to be restored by addition of apocynin in Nrf2 KD cells. MitoQ treatment did not restore levels of DJ-1 and PGAM5 in Nrf2 KD cells. However, both apocynin and MitoQ restored Nrf2 levels in these cells to those of WT cells. The activation of cellular defenses during mild heat shock at 40°C is putatively unaccompanied by increased metabolic output, as noted by stable levels of Nrf1. Metabolic output appears to be intimately linked with the cellular redox environment, because Nrf2 KD cells had notably lower levels of Nrf1, while treatment of these cells with apocynin significantly enhanced Nrf1 levels. Of particular interest in the novelty of this study is the identification of mitochondria and NOXs as probable sources of ROS, which could be responsible for the acquisition of an adaptive survival response during mild heat shock at 40°C, also known as thermotolerance. It should be noted that ROS were produced in cells at 40°C under non-toxic conditions.

2.4.1 Heat shock at 40°C causes an increase in ROS production

Cellular levels of superoxide and peroxides increased during mild heat shock at 40°C. ROS levels increased after short times of 5 min. PEG-SOD and PEG-catalase both inhibited DHE and PY1 fluorescence, respectively. This indicated that the increases in DHE and PY1 fluorescence at 40°C were due to the accumulation of pro-oxidants, superoxide and peroxides, respectively. The lack of inhibition of mitochondrial fluorescent probes with antioxidant treatment is likely due to the inability of PEG-catalase and PEG-SOD to penetrate the mitochondria. If that is the case, then the selectivity of MitoSOX and MitoPY1 towards mitochondrial ROS seems to be corroborated. The production of ROS during mild heat shock can be attributed to different cellular sources. From xanthine oxidase to NOXs to mitochondria, there are 41 known sources of ROS to date in mammalian cells (Mailloux, 2020; Sies & Jones, 2020). However, we chose to investigate the contribution of a select few sources, in particular, NOXs and mitochondria. Specifically, mitochondria are thought to produce up to 90% of cellular ROS under basal conditions via electron leak (Gardiner et al., 2020; Skulachev, 2012). Therefore, investigating the contribution of this organelle to the increased production of ROS at 40°C is critical. Our results confirmed the contribution of mitochondria towards elevated ROS production during mild heat shock, because treatment with a mitochondria-targeted antioxidant MitoQ significantly reduced levels of both mitochondrial and cellular ROS.

Many other stresses can increase cellular production of ROS. A high, pro-apoptotic dose (240 μ M) of the environmental pollutant, copper, increased the production of mitochondrial ROS, detected using MitoSOX, in human granulosa cells (Lin et al., 2024). This dose of copper decreased catalase activity and the reduced glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) ratio, while SOD activity increased. Myocardial ischemia-reperfusion injury involves increased ROS production, particularly at the reperfusion stage (Cadenas, 2018). The NOX enzymes and the mitochondrial respiratory chain are considered to be the major sources of ROS in cardiomyocytes. The combined effects of increased ROS and elevated Ca^{2+} can lead to opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), which can cause irreversible reperfusion damage to the heart.

There is emerging evidence that the membrane protein family of NOXs may be more important than previously thought in its contributions to overall cellular ROS production. Specifically, NOX proteins seem to play a role in regulation of vascular pressure, cell growth, apoptosis, fertilization and angiogenesis through production of ROS (Vermot et al., 2021). NOXs are also activated in response to a host of chemical, physical, and biological stresses (Jiang et al., 2011). There are 7 known NOX isoenzymes (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, Duox1, Duox2), although in HeLa cells, the primary isoenzymes present are NOX1, NOX2, and NOX4 (Muthuramalingam et al., 2020). NOX5 may be present as well, with minimal activity. NOXs are localized at different cellular membranes, including the plasma membrane, and those of mitochondria, the endoplasmic reticulum, and nucleus. The role of NOX proteins as a source of ROS production during mild heat shock at 40°C was investigated by inhibiting them with apocynin. This inhibition led to a marked decrease in cellular ROS levels. Interestingly, apocynin was also effective in reducing levels of mitochondrial ROS. This could be explained by the localisation of NOXs to the mitochondrial membrane (Brock et al., 2009; Kuroda et al., 2010). However, the evidence is divided as to the impact of apocynin on mitochondrial function. Some studies believe its impact to be indirect and upstream of mitochondria by inhibition of NOX assembly at the plasma membrane (Dang et al., 2016), while others hypothesized a more direct mechanism of action that targets mitochondria by strengthening antioxidant activity via stimulation of glutathione synthesis (Kumari et al., 2016). Specifically, apocynin has been shown to increase glutathione levels in alveolar epithelial cells by increasing gamma-cysteine ligase synthesis through activation of the transcription factor activator protein-1 (AP-1) (Ben-Shaul et al., 2001). In our study, the increase in Nrf1 levels with apocynin treatment, coupled with a decrease in mitochondrial ROS, appear to provide evidence towards an indirect effect on mitochondria, because ROS production increases with metabolism (OXPHOS activity) (Checa & Aran, 2020). Overall, treatments with MitoQ and

apocynin implicate both NOX, and mitochondria as sources of ROS production induced by mild heat stress at 40°C.

2.4.2 Transcription factor Nrf2 mediates ROS production during mild heat stress at 40°C

Pro-oxidant accumulation is putatively responsible for activation of the transcription factor Nrf2. Nrf2 activation is sensitive to oxidative stress (Ngo & Duennwald, 2022), although it can be activated by other stresses like heat (Glory & Averill-Bates, 2016), heavy metals (Emami et al., 2022), radiation (Xu et al., 2023), and pathogens (Deramaudt et al., 2013). This study shows that mild heat shock at 40°C increased levels of Nrf2 in HeLa cells, in agreement with earlier work (Glory & Averill-Bates, 2016). Our results provide evidence that protein levels of Nrf2 are directly correlated with ROS levels, because overexpression of Nrf2 resulted in decreased ROS levels, while knocking down this vital regulator yielded significantly higher ROS levels. Importantly, modulation of Nrf2 protein expression also had a similar impact on mitochondrial ROS levels, further suggesting that mitochondria were one of the main sources of cellular ROS at 40°C. Overexpression of Nrf2 mimicked the ROS-quenching effect of MitoQ and apocynin treatment. We may surmise, therefore, that Nrf2 potentially scavenges ROS production by acting upon both mitochondria and NOXs. These results are supported by previous studies highlighting Nrf2's impact on these two sources of ROS (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015; Kovac et al., 2015). It was reported that Nrf2 counteracted mitochondrial ROS production by upregulating the uncoupling protein UCP3, and by influencing mitochondrial biogenesis through upregulation of Nrf1 (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015). Moreover, Nrf2 activation protected against loss of mitochondrial membrane potential in response to hydrogen peroxide and maintained mitochondrial respiration in mouse embryonic fibroblasts (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015). Furthermore, Nrf2 knockout in brain hippocampal glia-neuronal cultures resulted in pronounced upregulation of NOX2, while constitutive activation of Nrf2 (Keap1-KD cells) in these same cultures resulted in upregulation of NOX4, together with parallel increases in ROS production (Kovac et al., 2015). Considering that Nrf2 seems to mediate NOX-derived ROS in our study, it is possible that these ROS are produced mostly by NOX2, and to a lesser extent, NOX4.

2.4.3 Treatment of Nrf2 KD cells with apocynin and MitoQ scavenges ROS

Nrf2 KD cells were treated with apocynin or MitoQ to determine if the increase in ROS caused by deficiency of the Nrf2 antioxidant pathway was associated with mitochondria and/or NOXs. MitoQ and apocynin both

reduced levels of cellular and mitochondrial ROS to WT cell levels. This suggests that the increased quantity of ROS may be associated with these two sources. However, treatment with MitoQ and apocynin also caused a marked increase in Nrf2 levels in Nrf2 KD cells. This is in line with apocynin's potential stimulatory effect on Nrf2 (Cruz-Alvarez et al., 2017). The mechanisms by which this occurs are unclear and warrant further investigation. However, it was proposed that activation of Nrf2 through apocynin treatment seems to occur by enhancing its dissociation from Keap1 by causing phosphorylation of Nrf2 (Zhang et al., 2023). MitoQ has also been shown to have a stimulatory effect on the Nrf2 pathway (Hou et al., 2021). It has been reported that enhancement of Nrf2 activity by MitoQ may be attributed to downregulation of Keap1 in aortic cells (Cui et al., 2020). Therefore, it is difficult to establish if the ROS scavenging caused by treatment with MitoQ or apocynin is due to direct scavenging, an enhancement of Nrf2 levels, or a combination of both. Whatever the case, Nrf2 has a significant impact on ROS levels that is mediated by mitochondria and NOXs.

2.4.4 DJ-1 and PGAM5 activity is Nrf2- and ROS-dependent during mild heat stress

DJ-1 is a redox-sensitive positive upstream regulator of Nrf2 (Wang et al., 2020). PGAM5 forms a ternary complex with Keap1 and Nrf2 that is bound to the mitochondrial membrane and acts as a mitochondrial redox sensor (Lo & Hannink, 2008; Zeb et al., 2021). Considering their direct link to the Nrf2 pathway, levels of DJ-1 and PGAM5 were evaluated during mild heat shock at 40°C. The inhibition of NOX-derived ROS with apocynin led to significant reduction in levels of DJ-1 and PGAM5. This is in accord with reduced overall cellular stress, because both DJ-1 and PGAM5 are redox-sensitive (Ganzleben et al., 2019; Dash et al., 2021). Moreover, because DJ-1 is also activated in response to DNA damage, reduction in its levels may be indicative of preserved DNA integrity associated with decreased accumulation of ROS (Wang et al., 2023). However, treatment with apocynin did not increase or decrease Nrf2 levels in WT cells. As such, activation of Nrf2 during mild heat stress at 40°C may be DJ-1-independent. However, since apocynin may enhance activation of the Nrf2 pathway, we have not been able to fully clarify the effect of DJ-1 on Nrf2.

Treatment with MitoQ did not lower levels of DJ-1 and PGAM5. In fact, MitoQ seemed to enhance levels of uncleaved PGAM5. These results are not in agreement with a previous report, where MitoQ treatment in female granulosa cells reduced levels of both PGAM5 and Nrf2 under conditions of oxidative stress induced by H₂O₂ treatment (Tsui & Li, 2023). This difference may be explained by the different cell lines and/or stress inducers. Our data shows that MitoQ has a stimulatory effect on Nrf2 levels in HeLa cells,

which is consistent with other studies. MitoQ treatment caused upregulation of the Nrf2 pathway, specifically by downregulating Keap1, thus promoting Nrf2 translocation to the nucleus (Hu et al., 2018; Zhou et al., 2018). In our study, both DJ-1 and PGAM5 were downregulated in Nrf2 KD cells, suggesting that Nrf2 may positively regulate their expression. Thus, stimulation of Nrf2 through MitoQ treatment may enhance DJ-1 and PGAM5 levels indirectly. Considering the variable findings in the literature, further investigation of MitoQ's effect on these proteins is warranted.

Interestingly, our results showed that hyperpolarization of MMP occurred during mild heat stress of 40°C. However, depolarization of MMP is a known mechanism by which PGAM5 becomes cleaved (Cheng et al., 2021). During mild heat stress, it appears that cleavage of PGAM5 is not explained by loss of MMP.

2.4.5 Acquisition of cellular defenses during mild heat stress at 40°C requires mitochondrial ROS and a functional Nrf2 pathway

Our previous work reported that the adaptive cell survival response induced by mild heat stress at 40°C upregulates a host of defense systems in HeLa cells. These include heat shock proteins 27, 32, 72, 90 and 110 (Bettaieb & Averill-Bates, 2008), and antioxidants like catalase, manganese SOD and gamma-cysteine ligase (Pallepati & Averill-Bates, 2010). Further, autophagy appeared to be crucial in the adaptive cell survival response induced at 40°C because its activation contributed significantly to improved cell survival during subsequent lethal heat shock at 43°C (Kassis et al., 2021). Nrf2 levels, phosphorylation and translocation to the nucleus increased during mild heat shock at 40°C (Glory & Averill-Bates, 2016). In addition, mild heat shock upregulated mRNA levels of Nrf2 gene targets like catalase, manganese SOD, heme oxygenase 1, and gamma-cysteine ligase. Considering the upregulation of Nrf2 during mild heat stress at 40°C, our study adds to these findings by providing evidence to surmise that ROS derived from mitochondria and NOXs were specifically necessary to increase levels of certain cellular defenses alongside Nrf2.

Both DJ-1 and PGAM5, vital cellular defense proteins, were downregulated in Nrf2 KD cells. This may be due to a decrease in one of their available targets, notably Nrf2. Other important targets for DJ-1, related to cell survival and proliferation, include extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2), phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT, apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1), and p53-related pathways (Neves et al., 2022). Other PGAM5-related targets include pathways related to mitochondrial

dynamics via dynamin-related protein (Drp1), mitochondrial Rho GTPase 2 (Miro2), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 α), TFAM, and Nrf1 (Cheng et al., 2021). PGAM5 also plays a role in mitophagy via PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/Parkin, FUN14 domain containing 1 (FUNDC1), and prohibitin-2 (PHB2) (Cheng et al., 2021), as well as programmed cell death via Keap1/Nrf2, Bcl-xL, Drp1, Bax, and the receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1)/RIPK3/mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL) complex (Cheng et al., 2021). It may also be possible that Nrf2 sustains the activity of DJ-1 and PGAM5. It was reported that PGAM5 may repress antioxidant activity and promote apoptosis by sequestration of Nrf2 to mitochondria (Lo & Hannick, 2008), while DJ-1 is an upstream activator of Nrf2 (Wang et al., 2020). Considering the established communication between them, it is also feasible that Nrf2 may influence levels of these proteins. Nrf2 KD cells had significantly lower levels of DJ-1, and PGAM5, which seems to confirm this. Treatment of Nrf2 KD cells with apocynin resulted in marked scavenging of cellular and mitochondrial ROS, but also a pronounced increase in Nrf1, Nrf2, DJ-1, and PGAM5 levels. While the mechanisms by which these proteins are increased by apocynin in Nrf2 KD cells are unclear, the ROS scavenging observed may be linked to increases in the cellular antioxidant system driven by Nrf2, DJ-1, and PGAM5.

Increases in Nrf1, indicative of metabolic activity by modulation of mitochondrial respiration (Scarpulla, 2008), may be the downstream result of a cellular environment with notably lower pro-oxidants, because increased ROS in Nrf2 KD cells resulted in lower levels of Nrf1. Furthermore, there may be a combination effect in which Nrf2 KD cells treated with apocynin possess higher ROS levels coupled with rescued levels of Nrf2 to induce the overactivation of DJ-1/PGAM5 in relation to WT cells treated with apocynin. This provides further evidence for the hypothesis that both ROS and an Nrf2 pathway are necessary for activation of cellular defenses mediated by DJ-1/PGAM5. On the other hand, in Nrf2 KD cells treated with MitoQ, similar elevated levels of Nrf2 were present as when cells were treated with apocynin, however, there was no increase in DJ-1, Nrf1, or PGAM5 levels. Because MitoQ is mitochondria-targeted, this may indicate that mitochondrial ROS play a significant role alongside Nrf2 in enhancing levels of these proteins.

2.4.6 Limitations of the study

Certain fluorescent probes such as DHE are not entirely specific for detecting superoxide. DHE normally becomes hydroxylated when reacting with superoxide, forming 2-hydroxyethidium. Afterwards, it binds to DNA and fluoresces in red (λ_{ex} : 490 nm and λ_{em} : 590 nm). However, DHE can sometimes react with

other ROS in a less specific manner such as hydrogen peroxide, forming ethidium, which also fluoresces in red (λ_{ex} : 480 nm and λ_{em} : 580 nm) (Gardiner et al., 2020). Therefore, results provided by use of this probe need to be interpreted considering that DHE is not 100% specific for cellular superoxide. The mitochondrial counterpart, MitoSOX, is a cationic derivative of DHE (triphenylphosphonium). As such, it possesses the same strengths and weaknesses, although in a mitochondrion-specific manner (Gardiner et al., 2020). However, the inhibitory effect of PEG-SOD on DHE and MitoSOX fluorescence confirmed that superoxide was being produced during mild heat shock at 40°C, although we cannot rule out that other ROS may be present.

PY1, a boronate protected rhodol-based chemical probe, is extremely specific to hydrogen peroxide (Abo & Weerapana, 2019). Its weakness lies in the fact that it possesses a slow reaction rate with hydrogen peroxide ($k = 0.1\text{--}1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Abo & Weerapana, 2019). Physiological levels of H_2O_2 are usually rapidly removed by naturally occurring endogenous antioxidants like peroxiredoxins, catalase and glutathione peroxidases (Averill-Bates, 2024). Thus, while the probe is specific, it may at times possess low sensitivity (Abo & Weerapana, 2019). The inhibitory effect of PEG-Cat on PY1 and MitoPY1 fluorescence confirmed that peroxides were being produced during mild heat shock at 40°C, although it is possible that other ROS may be present. DHE and PY1, however, remain the most appropriate probes for our type of study.

The NOX inhibitor, apocynin, is among the most popular and well studied NOX inhibitors. Unfortunately, it can lack specificity and may yield off target effects. For example, apocynin may sometimes act as a direct antioxidant by targeting peroxides, but not superoxide, in endothelial cells as well as vascular smooth muscle cells (Heumüller et al., 2008). Because HeLa cells are epithelial, it is possible that apocynin may act as an antioxidant. Therefore, interpretation of results obtained using this chemical reagent must always consider potential off-target effects (Chocry & Leloup, 2020). For now, while certain new NOX inhibitors are in development and look promising with respect to specificity, none of the multiple inhibitors available today are without off-target effects (Chocry & Leloup, 2020).

MitoQ, the mitochondria-targeted antioxidant, is very selective in its ROS quenching. While its effectiveness has been shown in many previous studies, it also has secondary effects. Specifically, certain reports have shown that MitoQ may stimulate Nrf2 activity (Hu et al., 2018; Zhou et al., 2018). Thus, it is often difficult to discriminate with 100% certainty between the direct antioxidant effect of MitoQ, and its

indirect antioxidant effect via Nrf2 upregulation. Thus, interpretation of data stemming from the use of MitoQ must consider this aspect.

2.5 Conclusion

Overall, we showed that Nrf2 significantly impacts cellular ROS levels in a mitochondria-dependent manner during mild heat shock at 40°C. Treatment with apocynin and MitoQ suggests that ROS production occurs from, but not exclusively from, mitochondria and NOXs. However, it is not possible to rule out other potential sources of ROS production. Moreover, we have provided evidence to surmise that both a functional Nrf2 pathway, as well as mitochondria-derived ROS, are necessary to potentially activate certain cellular defense mechanisms involved in acquiring an adaptive survival response during mild heat shock. These results add a novel aspect to our understanding of cellular defenses. It provides evidence to surmise that not all ROS are equally important, and that the origin of ROS may dictate their potential signaling role in the adaptive survival response of the cell.

2.6 Supplementary Data

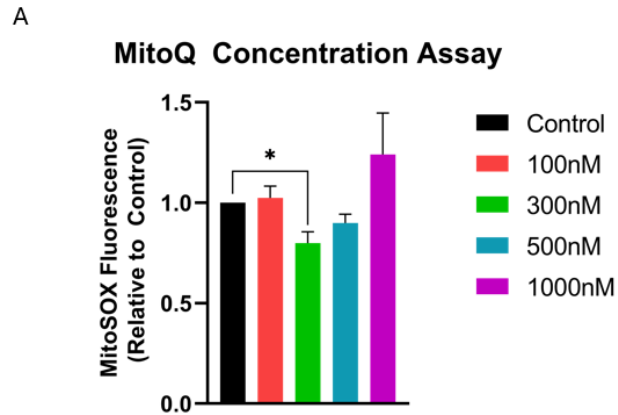


Figure 2.S1 MitoQ concentration data and inhibition of MitoSOX fluorescence. A concentration range of 100-1000 nM Mito Q was tested during 18 h for inhibition of basal levels of MitoSOX fluorescence in cells at 37°C. The minimum concentration of MitoQ that inhibited ROS fluorescence (300 nM) was selected for experiments. Means and SEM are from 3 independent experiments. * $p < 0.05$. Asterisks denote a statistically significant difference of the treatment condition from the control.

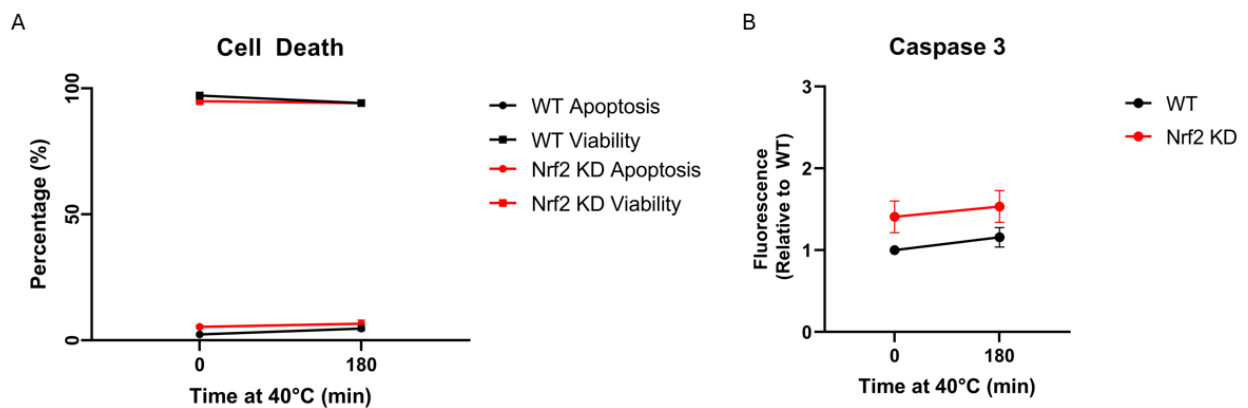


Figure 2.S2 Mild heat shock at 40°C does not cause cell death. WT and Nrf2 KD cells were exposed to mild heat shock at 40°C for 0 and 180 min. Cell viability was detected using PI fluorescence by flow cytometry, and apoptosis as the percentage of cells with nuclear chromatin condensation using Hoechst 33342 staining by confocal microscopy (A). Caspase-3 activity was detected by spectrofluorimetry and is relative to the untreated WT control ($t = 0$) (B). Means and SEM are from 3 independent experiments.

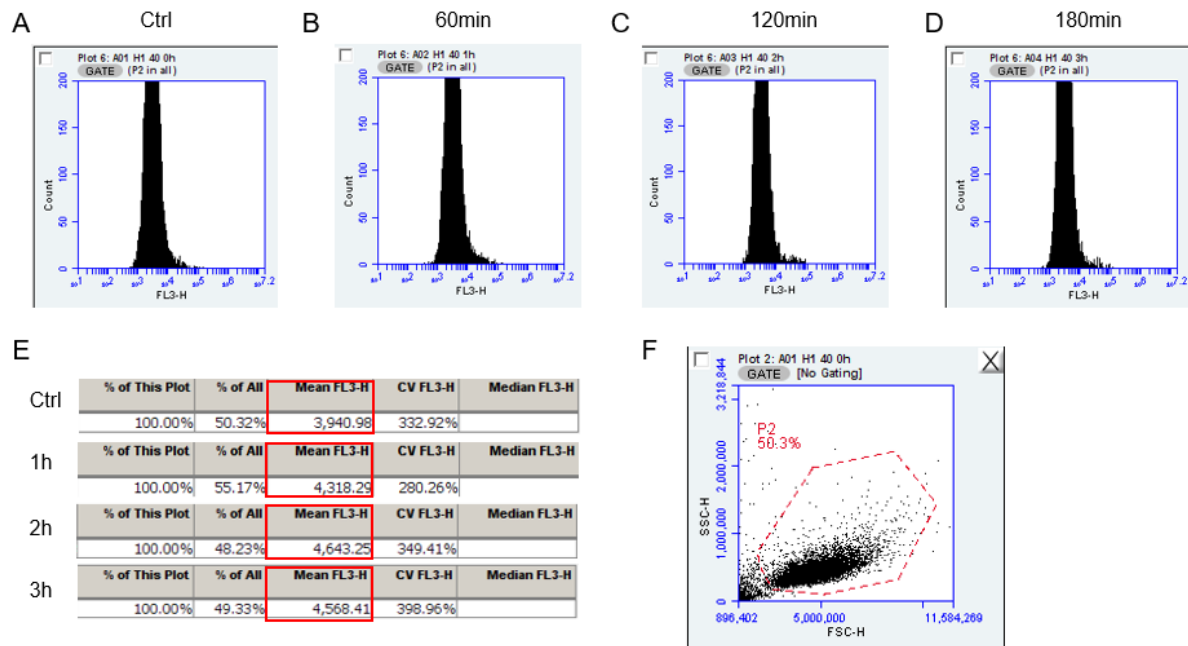


Figure 2.S3 Cytometry data for DHE fluorescence. Representative data for DHE fluorescence presented in Figure 2.1 was collected by flow cytometry. This procedure was used for the three other ROS probes. The gating of cells used for data acquisition to select for elimination of cell debris and for discrimination of doublets/triplets is shown in (A). The FL-3 channel of unheated control cells (B), and cells heated for 60 (C), 120 (D) and 180min (E) was quantified and expressed as fluorescence relative to the unheated control ($n = 4$). Respective values for DHE fluorescence are shown in (F).

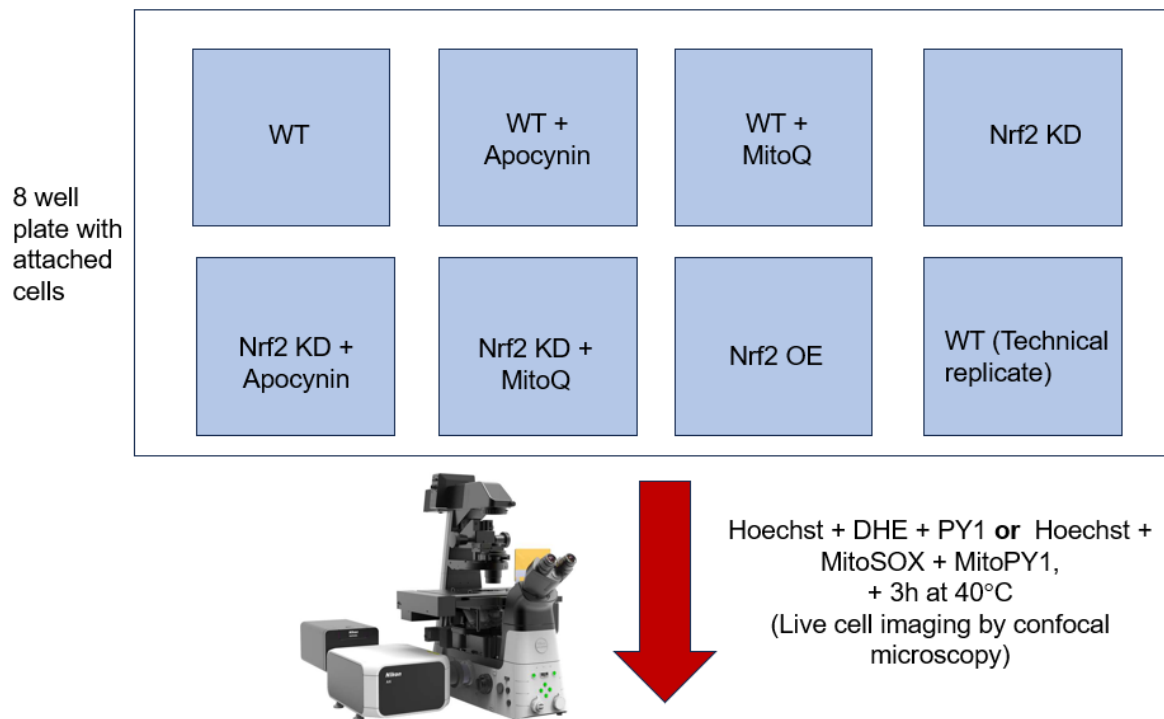


Figure 2.S4 The 8-well plate setup and 7 treatment conditions (WT, WT + MitoQ, WT + Apocynin, Nrf2 KD, Nrf2 OE, Nrf2 KD + MitoQ, Nrf2 KD + Apocynin) used for live cell imaging by confocal microscopy during a 3-hour kinetic run using multiple fluorescent probes are shown. Two series, using either cellular or mitochondrial ROS probes, were run in parallel.

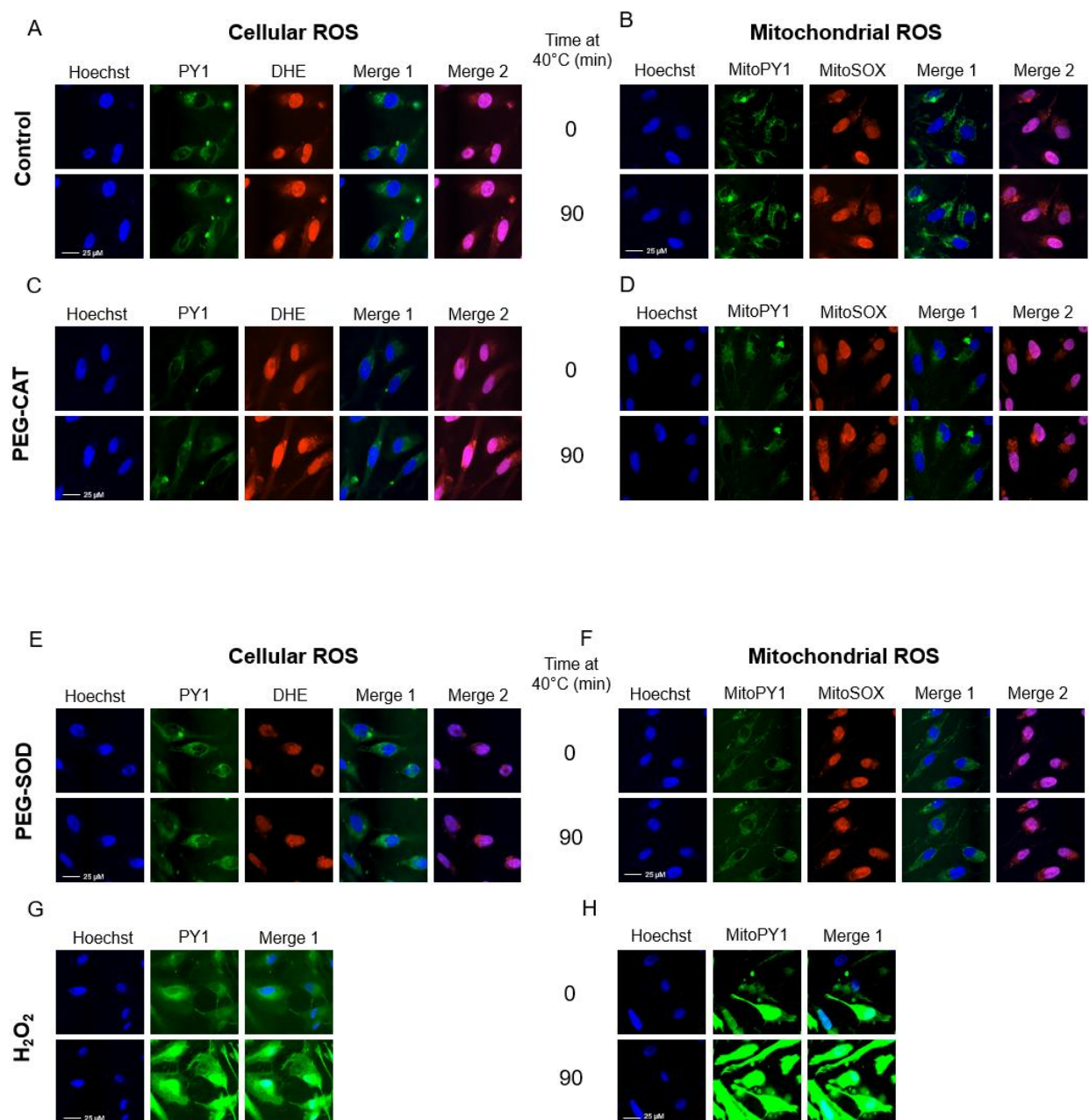
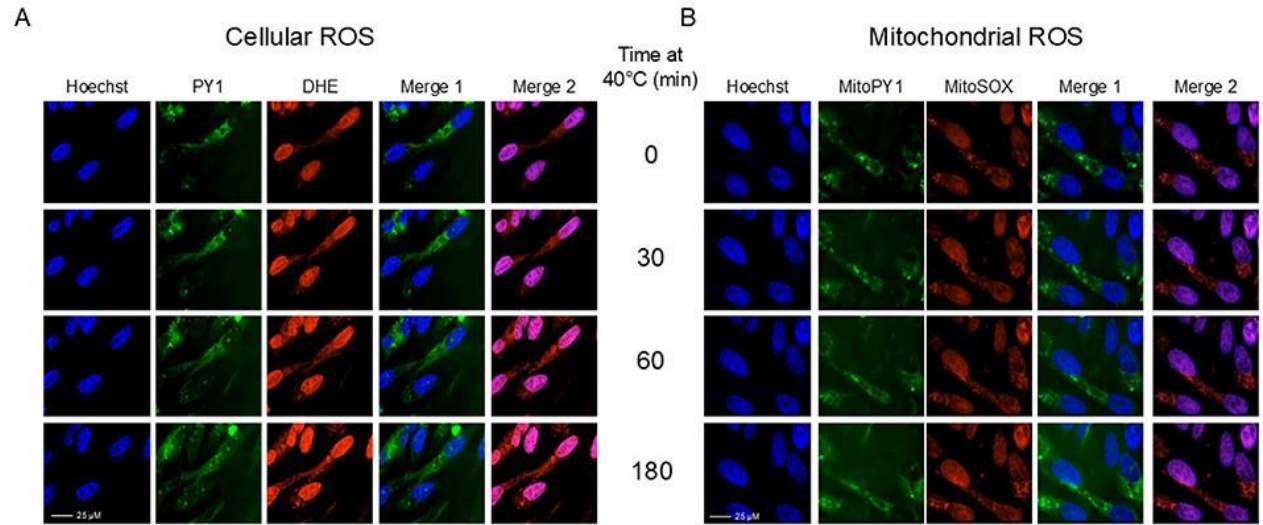
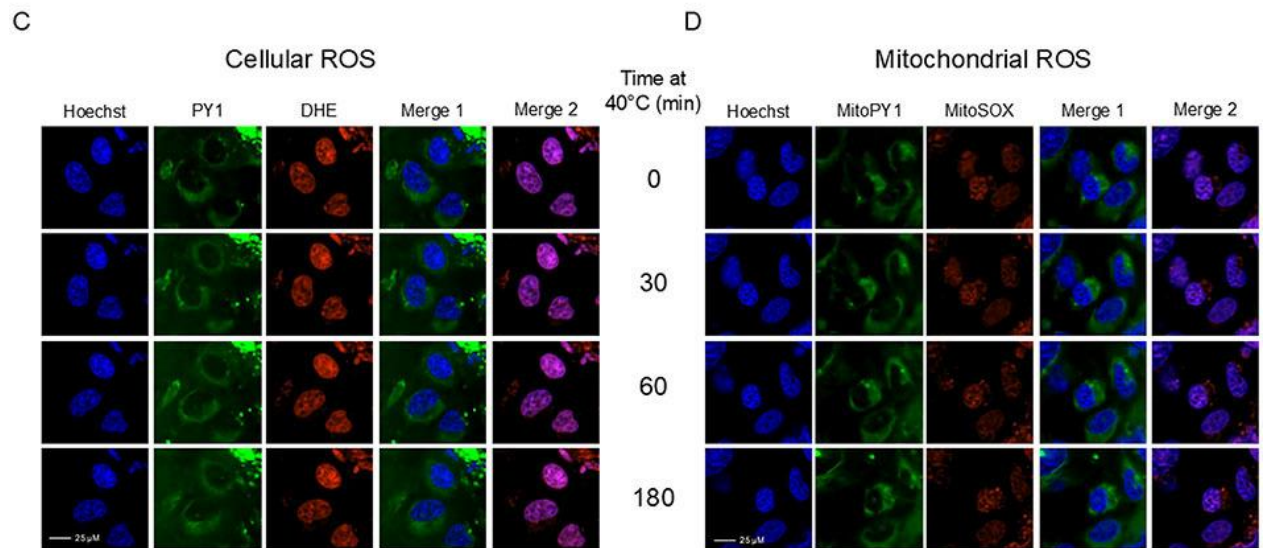


Figure 2.S5 Representative confocal images of ROS probe specificity experiment shown in Fig. 2.2. Fluorescence images for cellular ROS (A) and mitochondrial ROS (B) in control cells are shown at 2 separate treatment times (0 and 90min) at 40°C. Images of cells treated with PEG-CAT (C, D), and PEG-SOD (E, F) at 40°C, and with hydrogen peroxide (G, H) are presented. For live cell imaging, the same cells were followed during a 3-hour kinetic run using simultaneously added multiple fluorescent probes. The images are from one representative experiment with all conditions run in parallel. The experiment was repeated 4 times. The Hoechst channel is shown in blue, the PY1/MitoPY1 channels are shown in green, and the DHE/MitoSOX channels are shown in red. Merge 1 combines the blue and green channels. Merge 2 combines the blue and red channels. Scale bar = 25μM.

Wildtype

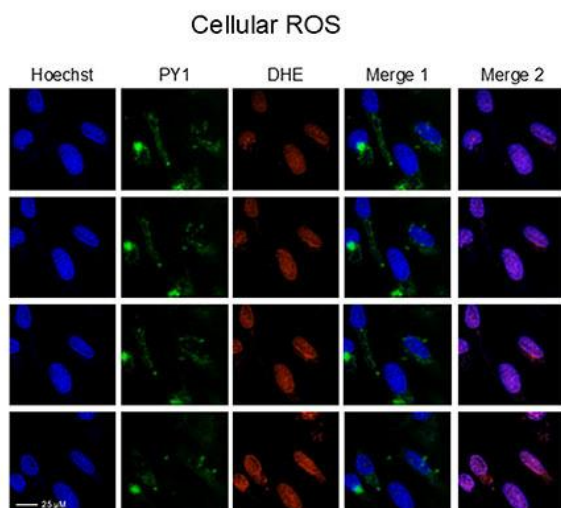


MitoQ

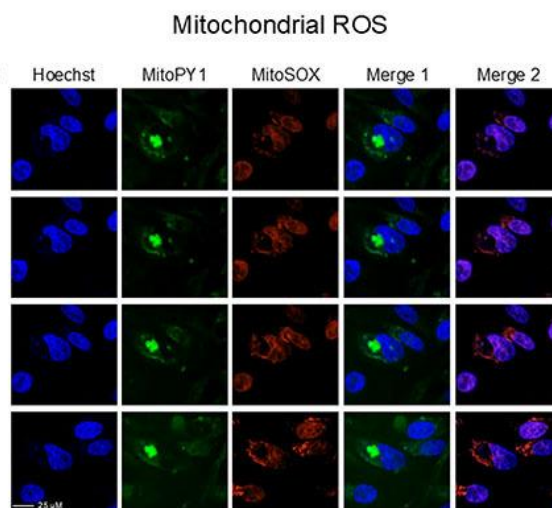


Apocynin

E

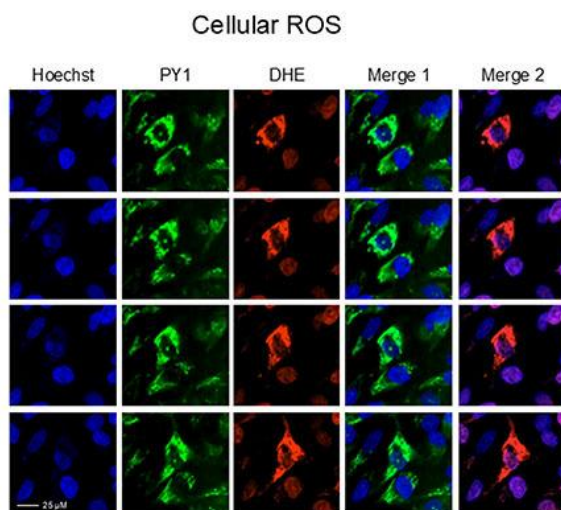


F

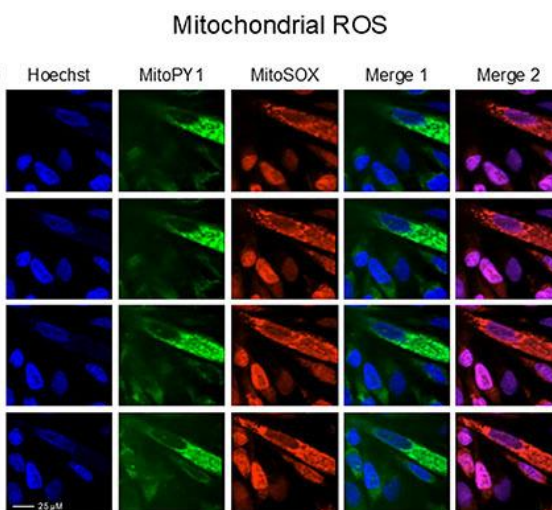


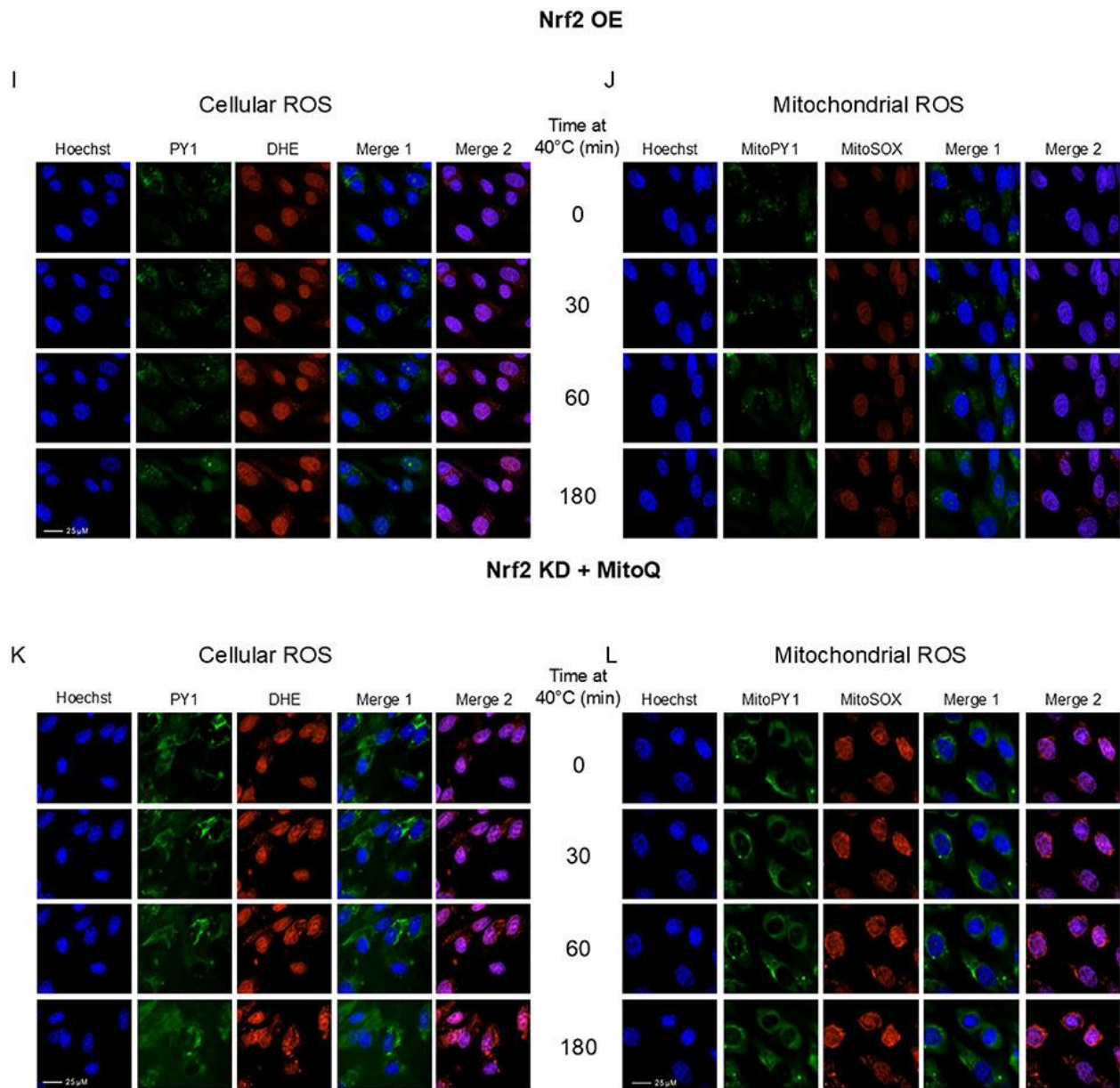
Nrf2 KD

G



H





Nrf2 KD + Apocynin

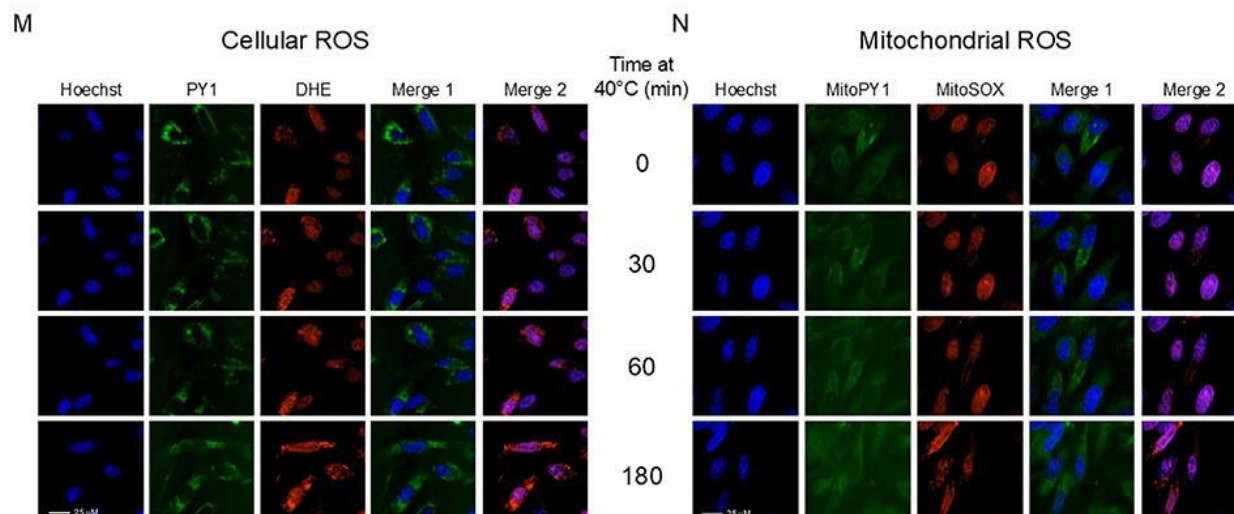


Figure 2.S6 Representative confocal images of all conditions shown in Figs. 2.3 to 2.7. Fluorescence images are shown for cellular ROS (A) and mitochondrial ROS (B) of WT cells at 4 separate treatment times (0, 30, 60 and 180min) at 40°C. Cellular ROS (C) and mitochondrial ROS (D) of MitoQ-treated cells are presented. Similarly, cellular and mitochondrial ROS, respectively, are shown for apocynin-treated cells (E, F), Nrf2 Knockdown cells (G, H), Nrf2 overexpressor cells (I, J), Nrf2 KD cells treated with MitoQ (K, L), and Nrf2 KD cells treated with apocynin (M, N). For live cell imaging, the same cells were followed during a 3-hour kinetic run using simultaneously added multiple fluorescent probes. The representative images are from one singular experiment with all conditions run in parallel. The experiment was repeated 4 or 7 times for cellular ROS, and 6 times for mitochondrial ROS. The Hoechst channel is shown in blue, the PY1/MitoPY1 channels are shown in green, and the DHE/MitoSOX channels are shown in red. Merge 1 combines the blue and green channels. Merge 2 combines the blue and red channels. Scale bar = 25μM.

CHAPITRE 3

ARTICLE 2 : THERMOTOLERANCE INDUCED BY NON-LETHAL HEAT SHOCK AT 40°C IS ACTIVATED BY MITOCHONDRIAL ROS AND IS NRF2-DEPENDENT

Archives of Biochemistry and Biophysics, January 2026, 110649, doi:

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2025.110649>

Georges Hraoui¹, Mélanie Grondin¹, Khadija Rezki¹ & Diana A. Averill-Bates^{1,*}

¹Département des sciences biologiques, Center of Excellence in Research on Orphan Diseases – Fondation Courtois (CERMO-FC) Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

*Corresponding Author: averill.diana@uqam.ca

Dr Diana A. Averill-Bates, Ph.D.

Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal

CP 8888, Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec

Canada H3C 3P8

Email: averill.diana@uqam.ca

Tel: (514) 987-3000 (4811)

Fax: (514) 987-4647

Keywords: Oxidative Stress; Mitochondria; Heat Shock; Nrf2; Thermotolerance; Adaptive Survival Response

Contribution des auteurs :

Georges Hraoui: Écriture du manuscrit original, visualisation, validation, méthodologie, investigation (toutes les figures), analyse formelle, curation des données.

Khadija Rezki: Visualisation, validation, méthodologie, investigation, analyse formelle, curation des données

Mélanie Grondin: Visualisation, supervision, méthodologie, investigation, analyse formelle, curation des données.

Diana A Averill-Bates: Écriture, révisions et modifications, visualisation, validation, supervision, ressources, administration du projet, méthodologie, investigation, acquisition des fonds, curation des données, conception.

Abstract :

Hyperthermia is generally administered as an adjuvant to chemotherapy/radiotherapy and sensitizes tumors to these anticancer treatments. Repeated heat treatments ($\geq 42^{\circ}\text{C}$) cause development of transient thermotolerance, an adaptive survival response. This response can be mediated by upregulation of cellular defense pathways and remains unclear. We aim to clarify the mechanistic explanations behind activation of this response. *In vitro*, thermotolerance can be induced by mild heat stress at 40°C and protects cells against subsequent lethal heat shock ($\geq 42^{\circ}\text{C}$). When HeLa cells were heated at 42°C , cellular and mitochondrial superoxide and peroxide levels increased. Treatment with mitochondrial antioxidant MitoQ, or NADPH oxidase (NOX) inhibitor apocynin, decreased levels of reactive oxygen species (ROS) and apoptotic cell death, indicating that mitochondria and NOX are important sources of ROS at 42°C . Mild heat stress at 40°C increased production of ROS, which are thought to activate the adaptive response, and reduce subsequent cell death at 42°C . Our results show that heat-derived ROS are linked to expression of master antioxidant regulator Nrf2. When Nrf2 was overexpressed or knocked down, Nrf2 expression was directly associated with protective ability of the adaptive response induced by mild heat stress (40°C). Mitochondrial ROS were found to be essential in mediating Nrf2-dependent thermotolerance, because MitoQ treatment prior to exposure to 40°C reduced Nrf2 levels and dissipated the subsequent protective effect of thermotolerance against toxicity at 42°C . Our study demonstrates that specific sources of ROS had biologically different implications in activating Nrf2, underlining potential therapeutic targets that may contribute to thermotolerance in anticancer treatments.

Résumé :

L'hyperthermie est généralement administrée en tant qu'adjuvant à la chimiothérapie ou à la radiothérapie, et sensibilise les tumeurs solides à ces traitements. Des expositions répétées à la chaleur ($\geq 42^{\circ}\text{C}$) induisent le développement d'une thermotolérance transitoire. Ce phénomène représente une réponse adaptative de survie. L'activation de cette réponse, pouvant être médiée par l'activation des voies de défense cellulaires, reste cependant mal comprise. Nous visons à clarifier les mécanismes sous-jacents à l'activation de cette réponse. *In vitro*, la thermotolérance peut être induite par un stress thermique léger à 40°C , protégeant ainsi les cellules contre un choc thermique létal subséquent ($\geq 42^{\circ}\text{C}$). Lorsque des cellules HeLa sont chauffées à 42°C , les niveaux de superoxyde et de peroxyde cellulaires et mitochondriaux augmentent. Un traitement avec l'antioxydant mitochondrial MitoQ ou avec l'inhibiteur de la NADPH oxydase (NOX) apocynine réduit les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi que la mort cellulaire apoptotique, indiquant que les mitochondries et les NOX constituent d'importantes sources de ROS à 42°C . Un stress thermique modéré à 40°C augmente la production de ERO, qui sont supposées activer la réponse adaptative et réduire la mort cellulaire lors d'une exposition subséquente à 42°C . Nos résultats montrent que les ERO induits par la chaleur sont associés à l'expression du régulateur antioxydant principal Nrf2. Lorsque Nrf2 est surexprimé ou sous-exprimé, son expression est directement corrélée à la capacité protectrice de la réponse adaptative induite par le stress thermique modéré (40°C). Nous avons démontré que les ERO mitochondriaux sont essentiels à la médiation de la thermotolérance dépendante de Nrf2, car un traitement par MitoQ avant l'exposition à 40°C réduit les niveaux de Nrf2 et abolit l'effet protecteur subséquent de la thermotolérance contre la toxicité à 42°C . Notre étude démontre que différentes sources d'ERO ont des implications biologiques distinctes dans l'activation de Nrf2, soulignant ainsi de potentielles cibles thérapeutiques pouvant contribuer au développement de la thermotolérance dans les traitements anticancers.

3.1 Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are oxygen-derived molecules, such as superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) that are generated as endogenous by-products of metabolic activity (Mailloux, 2020). ROS are also generated by exposure to environmental stressors such as UV radiation (Leach et al., 2001), heavy metals (Fu & Xi, 2020), and heat shock (Redza-Dutordoir et al., 2016). There are 41 known sources of ROS in mammalian cells (Sies & Jones, 2020), but most ROS are thought to be produced from mitochondria under homeostatic conditions (Mailloux, 2020; Sies et al., 2022). There is also evidence that the protein family of membrane NADPH oxidases (NOX) contributes more significantly to the cellular ROS pool than previously thought (Vermot et al., 2021). While all sources of ROS may be biologically relevant, many studies focus on mitochondria and NOX-derived ROS due to their proportionally large contribution to ROS production (Mailloux, 2020).

ROS are multifaceted molecules when it comes to their roles in the cell, and their effects are directly linked to their concentration in the cellular environment (Averill-Bates, 2024; Thannickal & Fanburg, 2000). At low homeostatic concentrations (oxidative eustress), ROS affect many essential cellular functions related to growth, differentiation, proliferation, signaling, activation or repression of transcription factors, cell cycle regulation, migration and adhesion, energetic metabolism, and immune function (Averill-Bates, 2024; Mailloux, 2020; Sies et al., 2022). At higher concentrations (oxidative distress), ROS can create pathological imbalances in the cell and disrupt homeostatic activity by oxidizing macromolecules like DNA, lipid membranes and proteins (Sies & Jones, 2020). This can ultimately lead to cellular demise by regulated processes like apoptotic cell death (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

Considering the potential of ROS to affect cellular function, eukaryotic cells have developed an extensive antioxidant system to maintain cellular redox balance. The master regulator of this antioxidant system is the transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Under homeostatic conditions, Nrf2 is kept inert through its binding to Keap1, creating a heterodimer that promotes Nrf2 ubiquitination and subsequent targeting for proteasomal degradation (Averill-Bates, 2024; Bellezza et al., 2018). When a redox imbalance (oxidative stress) occurs due to increased ROS production, cysteine residues on Keap1 become oxidized. This allows Nrf2 to dissociate from Keap1 (Suzuki et al., 2023). Nrf2 then undergoes phosphorylation and translocates to the nucleus, where it binds to antioxidant response elements (ARE) through its Neh1 domain alongside small Maf proteins (Bellezza et al., 2018; Katsuoka et al., 2005). This allows the transcription of multiple antioxidant genes that counteract the accumulation of pro-oxidants

(Bellezza et *al.*, 2018; Glory & Averill-Bates, 2016). Nrf2 has been shown to regulate multiple cell stress responses like the expression of heat shock proteins (HSP) (Rinaldi Tosi et *al.*, 2011) and the induction of autophagy by mild heat shock at 40°C (Grondin et *al.*, 2024). In addition, Nrf2 seems important in mediating cell survival during mild heat stress at 40°C (Glory & Averill-Bates, 2016; Grondin et *al.*, 2024), which makes Nrf2 an alluring therapeutic target in the context of heat-based anticancer treatments like hyperthermia.

Hyperthermia is an anticancer treatment that is usually administered in the clinic as an adjuvant to radiotherapy and/or chemotherapy (Baronzio, 2014; Datta et *al.*, 2020; Issels et *al.*, 2016; van der Zee, 2002). Temperatures $\geq 42^{\circ}\text{C}$ are cytotoxic. Localized hyperthermia consists of the administration of targeted heat of $\geq 42^{\circ}\text{C}$ that sensitizes tumors towards anticancer treatments (Baronzio, 2014; Datta et *al.*, 2020). A concern that hinders hyperthermia treatment is the development of resistance by cancer cells towards heat-induced cytotoxicity. Short exposures (e.g. ≤ 1 h) of cells to physiologically high temperatures (42-45°C), and longer exposures (e.g. ≥ 3 h) to milder temperatures (39-41°C) can both induce transient resistance to subsequent lethal heat shock ($\geq 42^{\circ}\text{C}$) (Bettaieb & Averill-Bates, 2008; Landry et *al.*, 1982). This phenomenon is known as thermotolerance, which is considered as an adaptive survival response. To bypass transient resistance, hyperthermia treatments must be spaced out at intervals of time to allow dissipation of thermotolerance.

Most earlier studies focused on thermotolerance induced by exposure to higher temperatures ($\geq 42^{\circ}\text{C}$) that are cytotoxic, rather than by mild, non-lethal heat stress (40°C). While the acquisition of thermotolerance is a broad phenomenon, potentially implicating many different cellular defense systems like HSPs (Landry et *al.*, 1982) and antioxidants (Pallepati & Averill-Bates, 2010), the mechanistic explanations for the induction of thermotolerance by mild heat shock at 40°C are still lacking. Further, the role of ROS production, as well as potential crosstalk with Nrf2 remain key, unresolved challenges. As such, the objectives of this study were twofold. Firstly, we aimed to clarify the implication of Nrf2 in the induction of thermotolerance by exposure to mild, non-lethal heat stress at 40°C. Secondly, we aimed to characterize the role of ROS in activating Nrf2 and identify their cellular origin during severe heat stress at 42°C. We surmised that mitochondrial ROS were necessary for activating the cellular adaptive response via mild heat stress at 40°C in an Nrf2-dependent way. Nrf2 significantly impacts mitochondrial dynamics (Esteras & Abramov, 2022; Holmström et *al.*, 2016). Thus, it may be that mitochondria also act to impact the Nrf2 pathway through mitochondrial ROS signaling. Moreover, our study novelly identifies specific

sources of ROS that are crucial in activating the Nrf2 pathway during severe heat shock at 42°C. This, in turn, may improve understanding and yield new therapeutic targets to be studied to bypass transient thermotolerance acquired during hyperthermia anticancer treatments.

3.2 Material and Methods

3.2.1 Cell Culture

Human cervical adenocarcinoma HeLa cells (American Type Culture Collection (ATCC) no. CC1-2, Manassas, VA, USA) were used because they respond well to heat treatment (Bettaieb & Averill-Bates, 2008; Grondin et al., 2024). Cervical cancer responds well to hyperthermia treatments (van der Zee, 2002; Datta et al., 2020). Cells were grown as monolayer cultures in tissue culture flasks (Sarstedt, Saint-Laurent, QC, Canada) in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Canada, ThermoFisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada) with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (50 units/ml) and streptomycin (50 µg/ml) (Hyclone Laboratories, ThermoFisher Scientific). All cells used in experiments were between the 10th and 20th passages. Cell cultures were maintained in an incubator at 37°C with a humidified atmosphere of 5% CO₂ (model MCO-19AIC, Sanyo, ESBE Scientific, Markham, ON, Canada) (Glory et al., 2014; Grondin et al., 2024). Temperature control was $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ and CO₂ control was $\pm 0.15\%$. Twenty-four hours before experimentation, cell culture medium was replaced with fresh medium. After experimentation, cells were harvested using 0.5 mg/ml trypsin; 0.2 mg/ml EDTA in phosphate buffered saline (PBS), and then washed by centrifugation (1000 x g) for 3 min.

3.2.2 Cell lines with Overexpression or Knockdown of Nrf2

Two modified HeLa cell lines were created, one designed to overexpress the *nrf2* gene while the other knocked down the *nrf2* gene. This was achieved using *nrf2*-specific CRISPR/Cas9 (sc-400017-NIC) and Nrf2 Lentiviral Activation Particles (sc-400017-LAC), as recommended by the manufacturer (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) (Grondin et al., 2024). For the knockdown (KD) of Nrf2, a pair of plasmids was designed to knockout gene expression of *nrf2*. Each of the two plasmids encoded a D10A-mutated Cas9 nuclease and a target-specific RNA (gRNA) (Santa Cruz Biotechnology). For the overexpression of Nrf2 (OE), a synergistic activation mediator (SAM) transcriptional activation system designed to upregulate gene expression specifically and efficiently via lentiviral transduction was used (Santa Cruz Biotechnology).

3.2.3 Chemical and Heat Treatments

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Canada Co. (Oakville, ON, Canada) unless indicated otherwise. Twenty-four hours before experimentation, freshly harvested cells were resuspended in DMEM/10% FBS at 1×10^6 cells/ml in a final volume of 5 ml. HeLa cells were then separated into three chemical treatment groups, when applicable. The first group was untreated and served as control. The second group was treated with apocynin (1 mM) (Cayman Chemical, Cedarlane Canada, Burlington, ON, Canada) for 30 min before heat shock at 42°C. To select the apocynin concentration, we chose the highest non-toxic concentration (1 mM) shown in a previous study (Krupashree et al., 2024). A 30 min exposure was the shortest time found to have an inhibitory effect in HeLa cells. The third group was treated with Mitoquinone mesylate (MitoQ) (300 nM) (Cayman Chemical) 18 h prior to 42°C heat shock, because it was the lowest concentration to effectively scavenge mitochondrial ROS (Suppl. Fig. 3.S1). Apocynin was diluted in 95 % ethanol to a final concentration of 0.75 %. Ethanol concentrations under 1 % do not affect cell viability (Dar et al., 2021). To induce heat shock, the three groups of cells were transferred to a humidified incubator at 42°C and heated for 30 to 180 min (Grondin et al., 2024; Hraoui et al., 2025). Cells were then washed by centrifugation (1000 x g) for 3 min to remove chemicals, and analyzed for levels of Nrf2, DJ-1, PGAM5, and ATF5 (see section 2.6).

When applicable, cells confluent at 90% in monolayers in tissue culture flasks containing DMEM medium with 10% FBS were pre-heated for 3 h in a humidified incubator at 40°C containing 5 % CO₂ to induce mild thermotolerance following a 20 min period to allow culture medium to reach 40°C. This pre-treatment at 40°C has been shown to induce an effective cellular adaptive response without triggering cell death (Grondin et al., 2024; Hraoui et al., 2025). Normal controls were incubated under the same conditions in an incubator at 37°C.

Where appropriate, cells were pre-treated with polyethylene-glycol superoxide dismutase (PEG-SOD) (100 units/ml) or polyethylene-glycol catalase (PEG-CAT) (300 units/ml) for 3 h at 37°C before the heat treatment. Controls were untreated prior to heat treatment.

3.2.4 Flow Cytometry Analysis

For ROS monitoring, cells were labeled with a combination of two probes. For cellular ROS, dihydroethidium (DHE) (0.5 µM) (Molecular Probes, Invitrogen Canada) or PeroxyYellow 1 (PY1) (15 µM) (Sigma-Aldrich Canada Co.) was used. For mitochondrial ROS, MitoSOX (0.5 µM) or MitoPY1 (10 µM)

(Molecular Probes, Invitrogen Canada) were employed. Staining of cells with all ROS probes was conducted 15 min prior to analysis by flow cytometry. For each sample, a minimum of 10 000 cells was analyzed. The flow rate was set at 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The probes PY1 and MitoPY1 were detected using the FL1 channel, while DHE and MitoSOX were detected using the FL3 channel. For viability assays, cells were labeled for 5 min with 5 μL of propidium iodide (PI) at a final concentration of 2 μM prior to detection using the FL3 channel (Grondin et al., 2024). With the C6 cytometer, pre-optimizing voltage and gain settings did not reduce the fluorescence detection range (Grondin et al., 2024). For the analysis of results, we used BD Accuri™ C6 software. Doublet exclusion was performed by plotting the height or width against the area for forward or side scatter (Suppl. Fig. 3.S2A). Doublets possess double the area and width of a single cell, while maintaining similar height. Disproportion between height, width, and area was thus used to discriminate the doublets (Bio-Rad, flow cytometry guide).

3.2.5 Live Cell Imaging by Confocal Microscopy

Twenty-four hours prior to experiments, 0.2×10^6 cells/ml were plated in a μ -Slide 8-well plate for 24 h (Ibidi, Fitchburg, WI, USA). For live cell imaging, cells in these plates were incubated in a micro-incubator with control of temperature, CO_2 and humidity (Grondin et al., 2024). Live cell imaging was conducted at 5 min intervals from 5 min to 3 h at 42°C . Cells were labeled with three fluorescent probes for confocal analysis. For nuclei staining, Hoechst 33258 (1.25 μM) (Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, ON, Canada) was used 15 min beforehand at 37°C . For cellular ROS measurement, cells were labelled with DHE (0.5 μM) and PY1 (15 μM) in parallel at 37°C for 15 min before experimentation. For mitochondrial ROS measurement, MitoSOX (0.5 μM) and MitoPY1 (10 μM) were used instead. Cell imaging at 42°C was conducted with the NIS-Element AR4 software using standard excitation and emission filters for visualizing the fluorescent probes. A Nikon A1+ high sensitivity (cathode GaAsP) confocal inverted microscope was used with a 60X objective (Plan Apo λ , Oil) (Nikon Canada, Montreal, QC) (Grondin et al., 2024). It is composed of a multispectral detector on 32 channels with resolutions of 2.6 to 10 nm and is equipped with an XY motorized platform and piezoelectric system for fast movement in the Z-stack. The sample area was scanned at a resolution of 512 x 512 pixels in 0.6 seconds. Images were analyzed using FIJI software (NIH, Maryland, USA). Fluorescence intensities were reported to the number of cells. Afterwards, they were compared between different treatments relative to unheated controls at 37°C . Due to variability in the fluorescent signal between different experiments, the analysis was consistently referenced to the baseline (zero point) of the normal control condition for accurate analysis and comparison (Grondin et al.,

2024; Hraoui *et al.*, 2025). Multiple replicates were performed per experiment, and at least 500 cells were analyzed per condition. Using the Hoechst channel staining nuclei, the percentage of apoptotic cells was evaluated and calculated by creating a ratio of nuclei-condensed cells over total cell count x 100.

Using 8-well plates, all 5 conditions (WT, WT + MitoQ, WT + Apocynin, Nrf2 KD, Nrf2 OE) were recorded at the same time in parallel at 42°C (plate 1). Cells pre-treated at 40°C for 3 h beforehand were assessed afterwards in a separate 8-well plate (plate 2). The experimental setup is shown in Suppl. Fig. 3.S3. Cellular and mitochondrial ROS probe-stained cells were respectively split onto two separate plates and assessed in series. Data was collected in parallel for all 5 conditions in normal and 40°C-pretreated thermotolerant cells at 42°C, as well as for cellular and mitochondrial ROS. Experiments were repeated between 4 and 9 times. However, analysis and presentation of these results have been split to improve understanding and interpretation of the data. Re-use of some data for control (Ctrl or WT) and other conditions in different figures thus arise from this process and is indicated in the appropriate figure legends.

3.2.6 Confocal Microscope Analysis of Fixed Cells

Before experiments, 0.2×10^6 cells/ml in DMEM-FBS were plated in a μ -slide 8 well plate for 24 h (ibidi). Cells were heated for 0 to 120 min at 40°C, 42°C or 44°C, and then fixed using 3.7% formaldehyde for 15 min in the dark. A blocking solution (PBS, 5% bovine serum albumin (BSA), 5% FBS and 0.1% Triton X-100) was used to render cells permeable. Cells were then incubated overnight at 4°C with a primary antibody against Nrf2 (1:200) (MediMabs, Montreal, QC, Canada) in blocking solution, followed by a 2 h incubation at room temperature with Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure anti-rabbit secondary antibody (1:1000) (Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, PA, USA). Cell nuclei were labeled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (6.25 μ g/ml) during 15 min (Grondin *et al.*, 2024). After each incubation procedure, cells were rinsed three times with PBS. Confocal microscope analysis was carried out as above (section 2.5). Standard excitation and emission filters were applied to visualize DAPI and Alexa Fluor 647 (Microscience, Cambridge, MA).

The analysis of colocalization between Nrf2 and nuclei was performed using the NIS-Element AR4 software. The Pearson's correlation coefficient (PCC) can be used for quantifying colocalization (Dunn *et al.*, 2011). Pearson's coefficient, a metric that quantifies the linear correlation between two sets of data, was calculated to evaluate the degree of colocalization between Nrf2 and cell nuclei, indicating the degree of their spatial correlation within the cells. By comparing values for Pearson's correlation coefficients

obtained from the control group and the heated group, insights into the spatial relationship and potential interactions between Nrf2 and cell nuclei could be derived. Fluorescence is pink for colocalization of red and blue fluorescence in the merged images.

3.2.7 Western Blot Analysis

After experimentation, harvested cells were washed by centrifugation (1000 x *g*) in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid (MOPS), pH 7.4) (Samali *et al.*, 1999). The supernatant was then discarded. The remaining pelleted cells were resuspended in a lysis buffer (20 mM MOPS, 80 mM β -glycerol phosphate, 10% glycerol, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 , 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM NaF, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1% Triton X-100, pH 7, and a cocktail of protease inhibitors containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM aprotinin, 10 μM pepstatin A, 10 μM leupeptin, and 25 μM calpain inhibitor, pH 7.4 (*Complete Mini*, Roche, Millipore Sigma, Etobicoke, ON, Canada). They were then frozen overnight at -80°C . They were thawed on ice for 30 min with constant vortexing, followed by a 10 min centrifugation (2500 x *g*). Following this, whole cell lysates were collected, while allowing the removal of nuclei and unbroken cells. Proteins were quantified with the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd, St Laurent, QC), and 30 μg of protein were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (15%) (Laemmli, 1970). For Western blotting, proteins were detected using rabbit primary antibodies recognizing Nrf2 (1:500) (Medimabs, Montreal, QC, Canada). These were combined with horseradish peroxidase-conjugated polyclonal secondary antibodies (1:5000). Protein expression was analyzed relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) (1:5000) using a laser scanning densitometer (Fusion Fx7, Montréal Biotech (MBI), Montreal, QC) and Quantity one software (Bio-Rad Laboratories) (Glory *et al.*, 2014; Grondin *et al.*, 2024). The Nrf2 primary antibody was quantified using the appropriate GAPDH loading control from the same membrane. To reprobe for the GAPDH antibody, membranes were stripped using 0.2 M glycine at pH 2.2 for 1 h at room temperature (Hraoui *et al.*, 2025).

3.2.8 Caspase Activity

Following heat treatment at 42°C for 30 min to 3 h, HeLa cells were harvested and suspended in a caspase buffer (10% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 20 mM 1,4-piperazinediethanesulfonic acid, 100 mM sodium chloride (NaCl), 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.2). Afterwards, cells were frozen at -80°C . Enzymatic activity was determined in thawed cell lysates using the appropriate substrate (200 μM): Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin for caspase-3 and Ac-LEHD-7-

amino-4-trifluoromethylcoumarin for caspase-9 (Calbiochem, MilliporeSigma, Sigma-Aldrich Canada) (Chow-Shi-Yée et al., 2020; Grondin et al., 2024). The kinetic reactions used to generate 7-amino-4-methylcoumarin (e.g., ex. λ 380 nm, λ em. 460 nm) or 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (excitation λ 400 nm, emission λ 505 nm) were detected by spectrofluorometry (Varioskan Lux, ThermoScientific, St Laurent, QC, Canada). Enzymatic activity was normalized to activity of unheated controls at 37°C.

3.2.9 Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total RNA was isolated from different cells using the Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Subsequently, reverse transcription was carried out using the Meridian/Bioline SensiFAST complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) Synthesis Kit (FroggaBio Inc, Concord, ON) on a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). For gene quantification, quantitative PCR (qPCR) was performed on a CFX96 Touch™ Thermal cycler (Bio-Rad) using the Meridian/Bioline SensiFAST SYBR No-ROX Kit (FroggaBio Inc). The qPCR assay employed specific primers for each target gene. The data were exported as Excel files for analysis. The copy number of each target gene was normalized to the 18S ribosomal RNA (rRNA). Amplification of the target genes was achieved under the following thermal cycling conditions: The quantitative PCR run program consisted of a first step at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 30 s at 58 °C. The target gene transcript level was normalized against the 18S rRNA level. Fold changes of RNA transcripts were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Gene	Primer left	Primer right
<i>Nrf2</i>	CGAAACTTTAAAAAGCATTGGA	AGCCCAAATGGTGTCTAAG
<i>hsp72</i>	TTAGGGGCCTTTCCAAGATT	TTCAACATTGCAAACACAGGA
<i>gcl-1</i>	GAGCAACCTACTGTCTAAGCA	TCAGGTCCCAGGTAGTCTTT
<i>ho-1</i>	CCATGAACCTTTGTCCGGTGG	GAGAGGGACACAGTGAGAGG
<i>18s</i>	CTTAGAGGGACAAGTGCG	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA

Abbreviations: GCL, gamma cysteine ligase; HO-1, heme oxygenase-1; Hsp, heat shock protein

3.2.10 Statistics and Data Presentation

Data represents means $\pm$ SEM from a minimum of three to nine independent experiments performed in duplicate. Statistical analyses and figures were made using GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For comparisons among the different time points and groups, one-way and two-way analysis of variance (ANOVA), which measure the linear contrast of means, were performed,

respectively, to test for significant differences between treatments. To control the family-wise error rate at the desired level ($\alpha = 5\%$), the Bonferroni-Holm method was used. For significant differences between time points, # represents $p < 0.05$, ## represents $p < 0.01$, ### represents $p < 0.001$ and #### represents $p < 0.0001$ between cells heated at 42°C compared to controls at 37°C. For significant differences between treatments, * represents $p < 0.05$, ** represents $p < 0.01$, *** represents $p < 0.001$ and **** represents $p < 0.0001$ between thermotolerant and non-thermotolerant cells heated at 42°C compared to controls at 37°C. The p-values provided are those that have been modified to account for the increased risk of Type I error (false positives) when making multiple comparisons (adjusted p-values).

For certain experiments monitoring ROS levels, caspase activity, Western blotting, apoptosis and cell viability, all conditions presented were evaluated in parallel. As such, comparisons to the same controls (or wildtype) may appear more than once. Data presentation was separated into multiple figures to improve clarity and interpretation of the results. Full graphs with all conditions are presented in supplementary information (Suppl Fig. 3.S4). When control (or WT) data is reused/represented in different figures, dotted lines were used for graphs instead of solid lines. For histograms, control data was represented with stripes.

3.3 Results

3.3.1 Heat shock at 42°C increases ROS levels and causes cell death

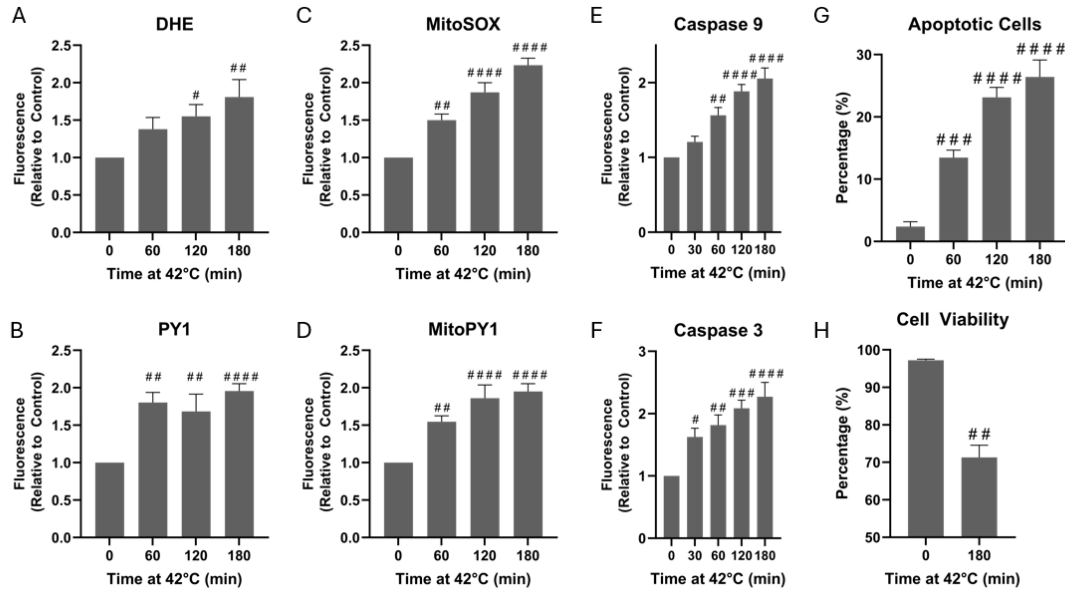


Figure 3.1 Heat shock at 42°C increases ROS production and induces cell death. HeLa cells were heated at 42°C for up to 180 min. Cellular levels of superoxide (DHE) (n = 6) (A) and peroxides (PY1) (n = 6) (B), and mitochondrial levels of superoxide (MitoSox) (n = 7) (C) and peroxides (MitoPY1) (n = 7) (D) were analyzed by flow cytometry. Caspase 9 (n = 9) (E) and caspase 3 (n = 9) activity (F) were detected by spectrofluorometry. Data (A-F) was expressed as fluorescence relative to unheated controls (1.0, T = 0) at 37°C. Apoptosis (n = 4) (G) was measured by nuclear chromatin condensation using live cell imaging by confocal microscopy and was expressed as percentage of chromatin-condensed cells. Cell viability (n = 3) (H) was analyzed by flow cytometry in unheated controls (T = 0) and cells heated 42°C for 180 min by PI staining and was expressed as percentage of viable cells. Data was expressed as means ± SEM: #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001, ####p < 0.0001. #: statistically significant difference between the unheated control (T = 0) and different time points at 42°C.

Firstly, we evaluated ROS production and cytotoxicity during severe heat shock at 42°C in HeLa cells. ROS levels increased significantly during 180 min at 42°C relative to controls at 37°C (T = 0) (Fig. 3.1A to 3.1D). DHE fluorescence, representative of cellular superoxide, increased linearly from 60 to 180 min at 42°C, and was 81% higher after 180 min (Fig. 3.1A, Suppl. Fig. 3.S2B-3.S2F). PY1 fluorescence, indicative of cellular peroxide, increased by 80% and 95%, respectively, after 60 and 180 min at 42°C relative to the control (Fig. 3.1B). To evaluate if mitochondria were contributing to these heat-induced increases, mitochondrial superoxide and peroxides, respectively, were monitored with MitoSOX, and MitoPY1, which are highly specific mitochondrial derivatives of DHE and PY1. Mitochondrial superoxide levels increased significantly in an approximately linear manner by 123% during 180 min (Fig. 3.1C), while mitochondrial

peroxide levels increased by 55% and 90%, respectively, during 60 and 120 min at 42°C (Fig. 3.1D). The trends for increases in ROS levels were similar between cellular and mitochondrial ROS. Thus, it is possible that mitochondria were contributing to overall ROS accumulation at the higher temperature.

Due to the change in cellular redox state during heat shock at 42°C, we evaluated if the increased ROS accumulation could lead to apoptotic cell death (Villalpando-Rodriguez & Gibson, 2021). The activities of apoptosis initiator caspase 9 (Fig. 3.1E) and executor caspase 3 (Fig. 3.1F) were monitored during heat stress. Activities of both caspase 9 and caspase 3 increased after 30 min at 42°C. Caspase 9 activity doubled during 180 min at 42°C, while there was a 130% increase in caspase 3 activity. To verify that downstream, end stage events of apoptosis occurred, nuclear chromatin condensation was monitored through live cell imaging (Fig 3.1G). After 60 min at 42°C, 13% of cells exhibited nuclear condensation, and that number doubled to 26.4% after 180 min. Cell viability was evaluated by flow cytometry using PI staining (Fig. 3.1H). Initially, cell viability was 97% and decreased to 71% after 3 h of severe heat shock, confirming that significant cell death was inflicted by heat shock at 42°C.

3.3.2 Fluorescence of ROS-targeted probes is diminished by antioxidants

The increases in ROS fluorescence at 42°C (Fig. 3.1) were confirmed through live cell imaging using a confocal microscope equipped with a temperature and CO₂-controlled incubator (Fig. 3.2, Suppl. Fig 3.S5). To verify if the increases in fluorescence could be attributed to the putatively studied ROS, cells were pre-treated with either PEG-SOD, a superoxide scavenger, or PEG-CAT, a scavenger of peroxides. Levels of both cellular superoxide (Fig 3.2A, Suppl. Fig. 3.S5A, 3.S5E) and mitochondrial superoxide (Fig. 3.2C, Suppl. Fig. 3.S5B, 3.S5F) were reduced significantly by treatment with PEG-SOD (-38% and -30%, respectively, after 150 min at 42°C). PEG-CAT treatment did not affect levels of DHE and MitoSOX fluorescence (Fig. 3.2A, 3.2C). Treatment with PEG-CAT significantly reduced levels of both cellular (Fig. 3.2B, Suppl. Fig. 3.S5A, 3.S5C) and mitochondrial (Fig. 3.2D, Suppl. Fig. 3.S5B, 3.S5D) peroxides (-60% and -35%, respectively, after 150 min at 42°C). Treatment with PEG-SOD did not affect fluorescence of peroxide-targeted probes, PY1 and MitoPY1 (Fig. 3.2B, 3.2D). Treatment with H₂O₂ (Fig. 3.2B, 3.2D insets, Suppl. Fig. 3.S5G, 3.S5H), however, resulted in fluorescence increases of 800-1000% after 150 min relative to controls, further confirming the sensitivity of PY1 and MitoPY1 to intracellular peroxides. Together, these results show that the increase in fluorescence of the ROS probes at 42°C can be attributed to their respective targeted ROS.

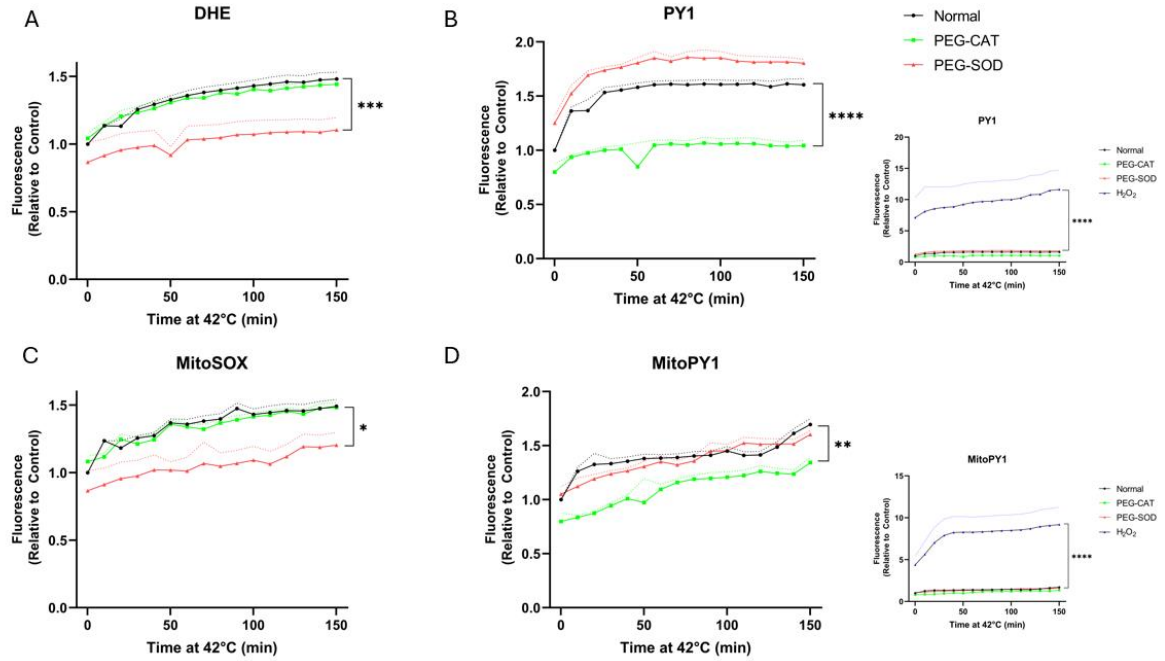
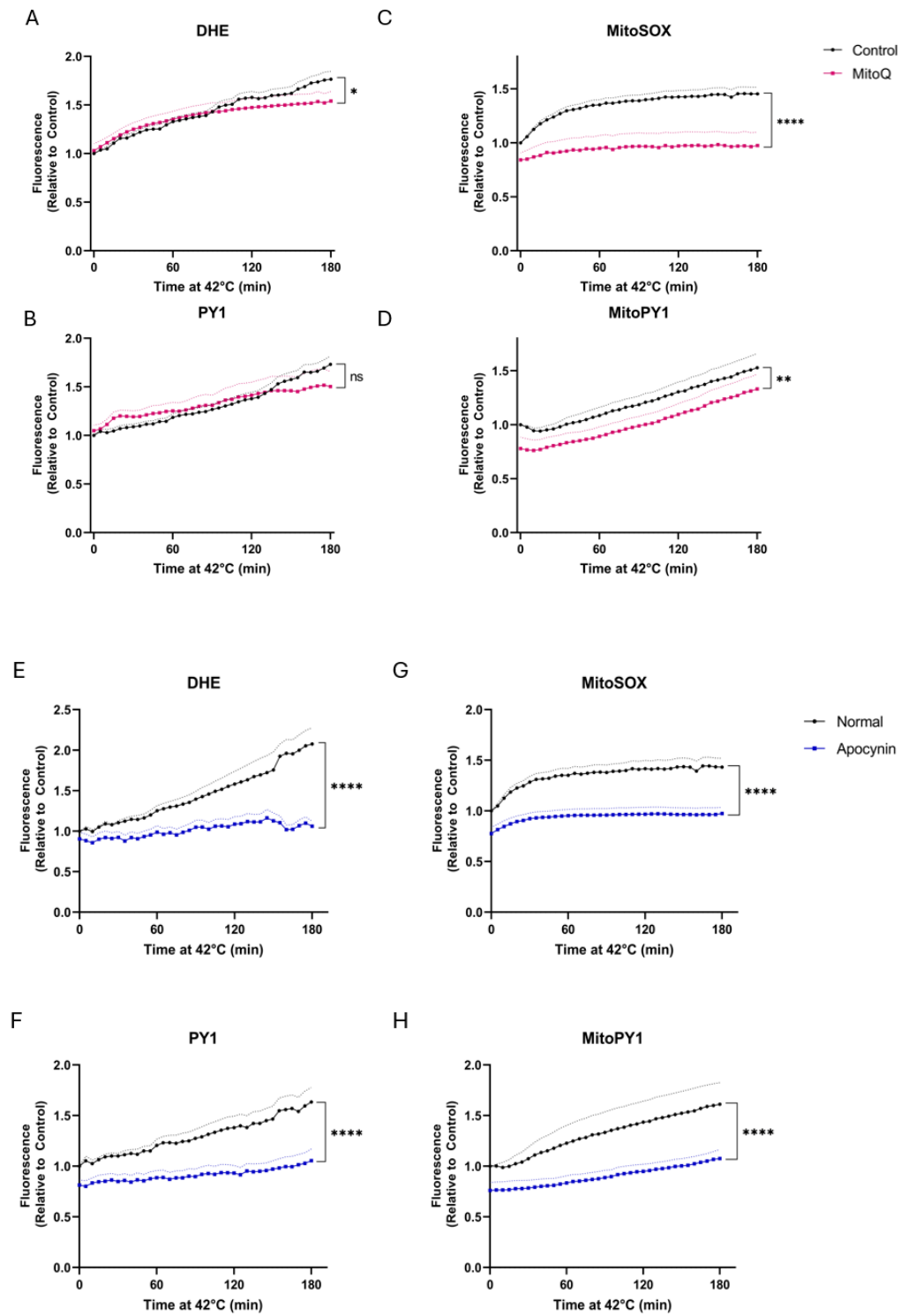


Figure 3.2 Antioxidants diminish enhanced ROS production at 42°C. Untreated cells and cells pre-treated with antioxidants PEG-CAT or PEG-SOD were heated at 42°C for different times from 0 to 150 min. Fluorescence measurements were collected every 10 min using live cell imaging with a confocal microscope. Data for cellular levels of superoxide (A) and peroxides (B), and mitochondrial levels of superoxide (C) and peroxides (D) were expressed as fluorescence relative to untreated controls (1.0, T = 0) (n = 3). Hydrogen peroxide served as a positive control. Data was expressed as means $\pm$ SEM: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. *: statistically significant group difference between normal control cells $\pm$ antioxidant treatments, at 42°C.

3.3.3 Mitochondria and NOXs are contributors to oxidative stress at 42°C: role in mediating cell death



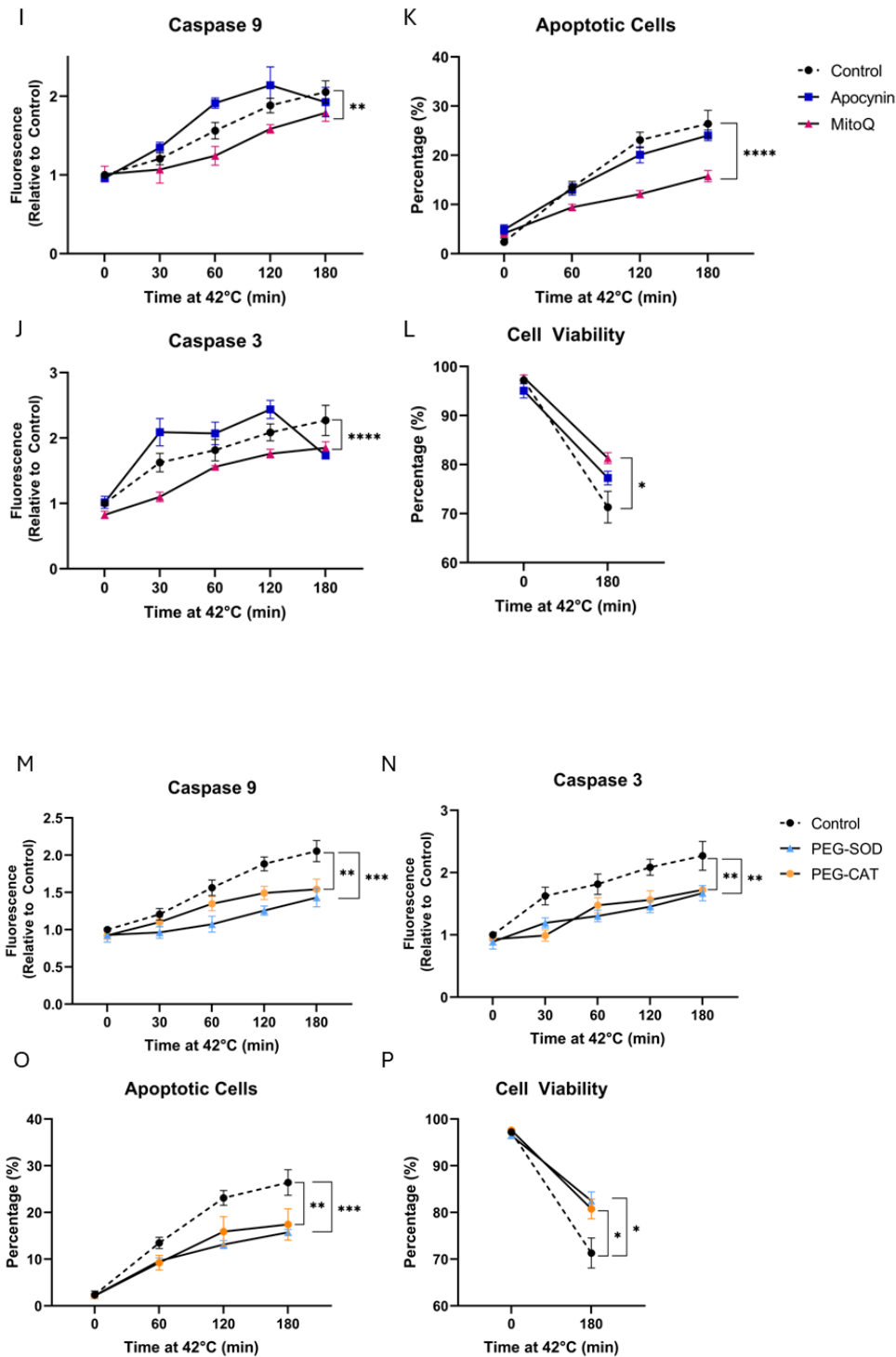


Figure 3.3 Mitochondria and NOXs contribute to ROS production at 42°C: role in cell death. Cells, untreated or pre-treated with MitoQ or apocynin, were heated at 42°C for 3 h. Fluorescence measurements were collected using live cell imaging with a confocal microscope every 5 min. For MitoQ experiments, cellular superoxide (n = 6) (A) and

peroxides (n = 6) (B), and mitochondrial superoxide (n = 5) (C) and peroxides (n = 5) (D) were analyzed. For apocynin experiments, cellular superoxide (n = 3) (E) and peroxides (n = 3) (F), and mitochondrial superoxide (n = 4) (G) and peroxides (n = 4) (H) were analyzed. Caspase 9 (n = 9) (I, M) and caspase 3 (n = 9) (J, N) activities were obtained by spectrofluorometry. Data was expressed as fluorescence relative to unheated controls (A-J, M-N) (1.0, T = 0). Apoptosis (n = 4) (K, O) was noted by nuclear chromatin condensation using live cell imaging by confocal microscopy and expressed as percentage of chromatin-condensed cells. Cell viability (n = 3) (L, P) was analyzed by flow cytometry at T = 0 min and T = 180 min by PI staining and expressed as percentage of viable cells. Curves (dotted lines) for WT normal caspase 9 (I, M)/caspase 3 (J, N)/apoptosis (K, O)/viability (L, P) data are reused from Figure 3.1, and are from experiments that were conducted in parallel (Suppl. Fig. 3.S4). Data was expressed as means $\pm$ SEM: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. *: statistically significant group difference between control cells $\pm$ antioxidants or inhibitors, at 42°C.

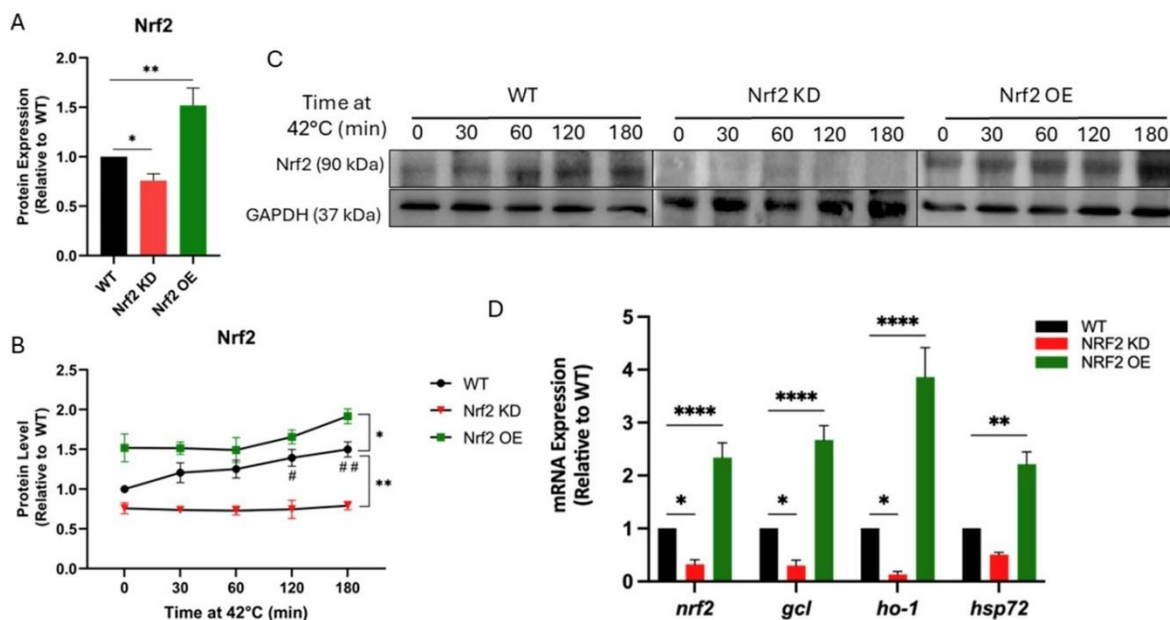
Both mitochondria and NOXs are considered to be major ROS producers in the cell (Averill-Bates, 2024; Mailloux, 2020; Sies et al., 2022; Vermot et al., 2021). To evaluate if these sources contributed to ROS production during severe heat stress at 42°C, cells were pre-treated with either the NOX inhibitor apocynin, or the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. ROS levels were then monitored through live cell imaging (Fig. 3.3, Fig. Suppl Fig. 3.S6A-3.6F). The effect of MitoQ on mitochondrial ROS levels was quite pronounced, with complete inhibition of the 49% increase in mitochondrial superoxide in normal cells after 180 min at 42°C (Fig. 3.3C, Suppl. Fig. 3.S6B, 3.S6D). Cellular superoxide levels increased by 76% during 3 h at 42°C (Fig. 3.3A, Suppl. Fig. 3.S6A), while treatment with MitoQ resulted in a smaller 54% increase, marking significant scavenging of 22% by MitoQ (Fig. 3.3A, Suppl. Fig. 3.S6C). MitoQ caused a 19% decrease in mitochondrial peroxide levels compared to untreated cells (Fig. 3.3D, Suppl. Fig. 3.S6B, 3.S6D), but did not reduce cellular levels of peroxides (Fig. 3.3B, Suppl. Fig. 3.S6A, 3.S6C). These results show that mitochondrial ROS contribute to increases in cellular ROS caused by heat stress at 42°C. MitoQ was more effective at scavenging mitochondrial superoxide compared to peroxides.

Treatment with apocynin caused significant scavenging of cellular superoxide (-106%) (Fig. 3.3E) and cellular peroxides (-58%) (Fig. 3.3F) after 180 min at 42°C compared to untreated cells (Suppl. Fig. 3.S6A, 3.S6E). This reduction in ROS levels by apocynin was also noted at the mitochondrial level with significant decreases in mitochondrial superoxide by 46% (Fig. 3.3G) and peroxides by 54% (Fig. 3.3H) (Suppl. Fig. 3.S6B, 3.S6F). This indicates that NOXs contribute to overall ROS production during severe heat stress at 42°C.

To determine the contribution of both potential ROS sources to initiation of cell death during severe heat stress at 42°C, the ability of MitoQ and apocynin to inhibit cell death was investigated. Interestingly, while

pre-treatments with both MitoQ and apocynin significantly scavenged cellular and mitochondrial ROS (Figs. 3.3A-3.3H), only MitoQ pre-treatment was able to significantly reduce cell death (Figs. 3.3I-3.3L). Caspase 9 activity in MitoQ-treated cells was about 20% lower compared to untreated cells during 3 h at 42°C, while apocynin had no effect (Fig. 3.3I). The same pattern was noted for caspase 3 activity, where MitoQ treatment decreased activity by 25 % during 180 min, while apocynin treatment had no effect (Fig. 3.3J). The inhibitory effect of MitoQ was confirmed for nuclear chromatin condensation (Fig. 3.3K). A quarter of untreated cells were apoptotic after 180 min at 42°C, while that number was significantly reduced to 15% by MitoQ. For cell viability, there was a significant increase from 71% to 81% in MitoQ-treated cells after 180 min (Fig. 3.3L). The antioxidants PEG-Cat and PEG-SOD caused similar inhibitory effects on caspase activation and apoptotic cell death as inhibition with MitoQ (Fig. 3.3M-3.3P). Apocynin treatment did not affect nuclear chromatin condensation or cell viability (Fig. 3.3K, 3.3L). Overall, these results indicate that while both mitochondria and NOXs contribute to ROS production during severe heat shock at 42°C, only mitochondrial ROS appeared to mediate cell death by apoptosis.

3.3.4 Modulation of Nrf2 expression impacts ROS production and cell death at 42°C



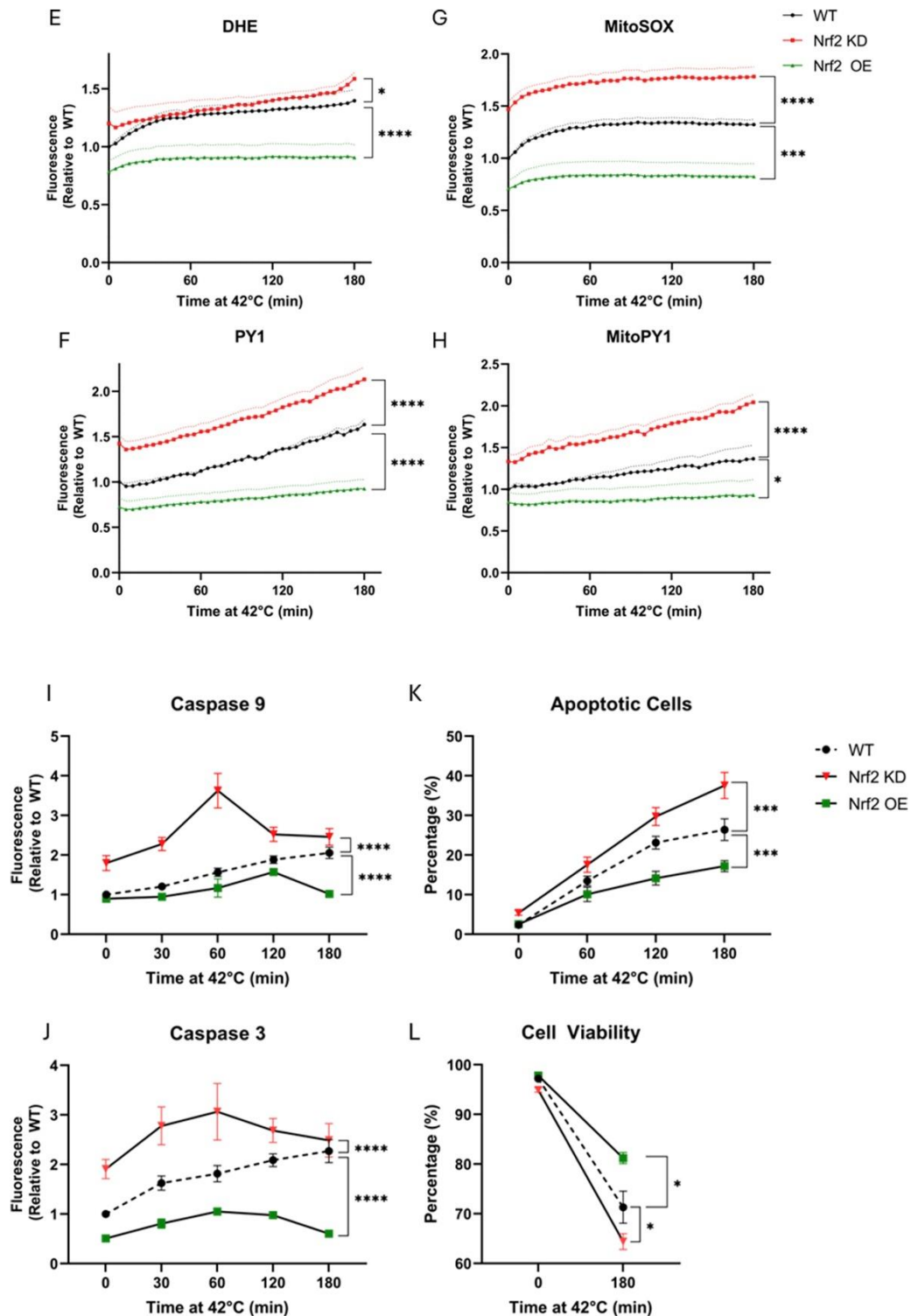


Figure 3.4 Altered Nrf2 expression impacts ROS levels and cell death during heat shock at 42°C. Nrf2 protein expression was determined in WT, Nrf2 Knockdown (Nrf2 KD), and Nrf2 overexpressor (Nrf2 OE) cells by Western blotting (n = 4) (A, C) (1.0, T = 0). The three cell types were heated at 42 °C for different times up to 180 min; Nrf2 protein levels are shown in representative gels with respective GAPDH loading controls (n = 4) (B, C). Nrf2 levels were expressed relative to unheated controls (1.0, T = 0). mRNA expression (n = 4–8) of *nrf2*, *ho-1*, *gcl*, and *hsp72* was determined by qRT-PCR in Nrf2 KD and OE cells, relative to WT cells (1.0) (D). Fluorescence for ROS levels was

collected by live cell imaging with a confocal microscope every 5 min. Cellular superoxide (n = 7) (E), cellular peroxides (n = 7) (F), mitochondrial superoxide (n = 6) (G), and mitochondrial peroxides (n = 6) (H) were expressed as fluorescence relative to unheated WT controls (1.0, T = 0). Caspase 9 (n = 9) (I) and caspase 3 (n = 9) (J) activities were expressed as fluorescence relative to unheated WT controls (T = 0). Apoptosis (n = 4) (K) was expressed as percentage of chromatin-condensed cells. Cell viability (n = 3) (L), analyzed at T = 0 min and T = 180 min by PI staining, was expressed as percentage of viable cells. Curves (dotted lines) for WT normal caspase 9 (I)/caspase 3 (J)/apoptosis (K)/viability (L) data are reused from [Fig. 1](#), and are from experiments that were conducted in parallel ([Suppl. Fig. S4](#)). Data was expressed as means $\pm$ SEM: # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. #: statistically significant difference between untreated WT control and different time points at 42 °C. *: statistically significant group difference between the WT control and treatment conditions (Nrf2 KD or Nrf2 OE) at 42 °C.

Previous reports established that Nrf2, the master regulator of the cellular antioxidant response, is a key determinant of cell fate when faced with various stressors (Averill-Bates, 2024; Esteras & Abramov, 2022; Glory & Averill-Bates, 2016; Grondin et al., 2024; Suzuki et al., 2023; Tchouagué et al., 2019; Zeb et al., 2021). It is therefore important to evaluate the impact of Nrf2 on both ROS production and scavenging, as well as cell survival during a severe heat shock at 42°C. Two cell lines, one overexpressing Nrf2 (Nrf2 OE) and one knocking it down (Nrf2 KD), were created to ascertain its effect. These cell lines were validated previously in our laboratory (Grondin et al., 2024; Hraoui et al., 2025). The basal protein expression of Nrf2 was 25% lower in Nrf2 KD cells and 52% higher in Nrf2 OE cells (Fig. 3.4A, 3.4C). During 180 min of heat stress at 42°C, Nrf2 levels increased significantly by 50% in wildtype (WT) and 91% in Nrf2 OE cells (Fig. 3.4B, 3.4C). In Nrf2 KD cells, Nrf2 levels did not increase at 42°C (Fig. 3.4B, 3.4C). As such, knocking down Nrf2 inhibited the increases caused by 42°C heat shock in WT and Nrf2 OE cells (Fig. 3.4B, 3.4C). The gene expression of Nrf2 and several of its gene targets were determined using qRT-PCR (Fig. 3.4D). mRNA levels of *nrf2*, *gamma cysteine ligase (gcl)*, *heme oxygenase-1 (ho-1)* and *hsp72* were decreased significantly in Nrf2 KD cells, while expression was higher in Nrf2 OE cells (Fig. 3.4D). When cells were heated at 40, 42 and 44°C, protein levels of Nrf2 increased significantly from 30 to 120 min, relative to time = 0 (Suppl. Fig. 3.S7A, 3.S7E, 3.S7I). Nrf2 levels increase more gradually with time at 40°C, compared to the higher temperatures. At 44°C, after an increase after 30 min, Nrf2 levels were decreasing, although they tended to remain higher than the control level (Suppl. Fig. 3.S7I). Confocal microscopy analysis showed that Nrf2 levels increased in the nucleus at 40 to 44°C, which was reflected by a significant increase in the Pearson's correlation coefficient between Nrf2 and nuclei (Suppl. Fig. 3.S7B, 3.S7F, 3.S7J) and pink fluorescence in cell nuclei (3.S7M, 3.S7N).

When WT cells treated with MitoQ, basal levels of Nrf2 protein increased in non-heated cells and remained higher after heating at 42°C (Suppl. Fig. 3.S7A). Similar results were obtained when MitoQ-treated cells

were heated at 40 and 44°C, although Nrf2 levels were tending to decrease with time at 44°C (Suppl. Fig. S7C, S7E). Nrf2 protein levels were also evaluated in cells treated with MitoQ or apocynin, but there were no significant differences compared to WT cells (data not shown).

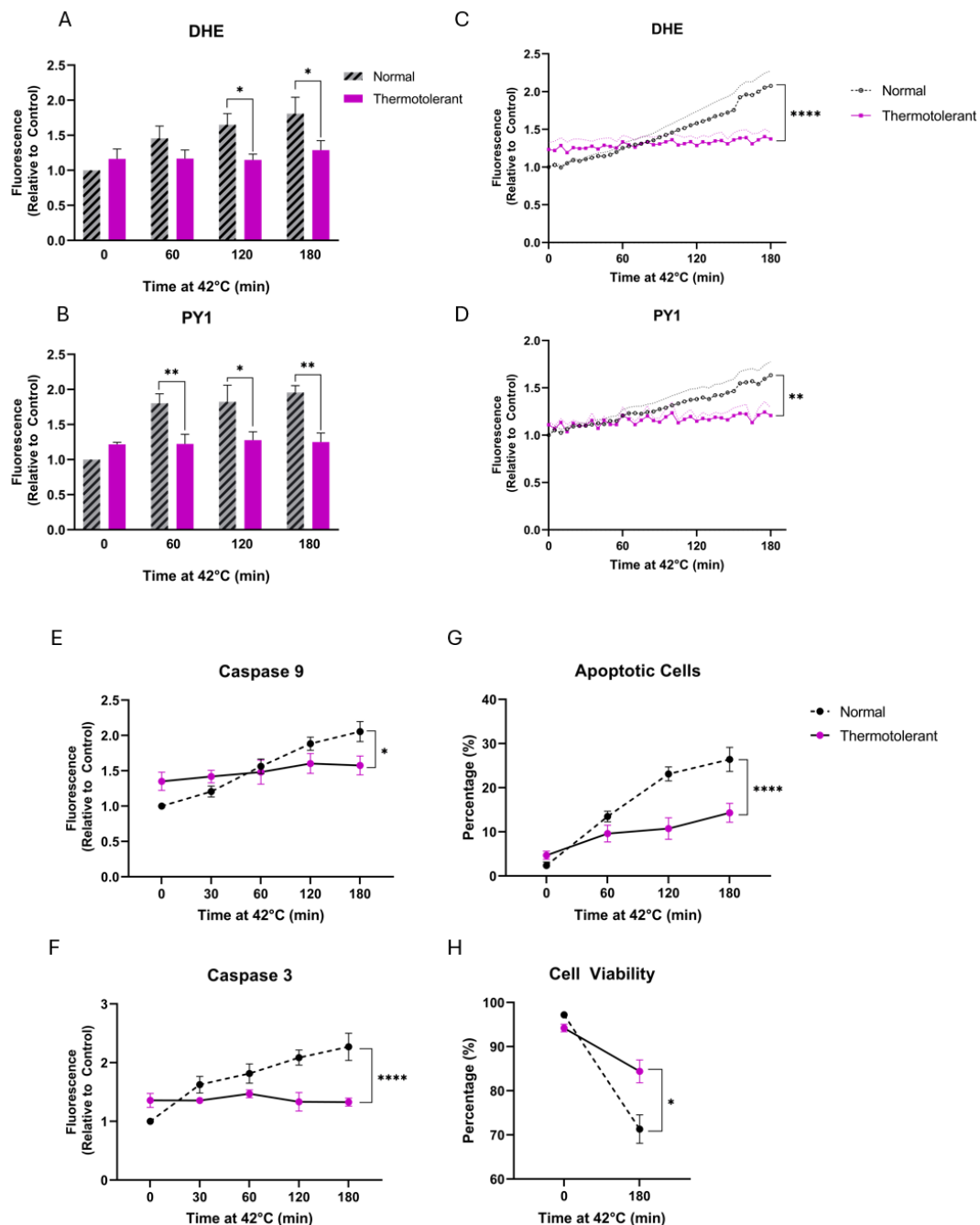
In Nrf2 KD cells, cellular and nuclear levels of Nrf2 were lower than in WT cells, and did not change during heating at 40, 42 and 44°C (Suppl. Fig. S7A-B, S7E-F, S7I-J). On the other hand, cellular and nuclear levels of Nrf2 were significantly higher in Nrf2 OE cells than in WT cells at all elevated temperatures (Suppl. Fig. 3.S7C-D, 3.S7H-I, 3.S7K-L, 3.S7M-N). At 40°C, there was a gradual increase in cellular Nrf2 levels with time (Suppl. Fig. 3.S7C-D). When Nrf2 OE cells were treated with MitoQ, Nrf2 protein levels were higher in non-heated cells at time = 0 (Fig. 3.S7C). The addition of MitoQ did not change cellular and nuclear Nrf2 levels in Nrf2 KD or Nrf2 OE cells during heating at these temperatures (Suppl. Fig. 3.S7A-3.S7J).

ROS production and cell death were evaluated during severe heat shock at 42°C in cells with altered levels of Nrf2. The basal levels (T = 0) of cellular and mitochondrial ROS were significantly higher in Nrf2 KD cells and were lower in Nrf2 OE cells (Fig. 3.4D-3.4G, Suppl. Fig. 3.S6G-3.S6J) compared to WT cells (Fig. 3.4D-3.4G, Suppl. Fig. 3.S6A-3.S6B). However, after 180 min at 42°C, levels of cellular superoxide in Nrf2 KD cells were 20% higher in comparison to WT cells (Fig. 3.4D), while cellular peroxide levels were 53% higher (Fig. 3.4E). This also translated to mitochondrial ROS, where superoxide was 47% higher after 180 min (Fig. 3.4F), and peroxides were 65% higher after 180 min (Fig. 3.4G) in Nrf2 KD cells relative to WT cells. On the other hand, there were only small increases in production of cellular and mitochondrial ROS in Nrf2 OE cells during heat shock at 42°C (Fig. 3.4D-3.4G, Suppl. Fig. 3.S6A-3.S6B, 3.S6I-3.S6J). This not only explicitly outlined the impact of altered Nrf2 expression on ROS scavenging, but it also provided evidence to surmise that Nrf2 mediates ROS production by acting upon mitochondrial dynamics.

With respect to cell fate during severe heat shock at 42°C, Nrf2 KD cells had significantly higher levels of caspase 9 activity (+45 %) (Fig. 3.4H), caspase 3 activity (+21%) (Fig. 3.4I) and apoptosis (+11.5%) (Fig. 3.4J), as well as lower cell viability (-7%) (Fig. 3.4K) relative to WT cells after 180 min. Peak levels of caspase 9 and -3 activity occurred after 60 min at 42°C. On the other hand, Nrf2 OE cells revealed significantly reduced activities of caspase 9 (-104 %) (Fig. 3.4H) and caspase 3 (-167 %) (Fig. 3.4I) in comparison to WT cells after 180 min at 42°C. Moreover, percentages of apoptotic cells were significantly lower (-9%) (Fig. 3.4J), while cell viability was significantly higher (+10 %) (Fig. 3.4K) after 180 min, relative to WT cells. Therefore, we could presume that the mediation of ROS production by Nrf2 levels can directly impact

determination of cell fate during severe heat shock at 42°C. This conclusion is supported by results from treatment of WT cells with PEG-SOD or PEG-CAT (Fig. 3.2A-3.2D), yielding similar decreases in ROS levels as obtained with overexpression of Nrf2.

3.3.5 Pretreatment of cells at 40°C confers thermotolerance that inhibits increased ROS production and activation of apoptosis at 42°C



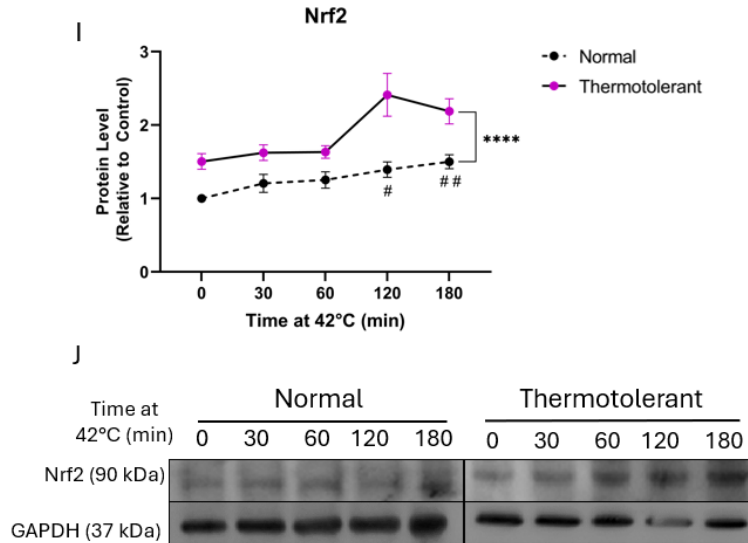


Figure 3.5 Pretreatment at 40°C confers thermotolerance that inhibits ROS production and protects cells against cell death at 42°C. Cells were pre-treated at 40°C for 3 h (Thermotolerant) prior to a subsequent heat shock at 42°C, compared to non-thermotolerant control cells. Cellular ROS were detected by flow cytometry (A-B) and using live cell imaging by confocal microscopy every 5 min (C-D) for up to 180 min. Cellular superoxide (n = 4) (A) (C) and cellular peroxides (n = 4) (B) (D) were expressed as fluorescence relative to unheated controls (1.0, T = 0). Curves for DHE (5C) and PY1 fluorescence (5D) for WT Normal cells are reused from Figs. 3.3E and 3.3F and are from the same experiments. Caspase 9 (n = 9) (E) and caspase 3 (n = 9) (F) activities were expressed as fluorescence relative to unheated controls (1.0, T = 0). Apoptosis (n = 4) (G) was expressed as percentage of nuclear chromatin-condensed cells. Cell viability (n = 3) (H) at T = 0 min and T = 180 min, assessed by PI staining, was expressed as percentage of viable cells. Curves for WT normal caspase 9 (E)/caspase 3 (F)/apoptosis (G)/viability (H) data (dotted lines) are reused from Figure 3.1 and are from experiments that were conducted in parallel (Suppl. Fig. 3.S4). Nrf2 protein expression in non-thermotolerant (normal) and thermotolerant cells (n = 4) (I) is shown in representative Western blots with GAPDH loading controls (J). Mean data for the WT Normal curve for Nrf2 expression (3.5I, dotted lines) is reused from Fig. 3.4B and is from experiments that were conducted in parallel (Suppl. Fig. 3.S4). Distinct Western blots are shown (5J). Data was expressed as means $\pm$ SEM: # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. # statistically significant difference between the untreated normal control (T = 0) and different time points at 42°C. *: statistically significant group difference between non-thermotolerant (normal) and thermotolerant cells at 42°C.

Cells were subjected to mild heat shock at 40°C for 180 min to induce thermotolerance. Together with normal, non-thermotolerant cells, they were exposed to severe heat shock at 42°C for up to 180 min. The ability of thermotolerance to decrease cellular ROS production was evaluated by flow cytometry (Fig. 3.5A, 3.5B) and live cell imaging (Fig. 3.5C, 3.5D, Suppl. Fig 3.S6A, 3.S6B, 3.S6K, 3.S6L). Initially, cellular ROS levels were slightly higher by 25-30% in thermotolerant cells relative to normal cells (T = 0). However, during 180 min at 42°C, ROS production increased in normal, non-thermotolerant cells, but did not increase in thermotolerant cells. During heating at 42°C, ROS production was significantly lower in thermotolerant

compared to normal cells. This was the case for both cellular superoxide (Fig. 3.5A, 3.5C) and peroxides (Fig. 3.5B, 3.5D).

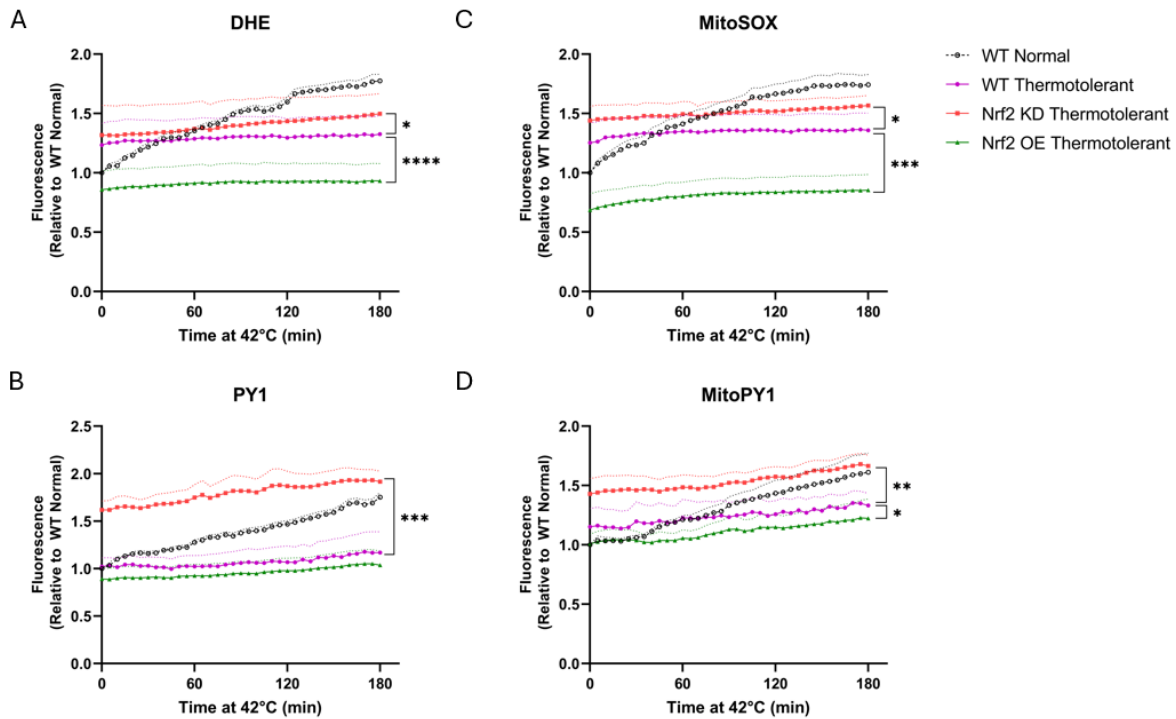
The ability of thermotolerance to protect against apoptotic cell death during severe heat shock at 42°C was monitored. Initially, activities of caspase 9 (Fig. 3.5E) and caspase 3 (Fig. 3.5F) were both 35 % higher in thermotolerant cells at T = 0 but did not increase during 180 min at 42°C, as occurred in non-thermotolerant cells. After 180 min at 42°C, enzymatic activities of caspase 9 and caspase 3, respectively, were significantly lower by 48% and 95% in thermotolerant cells, relative to normal, non-thermotolerant cells. The percentage of apoptotic cells with nuclear chromatin condensation increased significantly by about 25% in normal cells after 3 h at 42°C (Fig. 3.5G). However, levels of apoptosis in thermotolerant cells increased slightly at 42°C and were about 50% lower than in normal cells. Cell viability was significantly higher in thermotolerant cells (84.4%, vs 71% in normal cells) after 180 min at 42°C (Fig. 3.5H). Together, these results confirm the protective effect of thermotolerance, induced by mild heat shock at 40°C, against ROS production and apoptosis caused by toxic heat shock at 42°C.

Because Nrf2 was shown to mediate cell fate by protecting cells against toxic heat shock at 42°C (Fig. 3.4H-3.4K), Nrf2 levels were compared in mild thermotolerant versus normal cells (Fig. 3.5I, 3.5J). At T = 0, levels of Nrf2 were 50% higher in mild thermotolerant cells relative to normal cells. Nrf2 levels increased at 42°C and this difference was significantly larger after 180 min at 42°C, with thermotolerant cells having 78% higher levels of Nrf2 than normal cells (Fig. 3.5I, 3.5J). These results suggest that the decrease in ROS production and increase in cell survival conferred by a mild heat shock at 40°C may be dependent on Nrf2 levels.

3.3.6 Nrf2 expression regulates mild thermotolerance conferred by pre-treatment at 40°C

We next investigated whether levels of Nrf2 expression were critical to the protective effects of thermotolerance acquired through mild heat shock at 40°C. WT, Nrf2 KD, and Nrf2 OE cells were all heated at 40°C to induce thermotolerance. These three cell types were then exposed to severe heat shock at 42°C, and ROS production and cell death markers were monitored (Fig. 3.6). The production of cellular and mitochondrial ROS at 42°C was monitored via live cell imaging in thermotolerant WT, Nrf2 KD and Nrf2 OE cells following pre-treatment at 40°C (Fig. 3.6A-3.6D, Suppl. Fig. 3.S6M-3.S6P), compared to non-

thermotolerant, WT normal cells (Fig. 6, Suppl. Fig. 3.S6A-3.S6B). In all three thermotolerant cell types, only small increases in cellular and mitochondrial ROS levels occurred at 42°C, relative to their initial timepoint (T = 0). In contrast, ROS production increased at 42°C in WT normal cells (Fig. 3.6A-3.6D, Suppl. Fig. 3.S6A-3.S6B). Cellular and mitochondrial levels of superoxide (Fig 3.6A, 3.6C) and peroxides (Fig. 3.6B, 3.6D) were significantly higher in Nrf2 KD thermotolerant cells (Suppl. Fig. 3.S6M-3.S6N) relative to WT thermotolerant cells (Suppl. Fig. 3.S6K-3.S6L). Levels of cellular and mitochondrial superoxide (Fig. 3.6A, 3.6C) and peroxides (Fig. 3.6B, 3.6D) were significantly lower in Nrf2 OE cells (Suppl. Fig. 3.S6O, 3.S6P) compared to WT thermotolerant cells (Suppl. Fig. 3.S6K, 3.S6L).



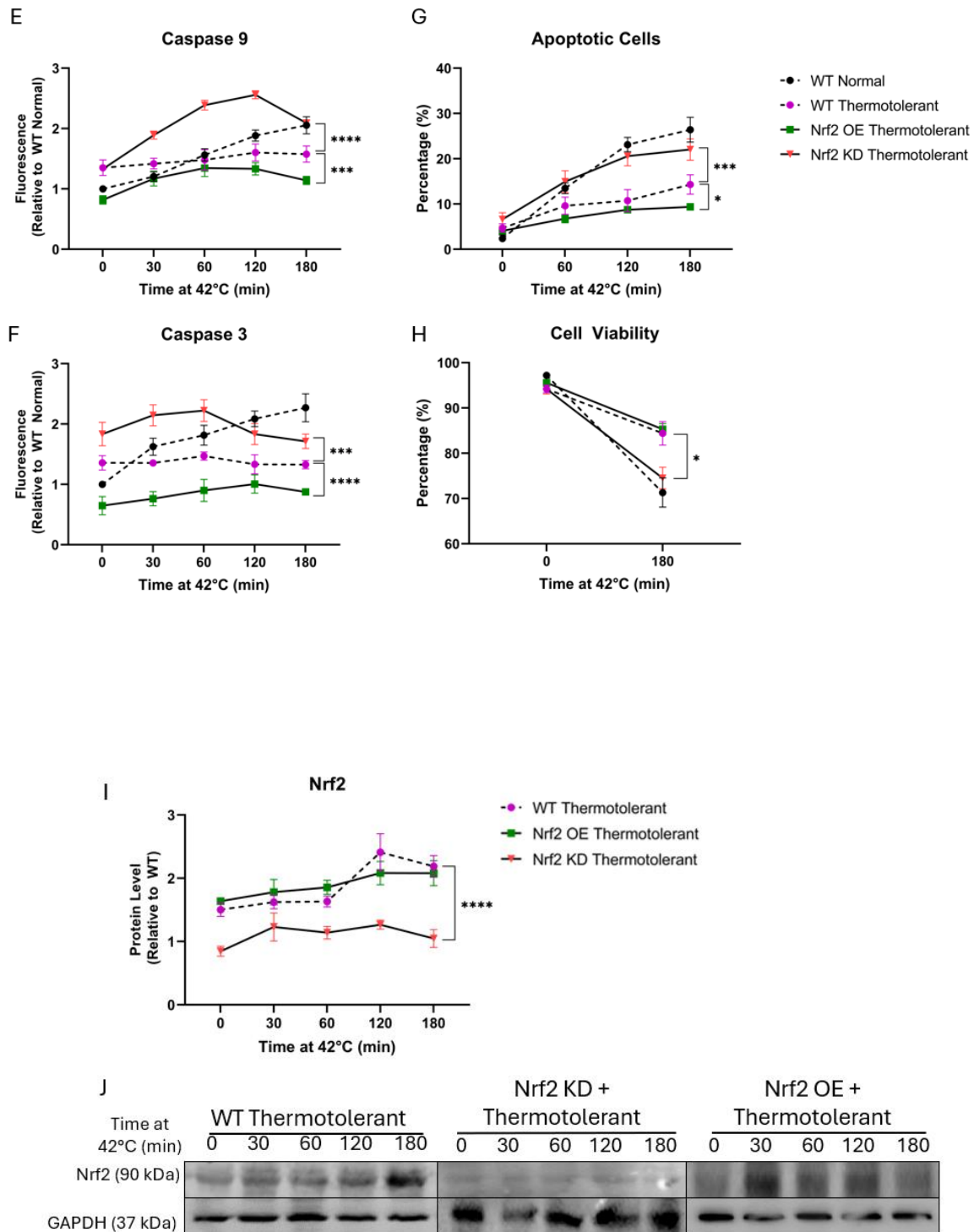


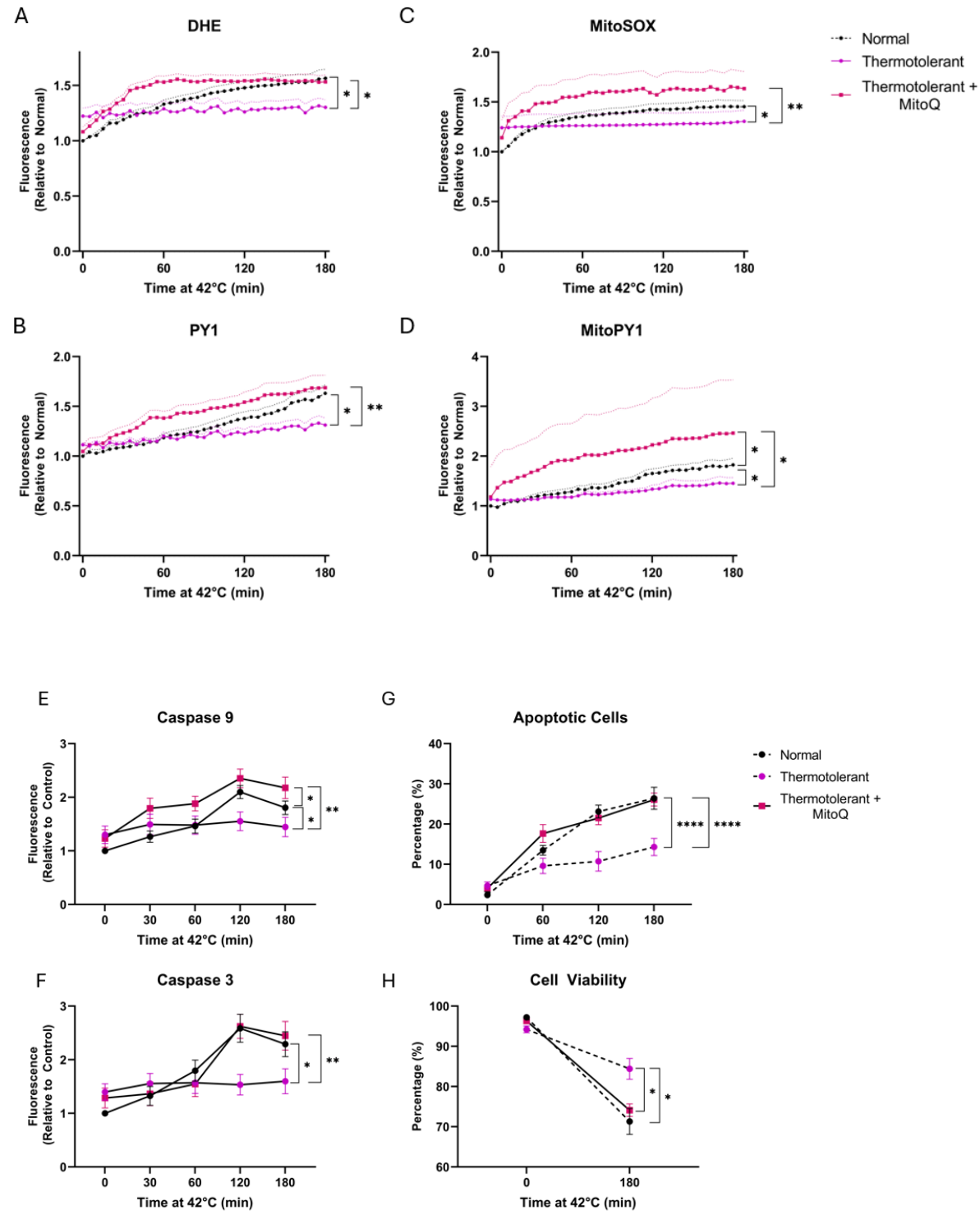
Figure 3.6 Nrf2 expression directly regulates the effectiveness of thermotolerance conferred by pre-treatment at 40°C. WT Thermotolerant, Nrf2 KD thermotolerant and Nrf2 OE thermotolerant cells were pre-treated at 40°C for 3 h prior to subsequent exposure to 42°C for 180 min. WT normal cells are presented as a referential frame and were not statistically analyzed in this experimental model. Cellular superoxide (n = 8) (A) and peroxides (n = 8) (B), and mitochondrial superoxide (n = 6) (C) and peroxides (n = 6) (D) were analysed by live cell imaging and expressed as

fluorescence relative to unheated WT normal cells (1.0, T = 0). Caspase 9 (n = 9) (E) and caspase 3 activities (n = 9) (F) were obtained by spectrofluorometry. Data was expressed as fluorescence relative to unheated WT normal cells (1.0, T = 0). Apoptosis (n = 4) (G) was assessed as percentage of nuclear chromatin-condensed cells. Cell viability (n = 3) (H) at T = 0 min and T = 180 min was expressed as percentage of viable cells. The curves for WT normal, non-thermotolerant cells from Fig. 3.5 were shown as a referential frame. Statistical analyses omitted them and only compared Nrf2 KD and Nrf2 OE cells pre-treated for 3h at 40°C (Nrf2 KD thermotolerant and Nrf2 OE thermotolerant) to WT thermotolerant cells. Data was normalized to WT normal cells at T = 0 (1.0). Curves for WT normal caspase 9 (E)/caspase 3 (F)/apoptosis (G)/viability (H) data are reused from Figure 1 and are from experiments that were conducted in parallel (Suppl. Fig. 3.S4). Representative images and GAPDH loading controls are shown for Nrf2 protein expression (n = 4) (I, J). For Nrf2 expression (3.6I, dotted lines), mean data for curves for the WT Normal and Thermotolerant cells is reused from Fig. 3.4B and is from experiments that were conducted in parallel (Suppl. Fig. 3.S4). Distinct Western blots are shown (6J, dotted lines). Data was expressed as means $\pm$ SEM: # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. #: statistically significant difference between WT thermotolerant cells and different time points at 42°C. *: statistically significant group difference between WT thermotolerant cells and treatment conditions (thermotolerant Nrf2 KD or Nrf2 OE) at 42°C.

The evaluation of cell death markers during a 180 min heat shock at 42°C (Fig. 3.6E-3.6H) revealed that Nrf2 KD thermotolerant cells had significantly higher activities of caspase 9 (+52 % after 180 min) (Fig. 3.6E) and caspase 3 (+40 % after 180 min) (Fig. 3.6F), a higher percentage of apoptotic cells (+8 %) (Fig. 3.6G), and lower cellular viability (-10 %) (Fig. 3.6H) compared to WT thermotolerant cells. In Nrf2 OE thermotolerant cells, caspase 9 (-43% after 180 min) (Fig. 3.6E) and caspase 3 activities (-47 % after 180 min) (Fig. 3.6F), and the percentage of apoptotic cells (-5%) (Fig. 3.6G) were lower relative to WT thermotolerant cells, while cell viability was similar (Fig. 3.6H).

Subsequently, Nrf2 levels were evaluated in these three thermotolerant cell lines to determine if the differences in ROS levels and cell death could be associated with differential levels of Nrf2 (Fig. 3.6I, 3.6J). Nrf2 levels were significantly lower in Nrf2 KD thermotolerant cells relative to WT thermotolerant cells during 180 min at 42°C (-66 % at T = 0; -114 % at T = 180) (Fig. 3.6I, 3.6J). However, Nrf2 levels were not significantly different between Nrf2 OE thermotolerant cells and WT thermotolerant cells, (Fig. 3.6I, 3.6J). This indicates that some other process resulting from initial Nrf2 overexpression may be responsible for the improvement in cell death markers in Nrf2 OE thermotolerant cells (Fig. 3.6E-3.6H). Overall, the modulation of Nrf2 levels seems to significantly impact the protective ability of thermotolerance conferred by pre-treatment at 40°C for 3 h and portrays Nrf2 as an essential factor in this process.

3.3.7 Attenuation of mitochondrial ROS before pre-treatment at 40°C reverses the protective effect of thermotolerance at 42°C



fluorescence relative to unheated normal cells (1.0, T = 0). Caspase 9 (n = 9) (E, I) and caspase 3 activities (n = 9) (G, J) were obtained by spectrofluorimetry and expressed as fluorescence relative to unheated controls (1.0, T = 0). Apoptosis (n = 4) (G) was expressed as percentage of nuclear chromatin-condensed cells. Cell viability (n = 3) (H, K) T = 0 min and T = 180 min was expressed as percentage of viable cells. Curves for WT normal apoptosis (G)/viability (H, K) data are reused from Figure 3.1, and are from experiments that were conducted in parallel (Suppl. Fig. 3.S4). Representative Western blotting images and GAPDH loading controls are shown for Nrf2 protein expression (M, N) (n = 4). For Nrf2 expression (3.7M, dotted lines), mean data for curves for the WT Normal and Thermotolerant cells is reused from Fig. 3.4B and is from experiments that were conducted in parallel (Suppl. Fig. 3.S4). Distinct Western blots are shown (3.7N). Data was expressed as means $\pm$ SEM: # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. #: statistically significant difference between normal cells and different time points at 42°C. *: statistically significant group difference between normal versus thermotolerant cells, or between thermotolerant cells $\pm$ MitoQ or antioxidants, at 42°C.

After confirming Nrf2 as a key component in mild thermotolerance induced at 40°C, we aimed to study its redox-based activation. It is well known that Nrf2 activation is highly linked to ROS (Averill-Bates, 2024). However, it is not clear if ROS from distinct sources could play divergent roles in the Nrf2-dependent activation of thermotolerance. As such, we investigated the role of mitochondria- and NOX-derived ROS in the acquisition of thermotolerance by use of apocynin and MitoQ. Pre-treatment of thermotolerant cells with MitoQ significantly increased ROS production at 42°C compared to untreated thermotolerant cells (Fig. 3.7A-3.7D, Suppl. Fig. 3.S6Q, 3.S6R). This was the case for both mitochondrial and cellular ROS. Indeed, thermotolerant cells had significantly lower levels of ROS production than either non-thermotolerant WT normal or thermotolerant + MitoQ cells after 180 min at 42°C. These results suggest that MitoQ treatment hampered induction of thermotolerance at 40°C, leading to increased ROS production during severe heat stress at 42°C. In contrast, pre-treatment of cells with apocynin prior to a 3 h mild heat shock at 40°C had no impact on ROS production or cell death markers during subsequent heat shock at 42°C, relative to untreated thermotolerant cells (data not shown).

Subsequently, the effect of MitoQ on cell death markers in thermotolerant cells was evaluated during heat shock at 42°C (Fig. 3.7E-3.7H). Caspase 3 activity, the percentage of apoptotic cells, and cell viability in thermotolerant cells pre-treated with MitoQ were not significantly different compared to normal cells (Fig. 3.7F-3.7G, 3.7H). Caspase 9 activity was higher (+37 % after 180 min) in thermotolerant cells treated with MitoQ compared to normal cells (Fig. 3.7E). Thus, MitoQ reversed the protective effect of thermotolerance against 42°C heat shock-induced cell death. These results suggest that ROS of mitochondrial origin were critical to the acquisition of thermotolerance. When mitochondrial ROS were eliminated by MitoQ, thermotolerance did not develop. To eliminate the possibility of an off-target effect resulting from MitoQ treatment in thermotolerant cells, cell death markers were also evaluated in thermotolerant cells pre-

treated with PEG-SOD or PEG-CAT (Fig. 3.7I-3.7K). We hypothesized that if mitochondrial ROS were essential for the development of thermotolerance, then attenuating ROS levels would yield similar results to MitoQ treatment by reversing thermotolerance. Our prediction was confirmed because pre-treatment with PEG-CAT or PEG-SOD prior to mild heat shock at 40°C resulted in higher activities of caspase 9 and caspase 3 at T = 0 relative to thermotolerant cells (Fig. 3.7I, 3.7J). Furthermore, after 180 min at 42°C, cells pre-treated with PEG-SOD had 86 % higher caspase 9 activity (Fig. 3.7I) and 40 % higher caspase 3 activity (Fig. 3.7J) relative to thermotolerant cells. PEG-CAT-treated cells had 79 % higher caspase 9 activity (Fig. 3.7I), and 46 % higher caspase 3 activity (Fig. 3.7J) compared to thermotolerant cells. Cell viability was also significantly diminished when cells were pre-treated with either PEG-SOD (-12 % after 180 min) or PEG-CAT (-9 % after 180 min) prior to mild heat shock at 40°C (Fig. 3.7K). These results show that inhibition of ROS with MitoQ, PEG-SOD or PEG-CAT reversed the development of thermotolerance by mild heat shock at 40°C. In addition, pre-treatment with MitoQ attenuated the elevated Nrf2 levels that were obtained in thermotolerant cells, resulting in Nrf2 levels that were not significantly different from those in normal cells (Fig. 3.7M, 3.7N). Taken together, these results support the hypothesis that mitochondrial ROS are a critical signal required to initiate the acquisition of Nrf2-dependent thermotolerance by mild heat shock at 40°C. However, the possible contribution of other cellular sources of ROS cannot be ruled out.

3.4 Discussion

The novelty of this study is that cellular ROS levels increased during severe heat shock at 42°C and were found to be produced mainly from mitochondria and NOXs. However, only mitochondrial ROS were responsible for the increase in apoptotic cell death caused by the 42°C heat shock. In general, cellular ROS production was mediated by levels of Nrf2 expression. When Nrf2 was knocked down, there was an increase in ROS production and apoptosis in cells at 42°C. On the other hand, Nrf2 overexpression resulted in lower ROS levels that resulted in increased cell survival. It should be noted that different heating times at 42°C can affect cellular outcome. It was previously reported that shorter heating times at 42°C (< 1h) can activate survival responses like autophagy in HeLa and C33 A cervical cancer cells (Kassis et al., 2021). Longer heating times (1 to 3h) at 42°C led to cell death by apoptosis.

In this study, 42°C was selected as a cytotoxic temperature, because hyperthermia cancer treatments generally rely on exposure to temperatures that are in the range of 40 to 43°C (Crezee et al., 2021). When heating tumors in the clinic, it is more difficult to achieve higher temperatures like 45°C throughout the entire tumor volume. Moreover, 42 to 44°C is a more common target to achieve for sensitizing tumors to

radiotherapy and/or chemotherapy while still inducing tumor cell death (Ademaj *et al.*, 2022). As such, to mimic therapeutic administration while inducing cytotoxicity, the temperature for our study was set at 42°C.

The acquisition of mild thermotolerance by pre-treatment of cells at 40°C for 3 h improved cell survival in the context of lethal heat stress at 42°C and was accompanied by an increase in Nrf2 levels. The modulation of Nrf2 expression via knockdown or overexpression significantly affected the protective capability of thermotolerance acquired at 40°C. Firstly, Nrf2 KD undermined the protective capability of thermotolerance: Nrf2 levels decreased, while activation of apoptotic cell death at 42°C increased. Secondly, when Nrf2 was overexpressed in thermotolerant cells, cell survival was further enhanced. Finally, administration of the mitochondrial antioxidant MitoQ prior to pre-treatment at 40°C significantly reversed the protective effect of thermotolerance. The NOX inhibitor had no effect. Herein lies the novelty of this study, because we were able to properly demonstrate that ROS from mitochondria were essential in mediating the acquisition of thermotolerance during a pre-treatment at 40°C, while ROS derived from NOX may not be as critical. Therefore, mitochondrial ROS may represent a future therapeutic target in the context of blocking hyperthermia-based thermotolerance.

3.4.1 Heat shock at 42°C causes a ROS-dependent increase in cell death

Cellular levels of superoxide and peroxides increased during severe heat shock at 42°C. Furthermore, ROS production evaluated at the mitochondrial level showed a similar pattern of increase. Mitochondria are thought to contribute to 90% of basal ROS (Gardiner *et al.*, 2020; Skulachev, 2012). Therefore, it is highly likely that mitochondrial ROS contributed to the increase in cellular ROS. Inhibition of cellular ROS by MitoQ confirmed this idea. Fluorescence from cellular ROS probes DHE and PY1, and their mitochondrial derivatives, MitoSOX and MitoPY1, during heat stress at 42°C was reduced by respective treatment with cell-permeable antioxidants PEG-SOD or PEG-CAT. This indicates that the increase in fluorescence during heat stress at 42°C can be attributed to accumulation of pro-oxidants. It is not known if PEG-SOD and PEG-CAT can penetrate the outer mitochondrial membrane (OMM), and they may remain in the cytosol. Cellular transport processes of many molecules are increased at elevated temperatures between 37 and 45°C (Bates et Mackillop, 1985, 1986). H₂O₂ can diffuse from its sites of production within cells, including mitochondria and the cytoplasmic membrane, and cross cellular membranes through aquaporin channels (Bienert et Chaumont, 2014). Transport of H₂O₂ from mitochondria into the cytosol would be

increased at higher temperatures like 42°C. Therefore, H₂O₂ in the cytosol would be accessible for elimination by PEG-CAT. Changes in OMM fluidity would likely occur at elevated temperatures like 42°C. Remodeling of mitochondrial lipid composition due to temperature has already been shown to influence OMM fluidity in mammals (Pan *et al.*, 2014), and changes in membrane fluidity can affect or be affected by stress responses to heat in tumors (Csoboz *et al.*, 2013). Furthermore, depolarization of the mitochondrial membrane, which directly affects membrane fluidity, has been shown to occur due to heat shock in HeLa and Chinese hamster ovary cells (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Yang *et al.*, 2010b).

Cell death by apoptosis occurred after as little as 1 h during severe heat shock at 42°C in HeLa cells, in agreement with our previous work (Kassis *et al.*, 2021). For shorter exposure times from 15 to 30 min at 42°C, the stress response was mediated by transient increases in autophagy as a survival response, rather than apoptosis. There was a rapid switch from autophagy to cell death by apoptosis after 30 min at 42°C (Kassis *et al.*, 2021). In this study, the induction of apoptosis was revealed by activation of caspases 9 and -3, nuclear chromatin condensation from 30 to 180 min at 42°C, and loss of cell viability. The inhibition of Caspase-dependent cell death was diminished by PEG-SOD and PEG-CAT, implicating ROS as inducers of apoptosis during severe heat shock at 42°C. Interestingly, the induction of autophagy during shorter exposure times (15-30 min) at 42°C was also mediated by ROS signaling (Kassis *et al.*, 2021). Cell-permeable PEG-CAT and SOD mimetic Mn (III)tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin Chloride (MnTBAP) both inhibited 42°C heat shock-induced increases in autophagy markers, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) and acidic vesicular organelles.

The origin of the increased ROS production in cells at 42°C was ascertained using the NOX inhibitor apocynin and mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ. The scavenging of cellular and mitochondrial ROS by MitoQ and apocynin indicated that 42°C heat shock increased ROS production from both mitochondria and membrane NOXs. MitoQ is a derivative of ubiquinone; its antioxidant quinone moiety is conjugated to a lipophilic triphenylphosphonium cation by a 10-carbon alkyl chain (Gottwald *et al.*, 2018; Smith et Murphy, 2010). For MitoQ, mitochondrial ROS are its specific target (Smith et Murphy, 2010), and its inhibitory effect on mitochondrial ROS production at 42°C was expected. A surprising result was the efficient capacity of apocynin to scavenge mitochondrial ROS. Apocynin, however, prevents assembly of NOX by binding to its p47phox sub-unit (Yu *et al.*, 2008), which is present in all seven isoenzymes (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, dual oxidase-1 (Duox1) and Duox2). HeLa cells contain NOX1, NOX2 and NOX4, with a possibility of NOX5 present as well (Muthuramalingam *et al.*, 2020). NOXs can be localized to the

membranes of mitochondria, the endoplasmic reticulum, the nucleus and the cytoplasmic membrane (Block *et al.*, 2009; Kuroda *et al.*, 2010). It is therefore possible that the inhibitory effect of apocynin on mitochondrial ROS production relies on preventing assembly of NOX at the OMM. Another hypothesis posits that apocynin strengthens mitochondrial antioxidant capacity by stimulating gamma cysteine ligase production via induction of transcription factor activator protein-1 (AP-1), thus increasing levels of glutathione. This has been shown in alveolar epithelial cells (Ben-Shaul *et al.*, 2001). In our study, it is difficult to distinguish between both these possibilities. While our results show that both NOX and mitochondria contribute to the ROS pool during severe heat shock at 42°C, we cannot assert that ROS are produced exclusively from those two sources. Although mitochondria and NOXs are major sites of cellular ROS production (Averill-Bates, 2024; Mailloux, 2020; Skulachev, 2012), there are currently 41 known sites of ROS production, which can include, but are not limited to, flavin-centered oxidases in peroxisomes and the endoplasmic reticulum, β -oxidation of fatty acids in peroxisomes, xanthine oxidase, uncoupled nitric oxide synthase, myeloperoxidase, cytochrome P450, cyclooxygenase, and lipoxygenase (Averill-Bates, 2024; Görlach *et al.*, 2015; Sies et Jones, 2020). Even deficiencies in other cellular systems, like calcium signaling, can increase ROS production by modulating previously mentioned sources (Görlach *et al.*, 2015). However, we chose to investigate the role of NOXs and mitochondria due to their immense proportional contribution to the cellular ROS pool.

Although both MitoQ and apocynin efficiently scavenged mitochondrial and cellular ROS production during severe heat shock at 42°C, only MitoQ treatment inhibited the induction of apoptotic cell death. This discrepancy between apocynin and MitoQ, with respect to cell death inhibition, suggests that apocynin may scavenge mitochondrial ROS indirectly, because reduction in mitochondrial ROS production arising from MitoQ treatment led to an improvement in cell survival, while scavenging of mitochondrial ROS with apocynin did not. It is possible that the improvement in cell survival by MitoQ administration is the result of an off-target effect that is independent of its ROS-quenching capabilities. MitoQ has been shown to have adverse effects. It caused rapid swelling and depolarization of mitochondria in kidney proximal tubule cells (Gottwald *et al.*, 2018). The mechanism was not related to its antioxidant activity and was thought to be caused by increased inner mitochondrial membrane (IMM) permeability due to insertion of the alkyl chain (Gottwald *et al.*, 2018). However, similar to MitoQ, antioxidant treatment with PEG-SOD or PEG-CAT led to improved cell survival at 42°C. This supports that idea that MitoQ diminishes cell death by quenching mitochondrial ROS, and that apocynin exerts indirect quenching of mitochondrial ROS that does not improve cell survival.

3.4.2 Transcription factor Nrf2 impacts cell death by mediation of ROS during severe heat shock at 42°C

The accumulation of ROS is known to cause changes in the redox state of the cell, which are responsible for activation of Nrf2 (Suzuki *et al.*, 2023; Averill-Bates, 2024; Ngo & Duennwald, 2022). Nrf2 can be activated by a wide variety of stressors like electrophilic stresses (Suzuki *et al.*, 2023), mild non-toxic heat shock at 40°C (Glory & Averill-Bates, 2016; Grondin *et al.*, 2024), heavy metals (Emami *et al.*, 2022) and pathogens (Deramautd *et al.*, 2013). To our knowledge, the induction of increased levels of Nrf2 by severe heat shock at 42°C was not previously demonstrated. As the master regulator of the antioxidant response, protein levels of Nrf2 were expected to mediate cellular levels of ROS. This was indeed the case because knock down of Nrf2 led to increased levels of cellular and mitochondrial ROS during heat shock at 42°C, while overexpression of Nrf2 gave rise to decreased ROS levels. When protein levels of Nrf2 were altered, there appeared to be a link between changes in ROS levels and apoptotic cell death. Cell death increased in Nrf2 KD cells, while cell survival improved when Nrf2 was overexpressed. Treatment with antioxidants PEG-SOD and PEG-CAT resulted in a similar reduction of cell death as Nrf2 overexpression. We posit, therefore, that Nrf2 overexpression attenuates cell death by reducing ROS levels, while, contrarily, knocking down Nrf2 exacerbates cell death by increasing ROS levels. Because both mitochondrial and cellular ROS levels decreased or increased in similar patterns through modulation of Nrf2 expression, our data also suggests that Nrf2 can improve cell survival at 42°C through quenching of mitochondrial ROS.

In this study, Nrf2 was shown to have a significant impact on the protective effect of thermotolerance against cytotoxicity at 42°C. Regarding the role of Nrf2 in other cancer cell types, including, hyperthermia activated Nrf2 at 38.5 to 43°C triggered Nrf2 activation in breast and nonsmall cell lung cancer (Xie *et al.*, 2020). Knockdown of Nrf2 in these cell models increased ROS accumulation and enhanced hyperthermia-induced cell death, whereas intact Nrf2 signaling protected cells against heat-induced apoptosis.

3.4.3 Protective ability of mild thermotolerance (induced at 40°C) against severe heat shock at 42°C correlates with levels of Nrf2

The pre-treatment of cells with mild heat stress at 40°C has been shown to induce a protective effect towards subsequent lethal heat shocks (e.g. $\geq 41.5^\circ\text{C}$) by activation of a cellular adaptive survival response (Glory & Averill-Bates, 2016; Glory *et al.*, 2014; Grondin *et al.*, 2024). Thermotolerance induced at 40°C is a non-cytotoxic response. The induction of thermotolerance at higher temperature like 42°C causes

cytotoxicity (Przybytkowski *et al.*, 1986). Also, at higher temperatures, protein synthesis ceases for several hours, beyond which thermotolerance develops. This thermotolerance response is different from that occurring at 40°C where protein synthesis continues (Przybytkowski *et al.*, 1986). Our results confirm that development of thermotolerance by pre-treatment at 40°C does indeed improve cell survival when faced with subsequent severe heat shock at 42°C. Further, analyses showed that basal levels of cellular ROS were elevated in thermotolerant cells, relative to non-thermotolerant cells. However, during heat shock at 42°C, ROS levels did not increase further in thermotolerant cells and appeared to be linked to inhibition of apoptosis.

Nrf2 has been shown to be crucial in mediating the cellular adaptive response in response to mild heat stress at 40°C (Glory & Averill-Bates, 2016; Grondin *et al.*, 2024). This study shows that Nrf2 levels were higher in thermotolerant versus non-thermotolerant cells. To validate the role of Nrf2 in acquiring thermotolerance by mild heat stress at 40°C, we rendered WT, Nrf2 KD, and Nrf2 OE cells thermotolerant by preconditioning cells at 40°C for 3 h, prior to subsequent exposure to severe heat shock 42°C. By modulating Nrf2 expression, the protective effect of thermotolerance was enhanced in preconditioned, thermotolerant Nrf2 OE cells and reduced in preconditioned, thermotolerant Nrf2 KD cells. Cellular and mitochondrial ROS levels were higher in preconditioned, thermotolerant Nrf2 KD cells than in WT thermotolerant cells, while there was a sharp decrease in cell survival. On the contrary, preconditioned thermotolerant Nrf2 OE cells had lower levels of ROS and higher cell survival than WT thermotolerant cells. These results confirm that Nrf2 was essential in mediating the acquisition of thermotolerance by mild, non-lethal heat stress at 40°C. However, it is possible that factors other than Nrf2 in thermotolerant Nrf2 OE cells may promote the enhanced cell survival at 42°C. These factors could include, but are not limited to, enhancement of autophagy, and/or increases in levels of Nrf2 gene targets like catalase, manganese SOD, heme oxygenase 1, gamma cysteine ligase or HSP 72 (Grondin *et al.*, 2024). Whatever the case, initial overexpression of Nrf2 enhances the cellular adaptive response, while knocking it down hampers it, outlining the pivotal regulatory effect of Nrf2 in acquiring thermotolerance by mild heat shock at 40°C.

Our experiments have shown that Nrf2 is vital in mediating cellular resistance to heat-based stress in a mitochondrial-dependent manner. We have also shown that Nrf2 abundance is directly correlated with the induction of heat-related cell death. While it is well known that Nrf2 mediates stress responses and survival in both noncancerous and cancerous cells (Ngo & Duennwald, 2022), our work adds to the growing body of literature by outlining its ROS-dependent role in acquiring resistance to hyperthermia treatments.

However, it is important to note that targeting Nrf2 in a therapeutic manner to reduce heat resistance represents quite the medical challenge. Nrf2 is implicated in such a broad spectrum of cell mechanisms, from antioxidant responses, to metabolism, to autophagy, etc. (Ngo & Duennwald, 2022). This makes targeting Nrf2 to reduce thermotolerance extremely difficult without eliciting a host of potential side-effects. These effects may include, but are not limited to increased systemic oxidative damage, unrestricted inflammation by de-repressing nuclear factor-kappa B (NF- κ B), as well as increased damage to otherwise healthy tissues (Lin *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023a). These side-effects induced by targeting Nrf2 outline the importance of targeting parallel systems that interact with Nrf2 to reduce potential side effects. Our experiments outline the role of mitochondrial ROS as an Nrf2 activator in the context of acquired thermotolerance. Targeting these heat-generated ROS instead of Nrf2 may present a therapeutic blueprint yielding significantly less off-target effects.

3.4.4 Attenuation of mitochondrial ROS reverses Nrf2-dependent thermotolerance

Our previous work suggested that induction of mild thermotolerance may require both a functional Nrf2 pathway as well as mitochondrial ROS during pre-conditioning at 40°C to be fully activated and promote cell survival during a subsequent toxic stress (Hraoui *et al.*, 2025). By knocking down Nrf2, we effectively hampered the acquisition of a cellular adaptive response by mild heat stress at 40°C. To confirm the above hypothesis, cells were treated with MitoQ to attenuate mitochondrial ROS prior to preconditioning at 40°C for 3 h. By subtracting mitochondrial ROS from the signaling equation during mild heat stress at 40°C, we found that exposure to subsequent severe heat shock at 42°C was as lethal in thermotolerant cells treated with MitoQ as in non-thermotolerant control cells. Further, cellular and mitochondrial ROS levels in MitoQ-treated thermotolerant cells at 42°C were significantly higher than in thermotolerant cells. This increase in oxidative stress, resulting from an absence of mitochondrial ROS signaling due to MitoQ, also impeded cell survival, as noted by an increase in apoptotic cell death, relative to thermotolerant cells. If this effect was due to the absence of ROS signaling and not an off-target effect of MitoQ, then treatment with other antioxidants prior to conditioning at 40°C would yield the same effect. Indeed, treatment with PEG-SOD or PEG-CAT, prior to mild heat stress at 40°C, yielded similar increases in apoptotic cell death during severe heat shock at 42°C as MitoQ treatment. This suggests that the inhibitory effect of MitoQ on development of thermotolerance was dependent on its ROS-quenching capabilities. Moreover, concentration assays with MitoQ at 42°C demonstrated that the concentration utilized (300 nM) was quenching ROS and did not result in de facto pro-oxidant activity (Suppl. Fig. 3.S1).

While MitoQ possesses a stimulatory effect on Nrf2 levels, putatively through downregulation of Keap1 (Hu *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018), our study indicates that attenuation of mitochondrial ROS had a more impeding effect on Nrf2 expression than the potential stimulation caused by MitoQ. This agrees with a previous study that reported a reduction in Nrf2 levels due to administration of MitoQ in female granulosa cells exposed to H₂O₂ (Tsui & Li, 2023). This reduction in Nrf2 levels, in our study, is directly caused by the attenuation of mitochondrial ROS signaling and effectively reverses the acquisition of thermotolerance by mild heat stress at 40°C.

While our experiments have outlined the role of mitochondrial ROS in Nrf2-based thermotolerance, other sources of ROS may indeed play a significant role in this phenomenon as well (Hong *et al.*, 2024). ROS produced from ER stress, peroxisomes, or even autoxidation of flavins, quinols, and iron cofactors, may contribute to Nrf2 activation during oxidative stress in various cell types, leading to increased survival (Hong *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2019). Because these different sources of ROS may significantly contribute to the total ROS pool depending on the cell type and nature of the occurring stress, investigating their contribution during heat stress may reveal a more nuanced understanding of Nrf2 redox signaling occurring from non-canonical ROS sources in the context of hyperthermia-based anticancer treatments.

While we only experimentally validated the mitoROS-Nrf2 axis in HeLa cells, these findings should be investigated in other cancer cell line models, as responses to heat stress may vary significantly by the type of cancer (Scutigliani *et al.*, 2022). We previously showed in the same tissue type that mild heat shock at 40°C increased ROS production and induced thermotolerance in C33 A cervical cancer cells. (Kassis *et al.*, 2021). Moreover, even cancer cell lines derived from the same organ may exhibit differential responses to heat (Kanamori *et al.*, 2025). However, since most solid cancers are derived from epithelial cells, which line most organs of the body, we could expect to observe similar patterns regarding the mitoROS-Nrf2 thermotolerance axis in epithelial cells derived from breast, lung, prostate, and colorectal cancers (Lin *et al.*, 2023; Okon *et al.*, 2015). Mitochondrial ROS have previously been shown to mediate resistance to various anticancer drugs in multiple cancer cell lines (Okon & Zhou, 2015; Das, 2023; Lyakhovich, & Leonart, 2016). As such, there is precedence for mitochondrial-based resistance signaling, and our findings may be reproducible in other cancer lines (Das, 2023; Lyakhovich *et al.*, 2016).

3.4.5 Limitations of the study

The limitations of this study are influenced by the reagents and fluorescent probes used. Both apocynin, the NOX inhibitor, and MitoQ, the mitochondrial antioxidant, have been shown to have limitations that must be considered when interpreting the data. Firstly, apocynin may reduce ROS in endothelial and vascular smooth muscle cells by selectively targeting peroxides, but not superoxide (Heumüller *et al.*, 2008). While HeLa cells are epithelial, it is possible that a similar effect may be observed, wherein apocynin acts as direct, rather than indirect, antioxidant. Thus, interpretation of the ROS quenching effect of apocynin must keep the potential secondary and off-target effects in mind (Chocry & Leloup, 2020).

MitoQ is extremely selective towards mitochondria in its ROS quenching. However, it was previously shown that MitoQ may stimulate Nrf2 activity by interfering in its binding towards Keap1 via reduction of Keap1 levels. This reduces its ability to orchestrate proteasomal degradation of Nrf2, allowing Nrf2 to enter the nucleus and bind to ARE (Zhou *et al.*, 2018). The enhanced activation of Nrf2, while not particularly noted in our results with MitoQ treatment, may enhance the ROS scavenging of MitoQ via the Nrf2 pathway and cause potential non-selective quenching. This has been previously noted in intestinal epithelial cells (Hu *et al.*, 2018). As such, interpretation of data using MitoQ in Nrf2-based studies needs to consider this aspect.

The probes used to ascertain ROS levels in our study are DHE, PY1, and their respective mitochondrial derivatives MitoSOX, and MitoPY1. However, these probes have limitations (Murphy *et al.*, 2022; Gardiner *et al.*, 2020; Kalayanaraman *et al.*, 2012). DHE is normally used as a proxy for superoxide levels. It becomes hydroxylated when reacting with superoxide and forms 2-hydroxyethidium. Afterwards, it intercalates with DNA and emits red fluorescence (λ_{ex} : 490 nm and λ_{em} : 590 nm) (Gardiner *et al.*, 2020), which enhances the fluorescence signal and can create an artefact (Murphy *et al.*, 2022). Another limitation of the DHE probes is that they produce both 2-HE that is specific for superoxide, and ethidium (E+), which is a non-specific oxidation product (Murphy *et al.*, 2022). Ethidium (E+) and 2-HE have overlapping fluorescence spectra, which causes difficulty in discerning the contribution of superoxide. DHE may sometimes react in a less specific manner with other ROS like hydrogen peroxide. This forms ethidium which also fluoresces in red (λ_{ex} : 480 nm and λ_{em} : 580 nm) (Gardiner *et al.*, 2020). Experiments using DHE must consider that, while the probe is among the best available for superoxide detection, it is not 100% specific to cellular superoxide. MitoSOX, the mitochondrial counterpart of DHE, has the same strengths and weaknesses as DHE, but in a mitochondria-specific manner (Gardiner *et al.*, 2020). We added

PEG-SOD in our experiments to show that the DHE and MitoSOX fluorescence could be inhibited by a superoxide scavenger (Fig. 3.2A, 3.2C).

PY1, the probe used to detect hydrogen peroxide, is a boronate protected rhodol-based probe. Boronate probes like PY1 are among the more preferred small molecule probes for detecting H_2O_2 in cells (Murphy *et al.*, 2022; Kalayanaraman *et al.*, 2012). PY1 is very specific to this type of ROS but possesses a slow reaction rate with hydrogen peroxide ($k = 0.1\text{--}1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Abo & Weerapana, 2019). Homeostatic levels of H_2O_2 are normally removed by naturally occurring antioxidants like peroxiredoxins, catalase and glutathione peroxidases (Averill-Bates, 2024). While PY1 and MitoPY1 remain among the most appropriate probes for our type of study, the potentially low sensitivity of these probes must be considered (Abo & Weerapana, 2019). PEG-CAT was added to our experiments to show that the PY1 and MitoPY1 fluorescence could be inhibited by a peroxide scavenger (Fig. 3.2B, 3.2D). Fluorescence of these PY1 probes was not inhibited by SOD.

3.5 Conclusion

Altogether, our study has demonstrated that ROS are produced non-exclusively from both NOX and mitochondria at 42°C, but that only mitochondrial ROS drive severe 42°C heat-induced cell death. Furthermore, Nrf2 levels directly mediate apoptotic cell death at 42°C. Nrf2 levels also directly impact the protective capability of thermotolerance acquired by pre-treatment at 40°C. We surmised that mitochondrial ROS were necessary in activating the cellular adaptive response via mild heat stress at 40°C in an Nrf2-dependent way. Finally, we demonstrate that reduction of mitochondrial ROS via MitoQ prior to preconditioning of cells at 40°C inhibits the acquisition of thermotolerance by attenuating Nrf2 levels. Our results clearly outline an important regulatory role of mitochondrial ROS in defense signaling and provide an alluring potential therapeutic target to explore in order to understand, and eventually bypass, transient thermotolerance acquired by tumors in the context of hyperthermia treatment.

3.6 Supplementary Data

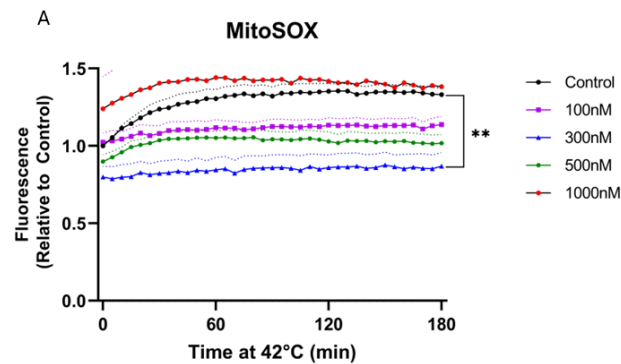


Figure 3.S1 Pre-treatment with 300 nM MitoQ at 42°C leads to most pronounced ROS scavenging potential at 42°C. A concentration range of 100-1000 nM MitoQ was tested during 18 h for inhibition of levels of MitoSOX fluorescence in cells at 42°C (n = 3). The minimum concentration of MitoQ that inhibited ROS fluorescence (300 nM) was selected for experiments. Means and SEM are from 3 independent experiments. ** p < 0.01, statistically significant difference for cells ± MitoQ.

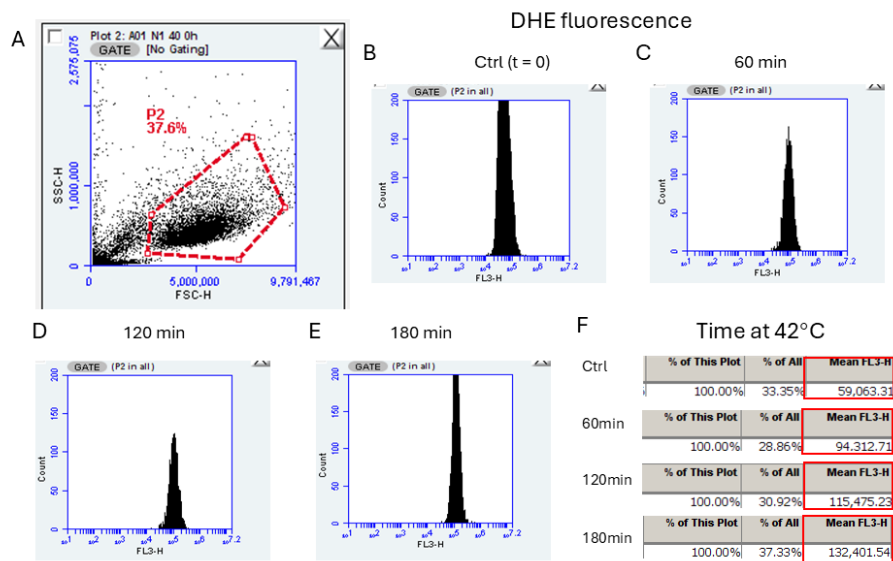


Figure 3.S2 Representative flow cytometry data for DHE fluorescence. Representative data for DHE fluorescence presented in Figure 1 was collected by flow cytometry. This procedure was used for the three other ROS probes. The

gating of cells used for data acquisition to select for elimination of cell debris and for discrimination of doublets/triplets is shown in (A). The FL-3 channel of unheated control cells (B), and cells heated at 42°C for 60 (C), 120 (D) and 180 min (E) was quantified and expressed as fluorescence relative to the unheated control (n = 4). Respective values for DHE fluorescence are shown in (F).

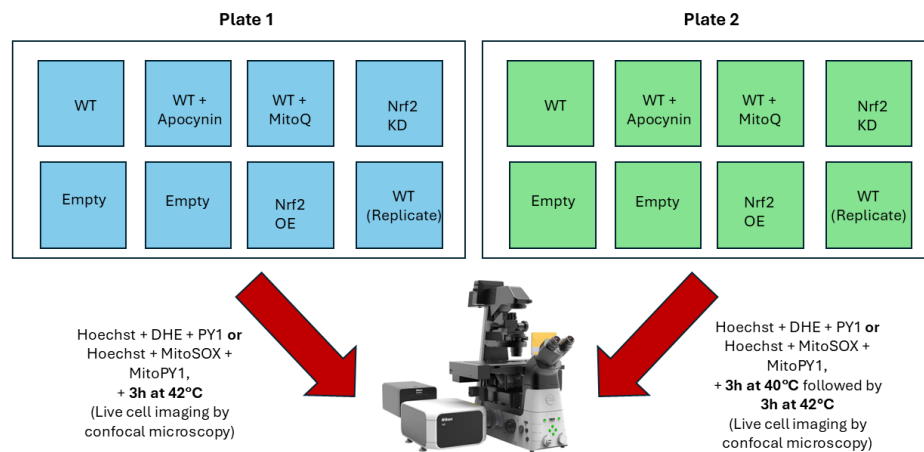


Figure 3.S3 Confocal microscope 8-well plate setup. The 8-well plate setup and 5 treatment conditions (WT, WT + MitoQ, WT + Apocynin, Nrf2 KD, Nrf2 OE) used for live cell imaging by confocal microscopy during a 180 min kinetic run using multiple fluorescent probes are shown. Plate 1 was for non-thermotolerant normal cells heated at 42°C, while Plate 2 was for thermotolerant cells (preheated for 3 h at 40°C) heated at 42°C. Two series, using either cellular or mitochondrial ROS probes, were run in parallel for both Plates 1 and 2.

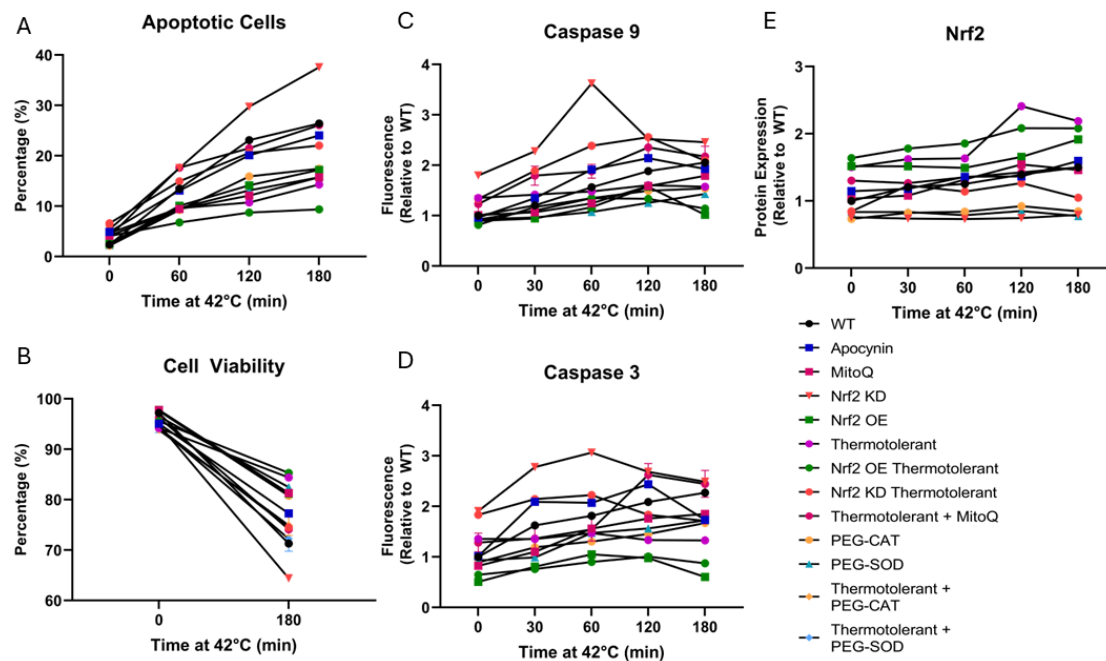
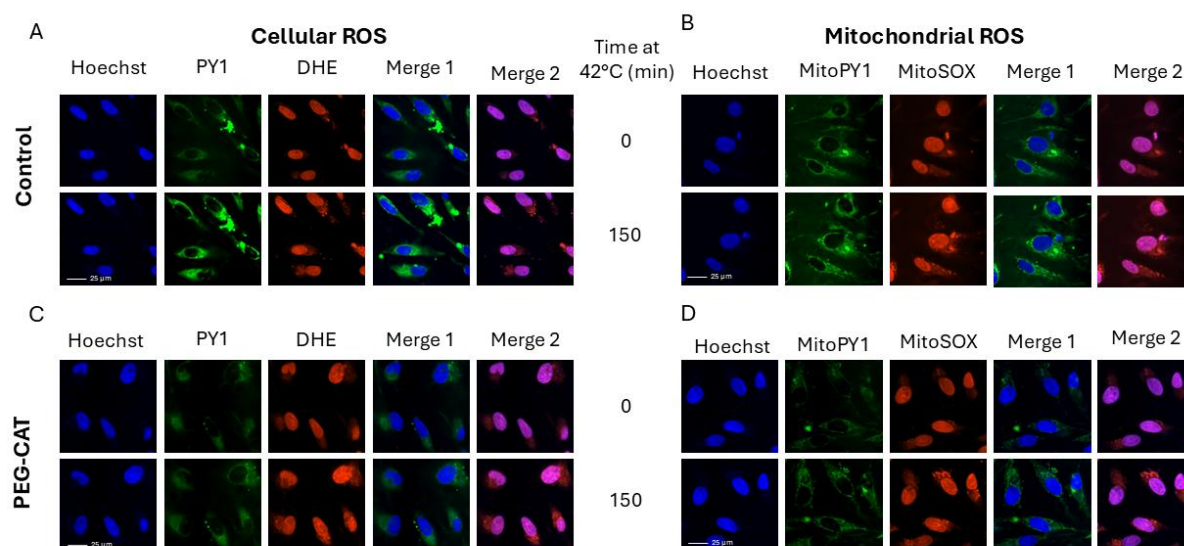


Figure 3.S4 Full presentation of parallel experiments from which conditions are extracted and presented in various main figures to ensure clarity. Graphical presentation of all 13 treatment conditions for apoptosis by nuclear chromatin condensation (A), cell viability (B), caspase 9 and (C) caspase 3 activities (D) and Nrf2 protein expression (E). No statistical analyses were performed on these full models.



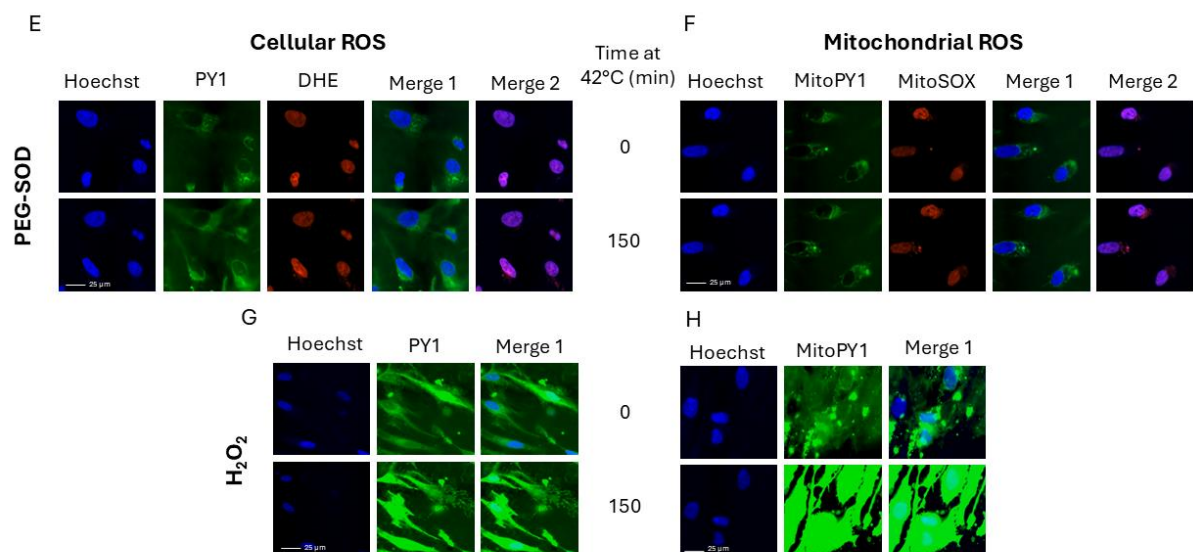
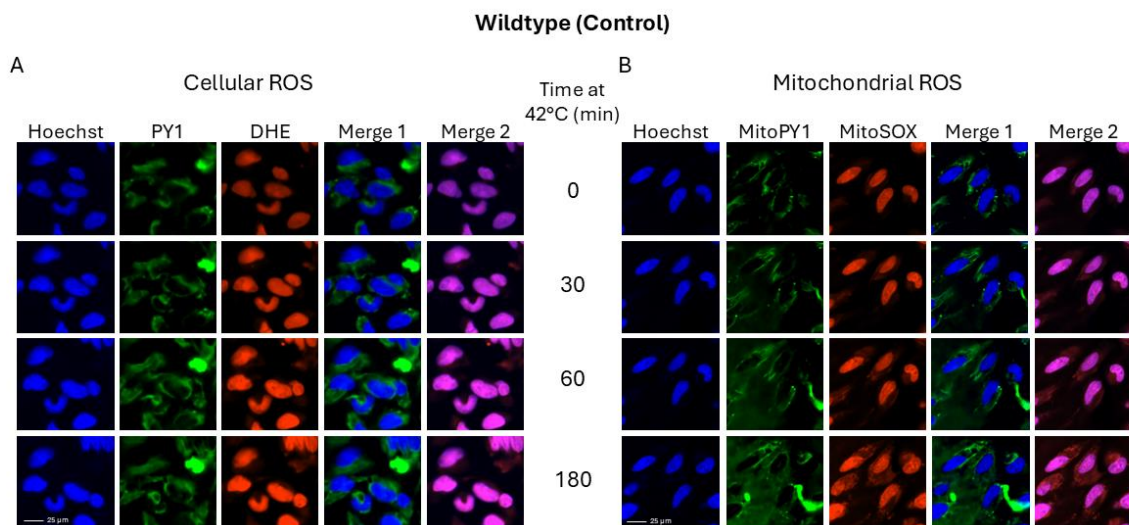
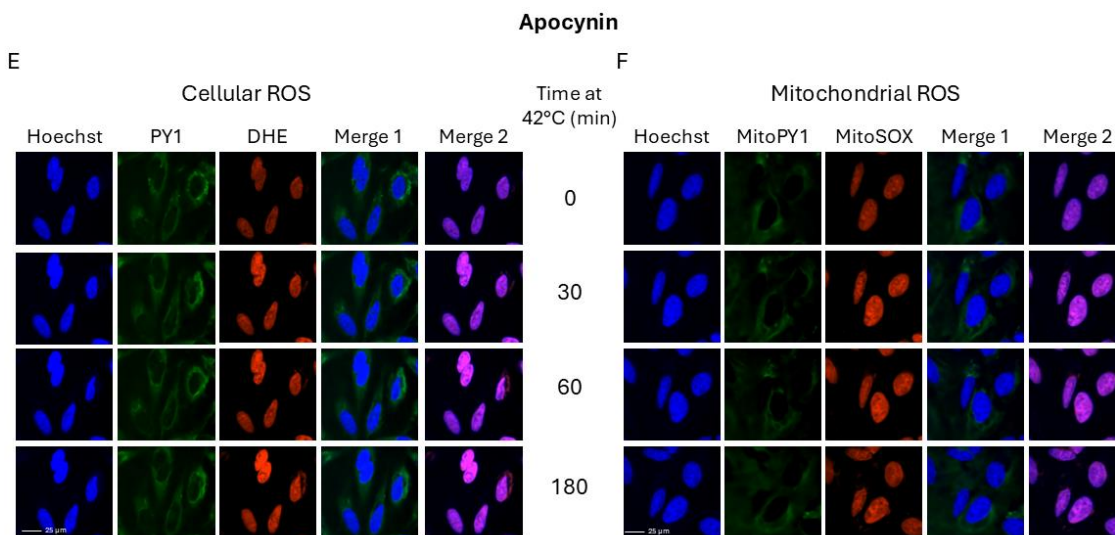
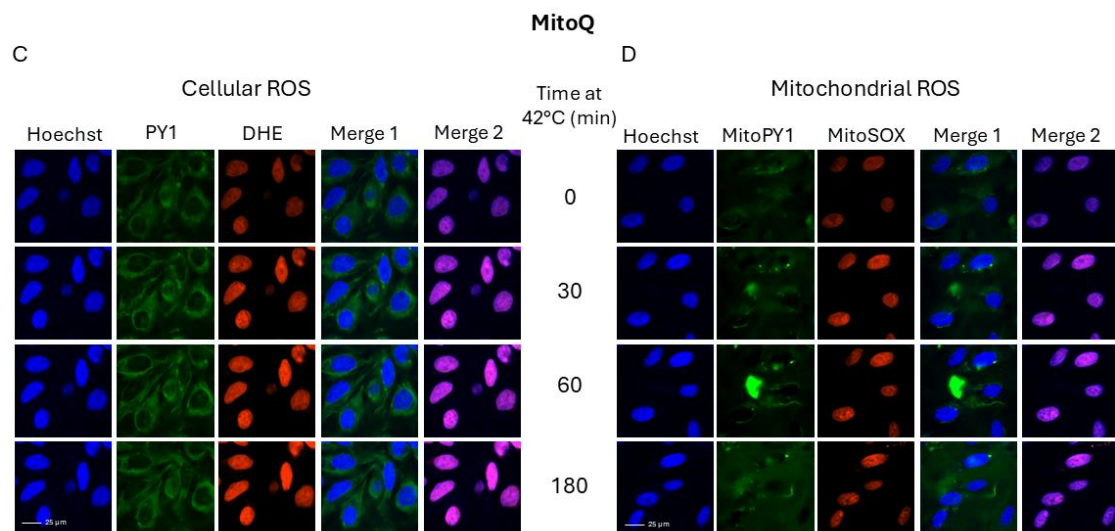
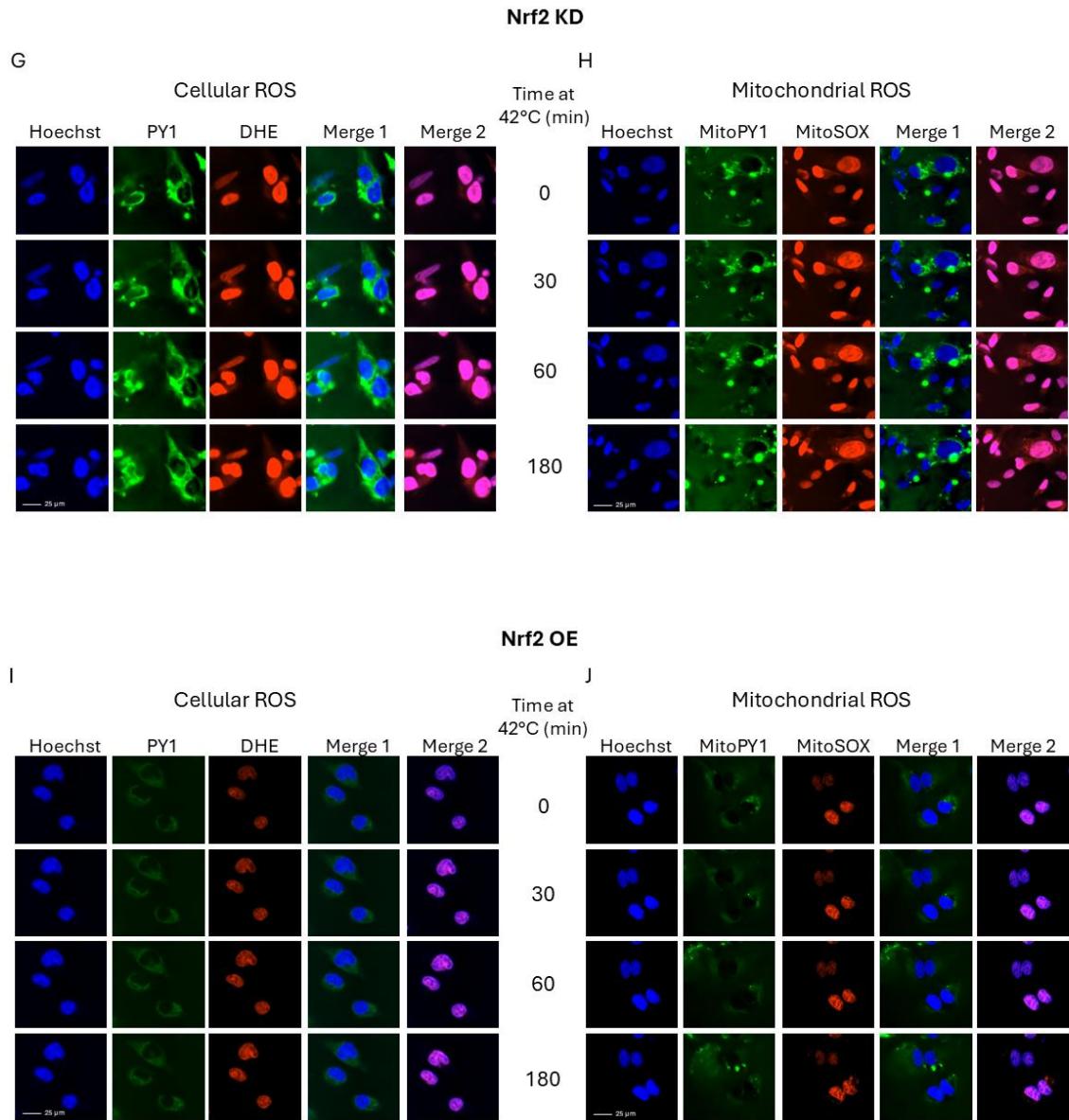
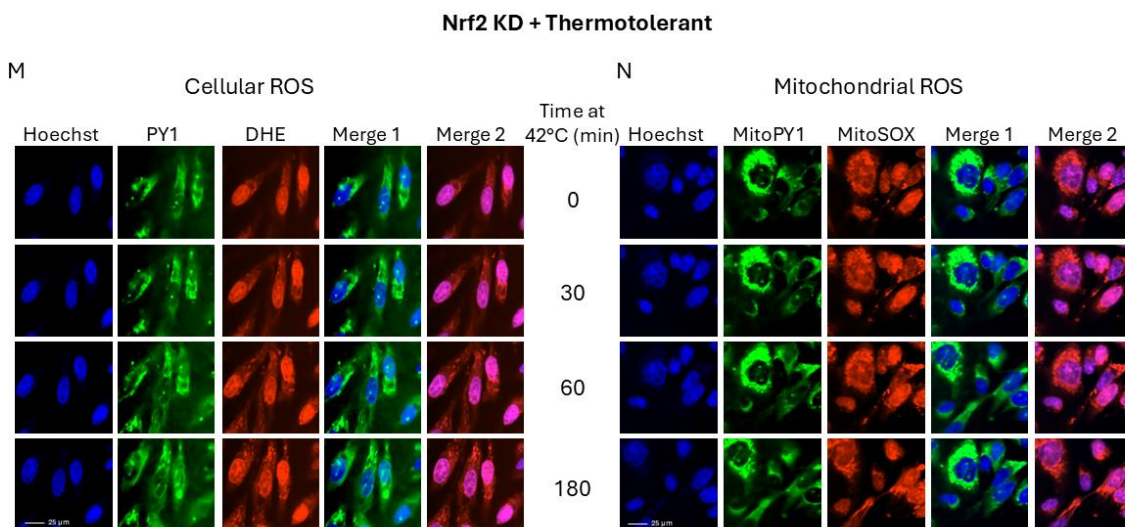
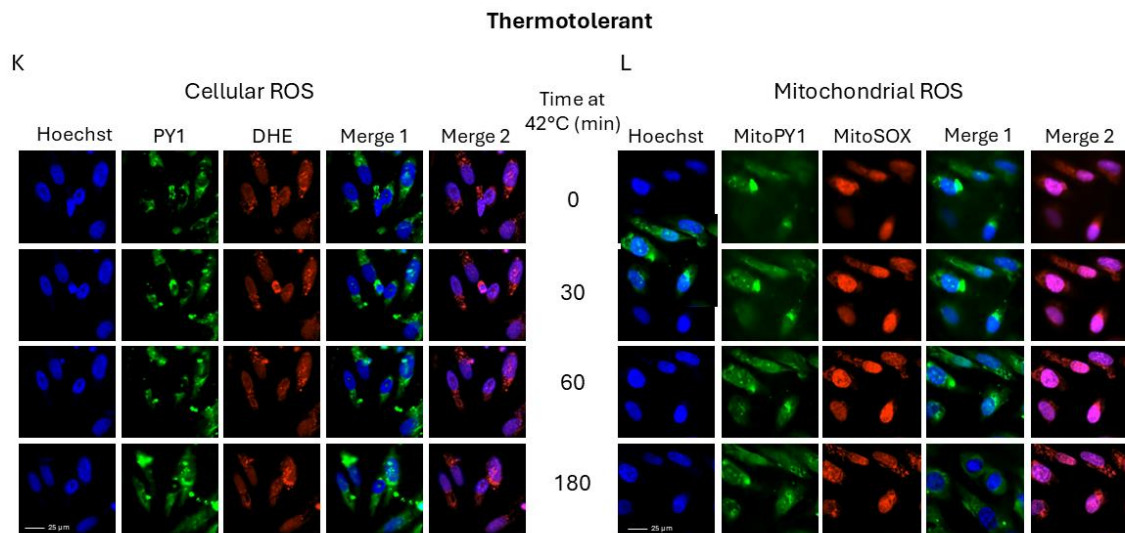


Figure 3.S5 Representative images of confocal microscope experiments from Figure 3.2. Fluorescence images for cellular ROS (A) and mitochondrial ROS (B) in control cells are shown at 2 separate treatment times (0 and 150 min) at 42°C. Images of cells treated with PEG-CAT (C, D) and PEG-SOD (E, F) at 42°C, and with hydrogen peroxide (G, H) are shown. For live cell imaging, the same cells were followed during a 180 min kinetic run at 42°C using multiple fluorescent probes added simultaneously. The images are from one representative experiment with all conditions run in parallel. The experiment was repeated 3 times. The Hoechst channel is shown in blue, the PY1/MitoPY1 channels in green, and the DHE/MitoSOX channels in red. Merge 1 combines the blue and green channels. Merge 2 combines the blue and red channels. Scale bar = 25 μm.









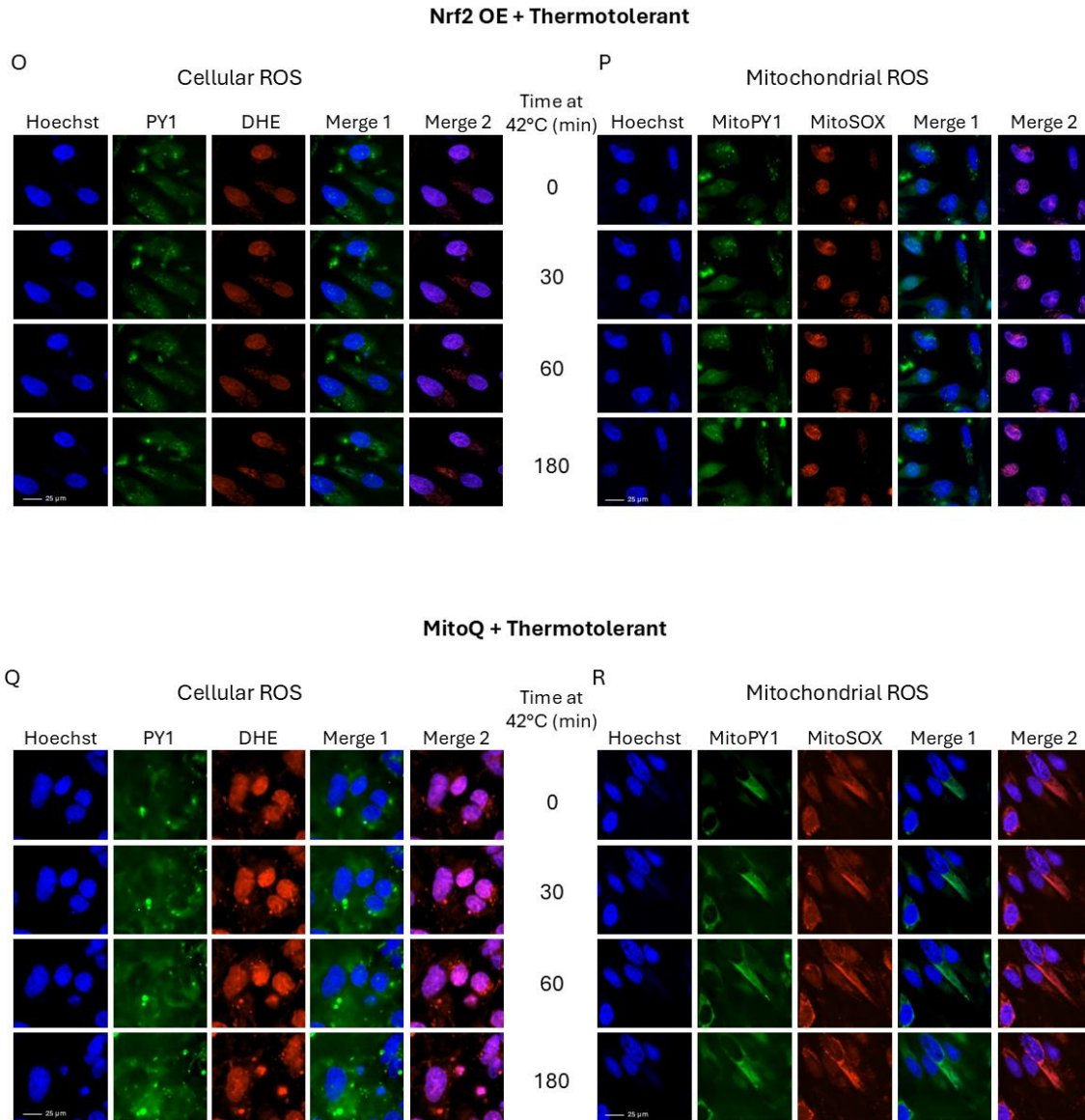
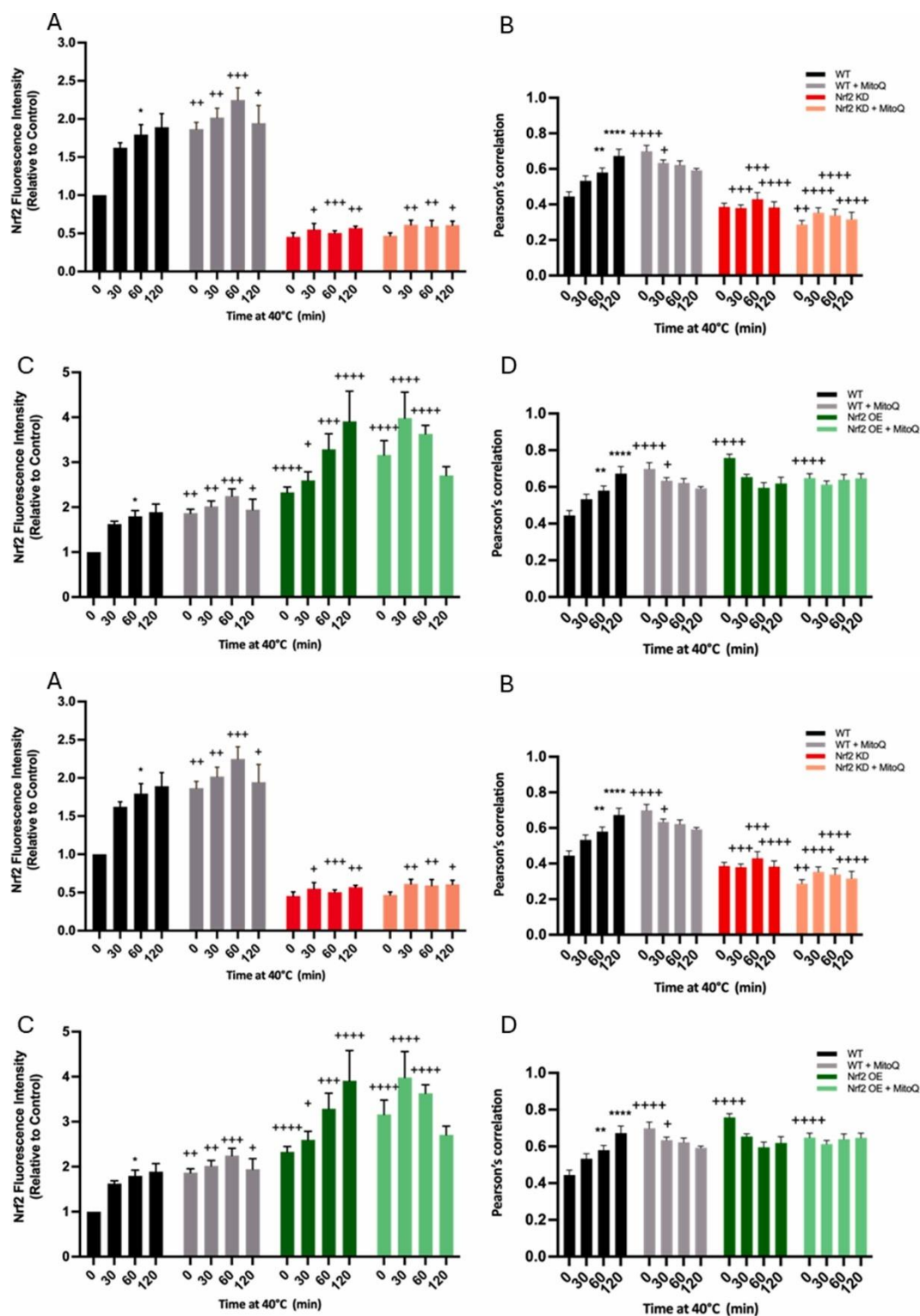
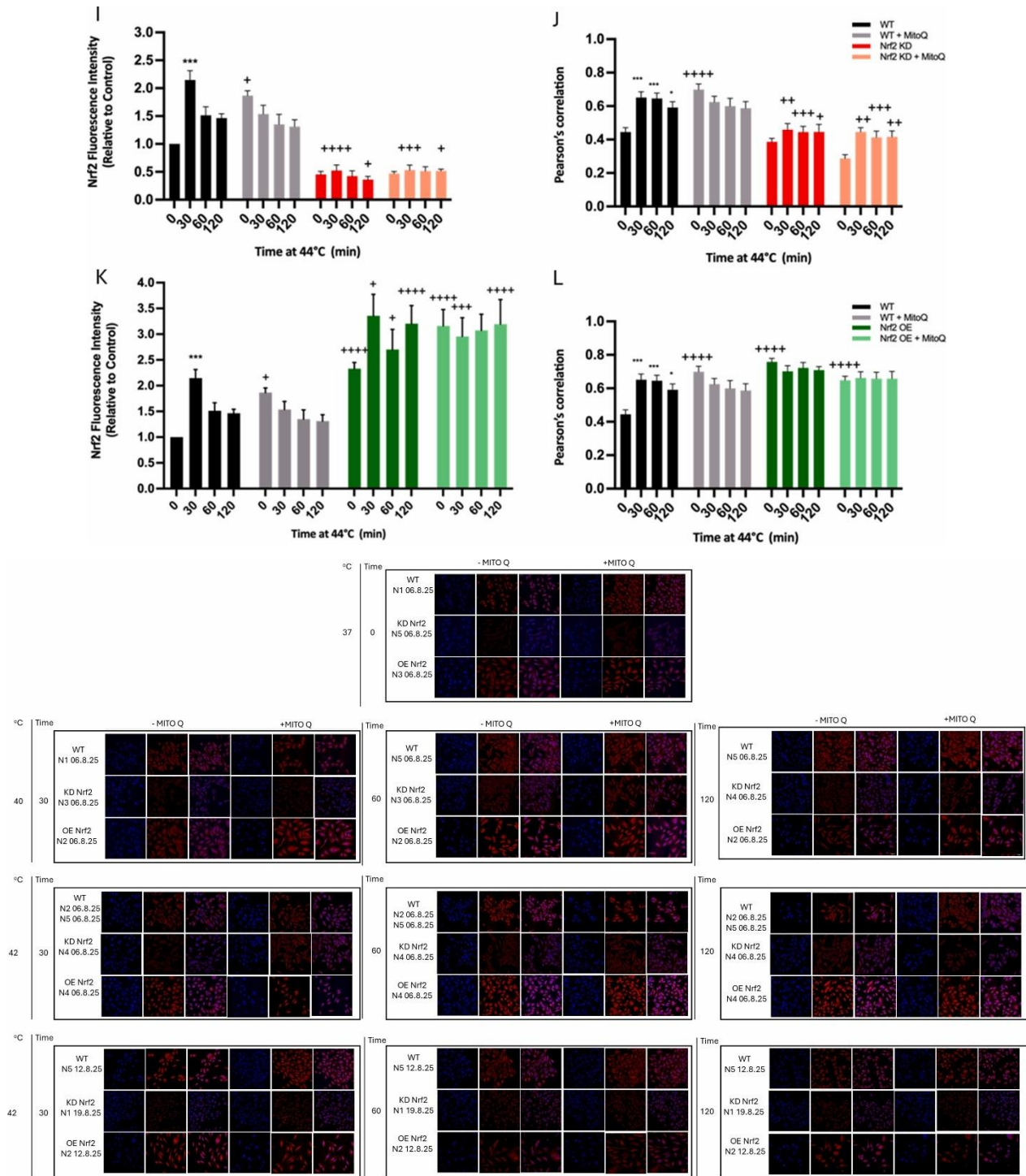


Figure 3.S6 Representative confocal images of all conditions shown in Figs. 3.3 to 3.7. Fluorescence images are shown for cellular ROS (A) and mitochondrial ROS (B) of WT cells at 4 separate treatment times (0, 30, 60 and 180 min) at 42°C. Cellular ROS (C) and mitochondrial ROS (D) of MitoQ-treated cells are presented. Similarly, cellular and mitochondrial ROS, respectively, are shown for apocynin-treated cells (E, F), Nrf2 KD cells (G, H), Nrf2 OE cells (I, J), thermotolerant cells (K, L), Nrf2 KD thermotolerant cells (M, N), Nrf2 OE thermotolerant cells (O, P), and thermotolerant cells pre-treated with MitoQ (Q, R). For live cell imaging, the same cells were followed during a 180 min kinetic run at 42°C using multiple fluorescent probes added simultaneously. The representative images are from one singular experiment with all conditions run in parallel. The experiment was repeated 4 to 8 times for cellular ROS, and 6 times for mitochondrial ROS. The Hoechst channel is shown in blue, the PY1/MitoPY1 channels in green and the DHE/MitoSOX channels in red. Merge 1 combines the blue and green channels. Merge 2 combines the blue and red channels. Scale bar = 25 µm.





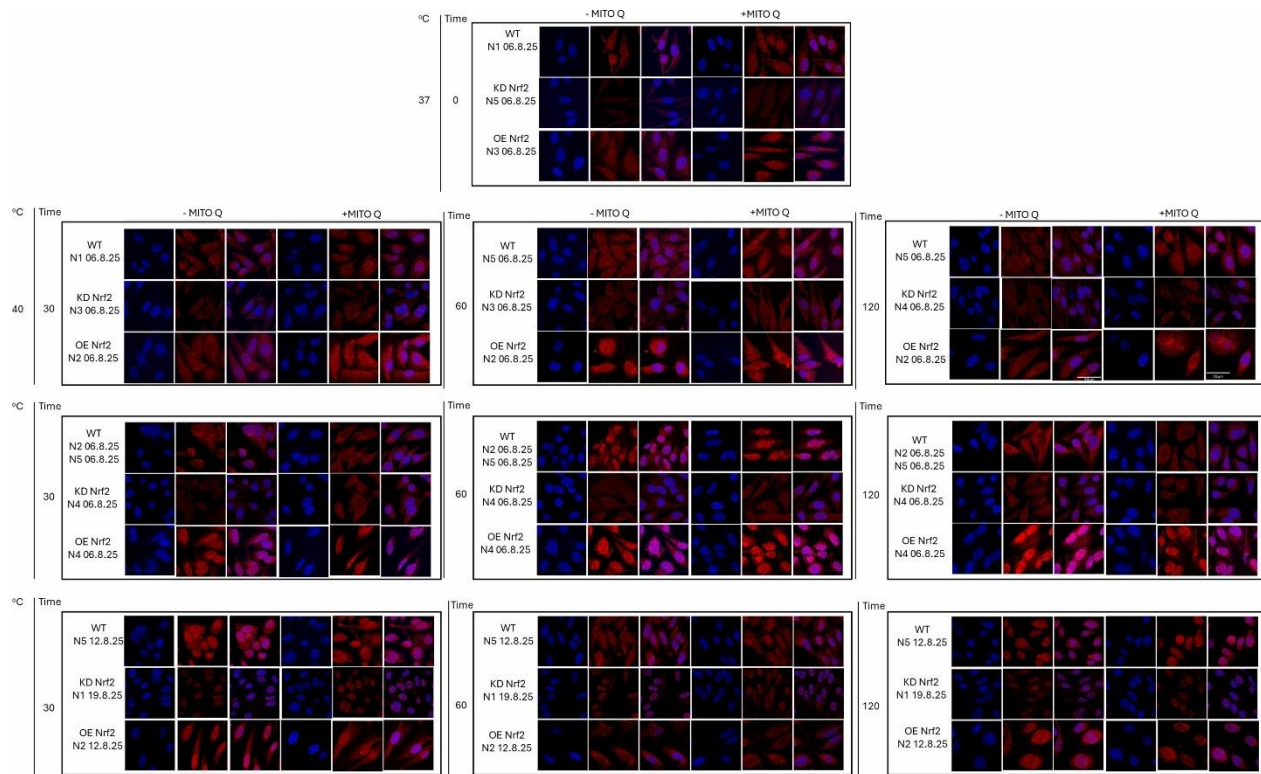


Figure 3.S7 Time dependence of Nrf2 expression and translocation to the nucleus. WT, Nrf2 KD and Nrf2 OE cells, untreated or pre-treated with MitoQ, were heated at 40 °C (A-D), 42 °C (E-H) or 44 °C (I-L) for different times up to 2 h. Nrf2 levels were determined by confocal microscopy (60 ×) using an Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure anti-rabbit secondary antibody to anti-Nrf2 (A-N). Nuclei were labeled with DAPI. Fluorescence measurements were collected with a confocal microscope. Representative images are from at least 4 independent experiments (M – N). Scale bars represent 25 μm. Nrf2 levels in KD and OE cells were relative to WT cells (1.0, time = 0) following heating at 40 °C (A, C), 42 °C (E, G) or 44 °C (I, K). Data for fluorescence intensity per cell represent mean ± SEM from n = 4. Colocalization of fluorescence for Nrf2 (red) and nuclei (blue) is shown in pink (M – N). Pearson's correlation for colocalization of Nrf2 and cell nuclei for cells heated at 40 °C (B, D), 42 °C (F, H) or 44 °C (J, L). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001: significant difference between unheated control and WT cells heated at 40 °C, 42 °C or 44 °C. +p < 0.05, ++p < 0.01, +++p < 0.001, ++++p < 0.0001: significant difference between WT cells and Nrf2 KD or Nrf2 OE cells for each treatment time. Note: The data for each temperature on the graphs for WT ± MitoQ treatment was repeated between figure panels for Nrf2 KD and Nrf2 OE data, to not overload the graphs and for clarity of visualisation. E.g. for panels A and C, B and D, E and G, F and H, I and K, J and L.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 Résumé bref de la discussion des deux articles présentés

L'objectif expérimental de cette thèse était de caractériser la production d'espèces réactives de l'oxygène à 40°C, et à 42°C. Cette production d'ERO a été aussi comparée en fonction de l'activité protéique de Nrf2 via des lignées KD et OE. Ensuite, il était question de comparer cette production d'ERO dans des cellules rendues thermotolérantes à 40°C. Nous voulions aussi clarifier la contribution d'ERO de sources cellulaires spécifiques à l'induction de la thermotolérance et de sa dépendance potentielle sur la Nrf2. Finalement, nous voulions mettre en évidence l'implication de protéines de réponses aux stress connues, PGAM5, Nrf1 et DJ-1, dans un contexte de choc thermique ainsi que leur interaction potentielle avec Nrf2.

Dans le premier article (Chapitre 2), le plan expérimental misait sur une exposition de cellules HeLa pendant 3h à 40°C, une température relativement douce et non létale. Ces conditions spécifiques de choc thermique ont déjà été démontrées à pouvoir induire une résistance transitoire dans le modèle cellulaire HeLa, et donc représentaient un modèle expérimental physiologiquement pertinent (Glory *et al.*, 2014; Grondin *et al.*, 2024; Pallepati et Averill-Bates, 2010; Redza-Dutordoir *et al.*, 2016). L'objectif, alors, était premièrement de clarifier la source cellulaire des ERO. Deuxièmement, nous voulions démontrer l'implication de Nrf2 dans la médiation des ERO pendant un stress léger thermique à 40°C. Ensuite, il était question de caractériser l'activité de certaines protéines en mettant en évidence leur modulation par choc thermique et/ou par Nrf2 durant ce choc. Spécifiquement, nous avons étudié le facteur de respiration nucléaire Nrf1, car quatre ARE se retrouvent dans le promoteur de ce gène (Piantadosi *et al.*, 2008). De plus, Nrf1 régule directement le métabolisme mitochondrial en stimulant la production de sous-unités du STE encodés soit par le génome nucléaire (Kobayashi *et al.*, 2020), soit par le génome mitochondrial (Kang *et al.*, 2007). Ce potentiel à moduler le métabolisme pourrait influencer directement la production d'ERO, vu leur relation proportionnelle (Mailloux, 2020). Ensuite, nous avons étudié DJ-1, car il est connu comme un régulateur positif direct en amont de Nrf2 par déstabilisation du lien protéine-protéine avec Keap1 (Milani *et al.*, 2013). Finalement, nous avons étudié la protéine mitochondriale PGAM5, car elle crée un complexe avec Nrf2 qui est sensible aux changements oxydatifs à la membrane mitochondriale externe (Lo et Hannink, 2008; Zeb *et al.*, 2021). PGAM5 peut aussi lier et séquestrer Keap1, permettant à Nrf2 de se stabiliser (Yang *et al.*, 2017). De plus, durant un stress considéré léger, PGAM5 possède des

propriétés anti-apoptotiques qui peuvent protéger la cellule et stimuler des voies de défense (Cheng *et al.*, 2021).

Brièvement, nous avons démontré, par utilisation de l'antioxydant mitochondrial MitoQ, l'implication de la mitochondrie à la production d'ERO à 40°C. De même, en utilisant un inhibiteur de NOX, l'apocynine, nous avons pu démontrer que les NOX produisent des ERO durant ce choc thermique léger. À 40°C, il y avait une augmentation significative du niveau de Nrf2 à travers le temps, indiquant une augmentation de l'activité de cette protéine par voie de stress thermique. En utilisant des lignées KD et OE pour Nrf2, nous avons pu démontrer un lien direct entre la concentration protéique de Nrf2, et le niveau d'ERO. Dans la lignée HeLa KD, le niveau d'ERO cellulaires était significativement plus élevé, tandis qu'il était significativement plus bas dans la lignée HeLa OE. De plus, le niveau d'ERO mitochondrial suivait la même tendance, indiquant que Nrf2 pouvait moduler les ERO en agissant directement à la source mitochondriale. Ensuite, nous avons pu récupérer les niveaux d'ERO cellulaires/mitochondriaux dans les cellules KD en utilisant soit MitoQ, soit de l'apocynine. Cette récupération d'ERO, dans les deux cas, était aussi accompagnée par un sauvetage du niveau de Nrf2 à des niveaux de base retrouvés dans les cellules de contrôle (WT).

Le stress thermique à 40°C a induit l'augmentation de Nrf2, mais n'a pas pu induire une augmentation de Nrf1 ou de DJ-1. Ceci indiquait que l'augmentation démontrée de Nrf2 était indépendante d'une suractivation de son régulateur positif DJ-1. De plus, bien que Nrf1 représente une cible de Nrf2 par son lien aux ARE, son activité démontrait une tendance à la baisse. On pouvait alors supposer l'implication d'un mécanisme alternatif qui maintenait ou réduisait les niveaux de Nrf1. Le niveau de PGAM5 clivé a démontré une tendance à la hausse au fil du temps, couplé avec une tendance inverse dans le niveau de PGAM5 non clivé.

Dans les cellules Nrf2 KD, les niveaux de base de PGAM5, DJ-1, et de Nrf1 étaient significativement réduits. De plus, le ratio de clivage de PGAM5 était significativement altéré par la réduction de Nrf2. L'utilisation de l'apocynine dans les cellules Nrf2 KD a engendré une augmentation de Nrf1, DJ-1, ainsi que PGAM5 à des niveaux significativement plus élevés que dans les cellules de contrôle. Cependant, l'utilisation de MitoQ dans les cellules KD a seulement restauré Nrf2, mais aucune autre protéine étudiée. Ceci nous a mené à émettre l'hypothèse suivante : les protéines Nrf1, DJ-1, et PGAM5, étudiées dans un contexte de stress thermique léger, requièrent deux axes pour augmenter leur niveau cellulaire. Premièrement, il faut

une présence de Nrf2, tel que démontré par les expériences de KD. Deuxièmement, il faut une présence d'ERO assez importante d'origine mitochondriale spécifiquement. Bien que l'apocynine et le MitoQ restaurent Nrf2 dans les deux cas, seule l'utilisation d'apocynine potentialise l'activité des protéines étudiées. Il semble que l'inhibition de la source mitochondriale résulte en une restauration de Nrf2 seulement. Sommairement, les résultats de ce chapitre ont fourni des preuves substantielles pour supposer que l'axe Nrf2, ainsi que des ERO mitochondriaux, étaient vitaux pour activer les protéines de défenses étudiées. Cette hypothèse Nrf2-ERO mitochondriaux a déjà été validée dans deux études précédentes, dont une sur les carcinomes hépatocellulaires et le stress thermique (Kasai *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2023). Les lignées cellulaires étaient différentes, et le contexte/stress n'était pas exactement comparable, mais ces deux études, ainsi que nos résultats, fournissent assez de preuves pour devoir valider l'hypothèse. Si, dans notre cas, cette dernière s'avère, il se pourrait que Nrf2 et les ERO mitochondriaux soient requises pour moduler d'autres défenses cellulaires, et par extrapolation, pour induire une thermotolérance. Cette hypothèse pouvait être validée/infirmée en modulant soit l'un ou l'autre de ces facteurs pour évaluer leur impact sur l'acquisition et l'efficacité de la thermotolérance par exposition préalable à un stress léger.

Le prochain objectif, alors, était de valider cette hypothèse à une température plus élevée à 42°C. Ceci constituait le but primaire du prochain article (Chapitre 3). La température de 42°C était physiologiquement pertinente, car elle représentait une température létale aux tumeurs souvent utilisée dans le contexte de traitements d'hyperthermie (Crezee *et al.*, 2021). Dans le chapitre précédent, la mort cellulaire n'avait pas été évaluée, car une exposition à 40°C pendant 3h ne réduit pas la viabilité cellulaire dans les cellules HeLa, même dans les cellules Nrf2 KD (Grondin *et al.*, 2024). Ce traitement pouvait alors être considéré comme un conditionnement cellulaire plutôt qu'un stress toxique.

Sommairement, à 42°C, il y avait une forte augmentation d'ERO causée par le choc de température létal, accompagnée d'une augmentation de mort cellulaire à partir de 60min. Cette augmentation était plus aigüe à 42°C qu'à 40°C. Ces ERO étaient alimentées, du moins en partie, par source mitochondriale, et elles étaient directement responsables de la réduction de viabilité, car leur réduction par pré-traitement générique antioxydant de PEG-SOD et PEG-CAT réduisait la mort cellulaire subséquente à 42°C. Les NOX contribuaient également à la production d'ERO. Cependant, seul le traitement de MitoQ augmentait la viabilité cellulaire après 3h. L'apocynine, inhibiteur de NOX, ne semblait pas pouvoir réduire la mort cellulaire. Ceci indiquait que les ERO mitochondriaux contribuaient majoritairement à la mort cellulaire

ERO-dépendante observée à 42°C. L'activation de Nrf2 était plus forte à 42°C qu'à 40°C. Il y avait une augmentation deux fois plus prononcée en 3h durant le choc létal que durant le choc léger. La contribution de l'axe Nrf2 antioxydant à la médiation d'ERO, et par conséquent, à la prévention de la mort cellulaire, a été évaluée à 42°C. Comme les résultats à 40°C laissaient présager, la production d'ERO était proportionnelle au niveau de Nrf2. La lignée KD avait un niveau plus élevé d'ERO cellulaires et mitochondriaux, tandis que la lignée OE démontrait des niveaux significativement plus bas. Ceci était aussi corrélé avec une augmentation de mort chez les Nrf2 KD, et une réduction de mort chez les cellules Nrf2 OE. Ces résultats fournissaient des preuves quant au lien entre le niveau de Nrf2, et la survie cellulaire durant un choc thermique létal. Malgré le fait que la sous-expression et la suractivation de Nrf2, via nos lignées modifiées, ont menés à des changements des niveaux d'expression protéique de Nrf2 plus subtiles (inférieurs à deux fois plus/moins), nous avons observé des effets très importants au niveau de la réponse cellulaire au stress, et au niveau de l'induction de voies cellulaires de la mort. Ceci étant dit, l'importance de la réponse cellulaire face au changement plus léger des niveaux de Nrf2 ne devrait pas être surprenant. En effet, la biologie cellulaire repose sur des systèmes très sensibles, pouvant réagir à des variations que nous ne qualifions pas d'importantes (Mitra *et al.*, 2021). Les lignées cellulaires avec d'importantes modifications au niveau protéique (plus de deux fois plus/moins) sont synthétiques, créées dans un laboratoire, et servent d'excellents modèles pour démontrer la fonction d'une protéine. Cependant, la régulation fine d'un système peut se reposer sur des variations beaucoup moins importantes (Mitra *et al.*, 2021), comme le démontre nos manipulations. Ainsi, malgré les changements plus subtiles, notre système demeure valide.

Ensuite, nous avons évalué l'impact sur la survie cellulaire d'une thermotolérance (TT) acquise par pré-traitement de 3h à 40°C. Ce pré-traitement augmentait initialement les niveaux d'ERO en comparaison aux contrôles, mais au fil du choc subséquent à 42°C permettait le maintien d'un niveau stable d'ERO. Les cellules TT avaient non seulement un niveau plus bas d'ERO à 42°C à partir de 60min, mais elles possédaient aussi un niveau plus élevé de Nrf2, et démontraient un taux de mort réduit en comparaison aux contrôles. De plus, en modulant le niveau d'expression de Nrf2 via les lignées KD et OE, on a démontré un lien direct entre Nrf2 et l'efficacité de la thermotolérance acquise à protéger la cellule contre la mort induite par choc thermique létal induit à 42°C.

Cette activation de la thermotolérance Nrf2-dépendante requiert un signal précurseur, et les résultats du premier article (Chapitre 2) nous permettait d'hypothétiser l'implication active des ERO mitochondriaux

comme activateurs de ce processus. En prétraitant les cellules avec MitoQ avant de les exposer à 40°C pendant 3h, et ensuite à 42°C, nous pouvions créer un modèle cellulaire dans lequel on réduit considérablement l'impact des ERO mitochondriaux. Ce double pré-traitement (MitoQ + TT) réduisait initialement la production des ERO à 40°C (voir Chapitre 2). En revanche, à 42°C, nous avons observé une tendance inverse dans laquelle les cellules prétraitées (MitoQ + TT) possédaient un plus bas taux de Nrf2, une plus basse viabilité, ainsi qu'un plus haut niveau d'ERO en comparaison aux cellules TT. Ces résultats étaient similaires à une étude précédente qui impliquait les ERO mitochondriaux dans l'activation Nrf2-dépendante d'une résistance à l'ablation par radiofréquences de carcinomes hépatocellulaires (Peng *et al.*, 2023). Pour démontrer que l'effet observé dans nos travaux était dû à une inhibition d'ERO, et non à un effet secondaire du traitement avec MitoQ, nous avons répété ces expériences avec un pré-traitement de PEG-CAT et PEG-SOD. Les deux antioxydants ont aussi pu inverser l'effet de TT et ont significativement augmenté la mort cellulaire en comparaison aux cellules TT. Ces résultats démontraient effectivement la nécessité des ERO mitochondriaux à 40°C pour induire une résistance subséquente à la cytotoxicité induite à 42°C. Malgré que nous ayons démontré l'impact des EROs mitochondriaux sur l'induction d'une thermotolérance Nrf2-dépendante, le mécanisme cellulaire par lequel ceci se traduit demeure encore non élucidé. Considérant la complexité du système antioxydant Nrf2, il se peut qu'il y ait plusieurs cibles pouvant engendrer l'activation de cette thermotolérance. En particulier, la translocation nucléaire de Nrf2 pourrait nous éclaircir sur ce phénomène. La première étape pour clarifier le phénomène serait d'étudier l'expression de Keap1 elle-même. Étant le répresseur primaire de Nrf2 au niveau cytosolique, c'est un des régulateurs primaires ayant le potentiel de moduler l'induction d'une thermotolérance mitochondrie-dépendante. En effet, les résidus de cystéine de Keap1 sont particulièrement sensibles aux changements rédox (Averill-Bates, 2024), donc en plus de l'étude des niveaux protéiques eux-mêmes, il faudrait aussi observer l'état rédox, et donc les changements de conformations de Keap1. De plus, les importines β sont requises pour importer Nrf2 dans le noyau. Il a déjà été démontré que certains mécanismes d'import nucléaire induits durant le stress peuvent contourner l'utilisation de ces importines, et utiliser un transporteur nommé Hikeshi (Imamoto et Kose, 2012). Tandis que l'importine β semble régulé à la baisse durant un choc thermique, Hikeshi maintient ses niveaux et semble importer des Hsp70 lors d'un choc thermique (Imamoto et Kose, 2012). Il se peut donc, que la méthode d'import elle-même impacte l'accumulation nucléaire de Nrf2, et pourrait même être sous contrôle rédox.

De plus, la régulation mécanistique de Nrf2 pourrait aussi être influencée par des facteurs suivant son import nucléaire. Les protéines sMaf, spécifiquement MafG, MafK, MafF, assurent le lien de Nrf2 aux ARE.

Par eux-mêmes, les sMAF, en homodimères, fonctionnent à réprimer leur propre activité (Tonelli *et al.*, 2018). Ce n'est seulement qu'à la dimérisation avec d'autres protéines, comme Nrf2 ou des facteurs Bach, que les sMAF deviennent des cofacteurs cruciaux pour des réponses de stress. Les sMAF ne possèdent pas de domaines de transactivation et requièrent cette fonction de la part de Nrf2, mais ils possèdent l'interface par lequel le dimère SMaf-Nrf2 peut se lier à l'ADN. Ainsi, la modulation des niveaux des sMAF pourrait fortement influencer la réponse au stress Nrf2-dépendante (Tonelli *et al.*, 2018).

Il a été démontré que le niveau d'ARNm de MafG peut varier en réponse à un stress thermique (Suzuki *et al.*, 2001). Les sMaf étant des partenaires de liaison obligatoire à l'ADN, leur régulation, soit à la hausse ou à la baisse, pourrait représenter un mécanisme fin par lequel l'activité de Nrf2 pourrait être modulée sans pour autant affecter son niveau protéique. Pour élucider cet élément potentiellement critique, il faudrait regarder les niveaux d'ARNm des 3 sMAF (MafG, MafK, MafF) impliquées avec la liaison de Nrf2 à l'ADN, ainsi que leur niveaux protéiques en relation avec les différentes températures utilisées dans nos manipulations (40°C, 42°C, 40-42°C).

Les niveaux protéiques de PGAM5, DJ-1, et ATF5, des protéines de réponse au stress connues à interagir avec Nrf2 (DJ-1, PGAM5), ou ayant le potentiel d'interagir avec Nrf2 (ATF5), ont été évalués à travers le choc thermique de 42°C (voir Annexe A, data non publié). Sommairement, à 42°C, ces trois protéines semblent modulées par le niveau de Nrf2 et sont rédox-sensibles, car leurs niveaux sont significativement réduits par un traitement antioxydant générique (PEG-CAT et PEG-SOD) et même par MitoQ et apocynine. Une nouveauté spécifique de l'étude est dans le lien Nrf2-ATF5, car seulement une étude précédente publiée en septembre 2024 a pu démontrer l'impact de Nrf2 sur ATF5, et ce, dans des cardiomyocytes traitées avec de l'acide palmitique et/ou de la baicaléine (Guo *et al.*, 2024). À nos connaissances, notre étude est la première à confirmer ce lien dans le contexte d'un choc thermique, et les applications potentielles de ces résultats sont particulièrement pertinentes dans un contexte où Nrf2 détermine le destin cellulaire face à un stress chez les cancers par son rôle comme maître régulateur antioxydant (Bae *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2024a; Ngo et Duennwald, 2022; Suzuki *et al.*, 2023). À 42°C, le niveau protéique de DJ-1 est augmenté, et pourrait représenter un mécanisme par lequel Nrf2 est stabilisé. Le niveau de DJ-1 est particulièrement plus élevé dans les cellules TT, indiquant que le pré-traitement de 40°C pendant 3h prédispose la cellule à activer DJ-1, et donc potentiellement Nrf2. Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse. De plus, bien qu'ATF5 semble être modulé par Nrf2, son niveau protéique n'est pas significativement plus élevé dans les cellules TT. ATF5 démontre initialement un lien avec Nrf2, mais il

semble être masqué dans les cellules TT, où la modulation de Nrf2 n'impacte plus le niveau d'ATF5. Pour ce qui a trait à PGAM5, tous les traitements (antioxydants, KD ou OE de Nrf2, TT) réduisent le niveau protéique de PGAM5. Considérant son effet divers, pro- et anti-apoptotique dans la cellule selon le contexte et le type de stress (Cheng *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2021; Zeb *et al.*, 2021), il est difficile de tirer des conclusions solides sur l'impact de PGAM5. En toute certitude, nous pouvons affirmer qu'il est rédox-sensible et Nrf2-dépendant durant un choc thermique létal à 42°C, cependant.

4.2 Nrf2, ses partenaires d'interactions, et le stress thermique

4.2.1 Nrf1

Les protéines étudiées dans cette thèse ont toutes démontré un certain niveau de régulation par Nrf2. La surexpression ou la sous-expression de Nrf2, au niveau basal sans stress, a impacté la concentration protéique de Nrf1, PGAM5, DJ-1, et ATF5. Nos expérimentations avec les antioxydants PEG-CAT et PEG-SOD ont aussi démontré que ces protéines sont sensibles à l'état oxydatif de la cellule. Effectivement, en réduisant le niveau d'ERO cellulaires avec les antioxydants utilisés, nous avons, en absence d'un stress thermique, démontré que toutes les protéines subissaient une baisse d'expression.

La seule exception ici est Nrf1. Ce facteur nucléaire de respiration a vu ses niveaux diminuer lors d'un stress thermique, et augmenter lors d'une pré-administration d'apocynine. Considérant l'effet stimulant de Nrf1 sur le métabolisme cellulaire (Piantadosi *et al.*, 2008) ainsi que le lien proportionnel entre métabolisme et production d'ERO (Mailloux, 2020), il se peut que la réduction temporelle de Nrf1 lors d'un choc thermique léger à 40°C soit un mécanisme par lequel la cellule tente de mitiger les dommages oxydatifs. Cette réduction de Nrf1 en réponse à un stress a déjà été observé auparavant, mais Nrf1 avait un effet antioxydant cependant. Dans des cellules épithéliales bronchiales, la génération d'ERO par traitement de benzo(A)pyrène (BaP) a considérablement réduit les niveaux protéiques de Nrf1 (Zhang *et al.*, 2011). Cependant, le stress par administration de BaP ne changeait pas les niveaux d'ARNm de Nrf1, suggérant une répression traductionnelle ou une dégradation protéique amplifiée induite par stress oxydatif. Il se peut alors, dans notre cas, que les ERO induisent une répression de la traduction de l'ARNm de Nrf1. L'augmentation du niveau de Nrf1 par traitement d'apocynine vient renforcer cette hypothèse. Il se pourrait même que l'augmentation de Nrf1 représente une méthode alternative par laquelle l'apocynine peut réduire les ERO, car son inhibition par ARNsh semble exacerber la production d'ERO BaP-dépendante dans les cellules épithéliales bronchiales (Zhang *et al.*, 2011). De plus, des cellules H9C2, dérivées d'un muscle cardiaque murin, ont démontré une réduction importante d'ERO induits par hypoxie

lors de la surexpression de Nrf1 (Li *et al.*, 2021). Toutes mises ensemble, ces études indiquent une réduction ERO-dépendante de Nrf1, et que la restauration de Nrf1 pourrait en contrepartie réduire les dommages oxydatifs. En fin de compte, dans notre étude, il se pourrait que la réduction de Nrf1 par stress hyperthermique léger contribue elle-même à stimuler la production d'ERO. Ce phénomène Nrf1-ERO n'est pas encore totalement clarifié et semble dépendant du type cellulaire et du type de stress induit, car une autre étude a démontré un effet stimulant d'ERO mitochondriaux sur l'expression de Nrf1 dans les cellules WRL68 dérivées de HeLa (Lu *et al.*, 2021). Bien que cette étude mette en évidence l'effet protecteur de Nrf1, ils démontrent que son expression est positivement régulée par les ERO mitochondriaux.

Dans notre cas, un traitement d'apocynine a augmenté l'expression de Nrf1 tout en réduisant les ERO mitochondriaux, et la tendance était similaire lors d'une administration de MitoQ. De plus, l'administration de MitoQ a augmenté les niveaux protéiques de Nrf2, et la tendance était plus faible, mais similaire avec l'apocynine. Lorsqu'on réduit l'expression de Nrf2 (Nrf2 KD), il y a une tendance de réduction de Nrf1. Dans ces cellules Nrf2 KD, l'ajout d'apocynine induit une augmentation significative de Nrf1 à des niveaux plus élevés que le contrôle (WT), mais cet effet n'est pas noté avec l'ajout de MitoQ. Ces deux traitements restaurent Nrf2, mais seul l'apocynine stimule Nrf1. Connaissant la régulation positive de Nrf1 par Nrf2 (Piantadosi *et al.*, 2008), nos résultats semblent suggérer qu'il faudrait aussi une présence d'ERO mitochondriaux pour permettre cette régulation, venant supporter les résultats précédemment trouvés dans les cellules WRL68 (Lu *et al.*, 2021). La surexpression de Nrf2 dans les cellules HeLa a causé une réduction d'ERO mitochondriaux. Couplé avec cela, le niveau protéique de Nrf1 était significativement réduit dans ces cellules Nrf2 OE (observation personnelle non publiée). Nrf2, alors, ne semble pas suffisant pour maintenir l'activité de Nrf1, et pourrait requérir une co-activation via les ERO mitochondriaux.

4.2.2 DJ-1

L'interaction entre DJ-1 et Nrf2 est connue depuis longtemps (Clements *et al.*, 2006; Milani *et al.*, 2013; Raninga *et al.*, 2017); ces études démontrent une relation unidirectionnelle dans laquelle l'activité de Nrf2 est stimulée par sa déstabilisation du lien Keap1 par DJ-1. Nos résultats démontrent que DJ-1 est stimulée lors d'un choc thermique létal de 42°C, mais non à 40°C. Dans les deux cas, Nrf2 augmente à travers l'exposition temporelle à la chaleur. Ces résultats suggèrent que DJ-1 pourrait stimuler Nrf2 à 42°C, mais non à 40°C. De plus, le maintien stable des niveaux de DJ-1 à 40°C pourrait être en lien avec une présence insuffisante d'ERO. Lorsqu'on a traité les cellules HeLa avec du PEG-CAT ou PEG-SOD, les niveaux de DJ-1 ont diminué d'environ 90%, indiquant une dépendance de son niveau protéique aux ERO. Ceci est supporté

par des trouvailles précédentes démontrant un lien important entre le niveau protéique de DJ-1 et l'environnement rédox cellulaire (Barbieri *et al.*, 2018; Dash *et al.*, 2022; Shendelman *et al.*, 2004).

Notre étude apporte une nouveauté à la relation Nrf2-DJ-1 en démontrant le potentiel d'une régulation de DJ-1 par Nrf2. Dans les cellules Nrf2 KD, le niveau protéique de DJ-1 était significativement plus bas. C'était aussi le cas dans les cellules Nrf2 OE. Le stress thermique ne stimule pas une augmentation de DJ-1 dans les cellules Nrf2 KD ou OE. Seules les cellules de contrôle (WT) démontrent cette augmentation. Dans les cellules Nrf2 KD, il y a présence accrue d'ERO, mais une défaillance au niveau de Nrf2. Dans les cellules OE, il y a, au contraire, une présence plus importante de Nrf2, mais un niveau plus bas d'ERO. L'augmentation de DJ-1 dans les cellules contrôles présente un niveau putativement suffisant de Nrf2 et d'ERO, en contrepartie. Le traitement d'apocynine dans les cellules KD restaure Nrf2 tout en maintenant un niveau d'ERO similaire au contrôle. Ce traitement restaure aussi DJ-1 à des niveaux plus hauts que le contrôle. Ces résultats suggèrent que DJ-1 est non seulement régulé par le niveau oxydatif, mais qu'il le serait de manière Nrf2-dépendante.

La régulation de DJ-1 par Nrf2 est très peu étudiée, car le dogme stipule que DJ-1 agit en amont de Nrf2. Cependant, considérant ces résultats, Nrf2 pourrait influencer des facteurs en amont de DJ-1. Une possibilité intéressante inclurait la régulation potentielle via la glutarédoxine 1 (Grx1). Cette protéine a déjà été démontrée à positivement réguler DJ-1 en amont dans certaines lignées neuronales (Johnson *et al.*, 2016). Grx1 représente une cible connue activée par Nrf2 via un ARE dans son promoteur (Chen *et al.*, 2024b; Liu *et al.*, 2016). Il se pourrait, alors, que DJ-1 soit activée par Nrf2 en induisant l'expression de Grx1, formant une boucle régulatoire entre DJ-1 et Nrf2. Pour valider cette hypothèse, il faudrait surexprimer Grx1 dans des cellules Nrf2 KD pour voir si on peut restaurer l'activité de DJ-1. Il faudrait aussi confirmer la sous/surexpression de la Grx1 dans les lignées KD et OE pour Nrf2. En résumé, nos résultats suggèrent que la relation entre DJ-1 et Nrf2 semble interagir dans une boucle, plutôt que dans une linéarité dans laquelle DJ-1 est en amont de Nrf2. DJ-1 représenterait un activateur important de Nrf2 dans un stress létal de 42°C, mais Nrf2 semble réguler DJ-1 de manière ERO-dépendante dans un stress létal de 42°C et ainsi que léger de 40°C.

La boucle protéique entre DJ-1 et Nrf2 semble particulièrement importante au niveau de la thermotolérance. Un pré-traitement à 40°C n'active pas DJ-1 par soi-même, selon nos résultats du chapitre 2 (Hraoui *et al.*, 2025). Cependant, le préconditionnement semble stimuler à la hausse le niveau protéique

de DJ-1 subséquemment à 42°C. Les cellules TT possédaient un niveau significativement plus élevé de DJ-1 que les cellules contrôle. Le niveau de Nrf2 était aussi plus élevé. Considérant la relation activatrice de DJ-1 et Nrf2, il se pourrait que DJ-1 soit partiellement responsable de la suractivation de Nrf2 dans les cellules TT. De plus, dans les cellules TT pré-traitées avec MitoQ, le niveau de DJ-1 tombe à 50% relatif au contrôle. Ce double traitement réduit aussi le niveau protéique de Nrf2 significativement, suggérant que cette activation de Nrf2 par DJ-1 est soutenue par des ERO mitochondriaux. Le pré-traitement par apocynine avant le préconditionnement à 40°C mène à des résultats similaires pour DJ-1 et Nrf2 (observation personnelle non publiée), mettant en valeur une activation de l'axe DJ-1 et Nrf2 par les ERO dérivées des NOX aussi. En revanche, l'apocynine administrée avant la TT ne réduit pas l'efficacité de la thermotolérance au niveau de la viabilité cellulaire, indiquant soit que les ERO dérivées de NOX ne sont pas aussi critiques pour l'effet protecteur que les ERO mitochondriaux, ou soit que l'apocynine engendre un effet protecteur lui-même qui masque la perte du signal activateur ERO (observation personnelle non publiée).

4.2.3 PGAM5

PGAM5 est probablement la protéine avec le rôle le plus complexe à définir dans le contexte de cette thèse. Cette complexité provient du fait que PGAM5 joue plusieurs rôles parallèlement. Tel que mentionné dans l'introduction, PGAM5 interagit directement avec Nrf2 et Keap1 pour former un complexe ternaire rédox-sensible à la membrane externe mitochondriale (Lo et Hannink, 2008; Zeb *et al.*, 2021). Lors d'un stress oxydatif assez important, PGAM5 devient clivée et relâche Nrf2 et Keap1 dans l'optique de permettre la translocation de Nrf2 au noyau. PGAM5 peut aussi jouer un rôle dans l'induction de la mitophagie (Zeb *et al.*, 2021). PGAM5 peut naturellement se lier à Keap1 (tel que dans le complexe ternaire Nrf2-Keap1-PGAM5) à la membrane mitochondriale. Elle peut se lier à Keap1 sans Nrf2 aussi. Cette interaction protéine-protéine peut se retrouver à la membrane mitochondriale. L'oxydation de Keap1 par les ERO permet la dissociation de PGAM5, de manière similaire à Nrf2. Une fois libérée de Keap1, PGAM5 peut interférer dans la translocation partielle de PINK1 à l'intérieur de la mitochondrie. Conséquemment, PGAM5 promeut l'accumulation de PINK1 à la membrane mitochondriale, créant un signal d'induction mitophagique (Zeb *et al.*, 2021). Cette voie de réponse cellulaire améliore la survie et rend la cellule plus résistante à des stress variés, dont la chaleur, en recyclant les mitochondries défectueuses.

D'un autre côté, PGAM5 peut jouer un rôle beaucoup plus variable (Fig. 4.1). En fait, dans les cellules HeLa, PGAM5 a été associée avec l'induction des processus de fission mitochondriale, de motilité

mitochondriale, de nécroptose, de mitophagie, et d'apoptose (Cheng *et al.*, 2021). Dépendamment de ses partenaires d'interaction, le rôle de PGAM5 est modulable. PGAM5 peut déphosphoryler « Dynamin-Related Protein 1 » (Drp1) à Ser-637 pour induire de la fragmentation mitochondriale (Wang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015). Parallèlement, le complexe ternaire Keap1-Nrf2-PGAM5 emprisonne Keap1 et réduit sa liaison à d'autres protéines. Miro2, une protéine essentielle pour le mouvement mitochondrial sur le cytosquelette, est généralement dégradée par un protéasome de manière Keap1-dépendante. La séquestration de Keap1 par PGAM5-Nrf2 permet la stabilisation de Miro2, et maintient la motilité mitochondriale durant un stress (O'Mealey *et al.*, 2017). PGAM5 a déjà été démontrée à pouvoir stimuler la biogenèse mitochondriale Nrf1 et TFAM-dépendante en augmentant la transcription en amont de PGC1- α (Hong et Lee, 2018). Ceci peut stimuler la production d'ATP et soutenir une demande énergétique accrue lors d'un stress.

PGAM5 peut aussi protéger contre l'induction de l'apoptose durant des stress plus légers en se liant à la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Cheng *et al.*, 2021). PGAM5 peut déphosphoryler Bcl-xL à Ser-62, augmentant sa capacité à séquestrer certaines protéines pro-apoptotiques telles que Bak et Bax (Ma *et al.*, 2020). Sous stress sévère, au contraire, PGAM5 promeut l'apoptose. L'isoforme long de PGAM5 (PGAM5-L) recrute Drp1 et Bax à la membrane mitochondriale externe dans un complexe ternaire. Ensuite, ce complexe induit la fission mitochondriale, augmente la perméabilité de la membrane, et permet l'échappement du cytochrome c. Conséquemment, il y a induction d'apoptose PGAM5-dépendante (Xu *et al.*, 2015). Selon les caractéristiques des cellules et tissus impliqués et selon le degré de stress, PGAM5 peut aussi moduler une induction de nécroptose (Wang *et al.*, 2012). En effet, il a été démontré qu'une déplétion de PGAM5 réduit significativement la nécroptose médiée par TNF- α , les ionophores calciques, ainsi que les ERO dans des cellules HeLa (Wang *et al.*, 2012). Cependant, cette relation avec TNF- α , présente dans un modèle cellulaire humain, n'est pas présente dans un modèle murin (Remijsen *et al.*, 2014), indiquant une variabilité possiblement liée à l'espèce. Dans le contexte d'un stress thermique en particulier, il n'existe qu'une étude déjà parue sur l'implication de PGAM5, et elle implique un modèle de drosophile (Ishida *et al.*, 2012).

Ishida *et al.* ont trouvé qu'une déplétion totale de PGAM5 chez la drosophile rendait l'animal significativement plus sensible à des chocs thermiques, indiquant un effet protecteur de cette protéine dans ce modèle (Ishida *et al.*, 2012). L'absence d'études sur le rôle de PGAM5 lors d'un choc thermique,

en addition à l'implication variable de PGAM5 dans les réponses aux stress, rendent la clarification de son rôle assez difficile dans le contexte de cette thèse.

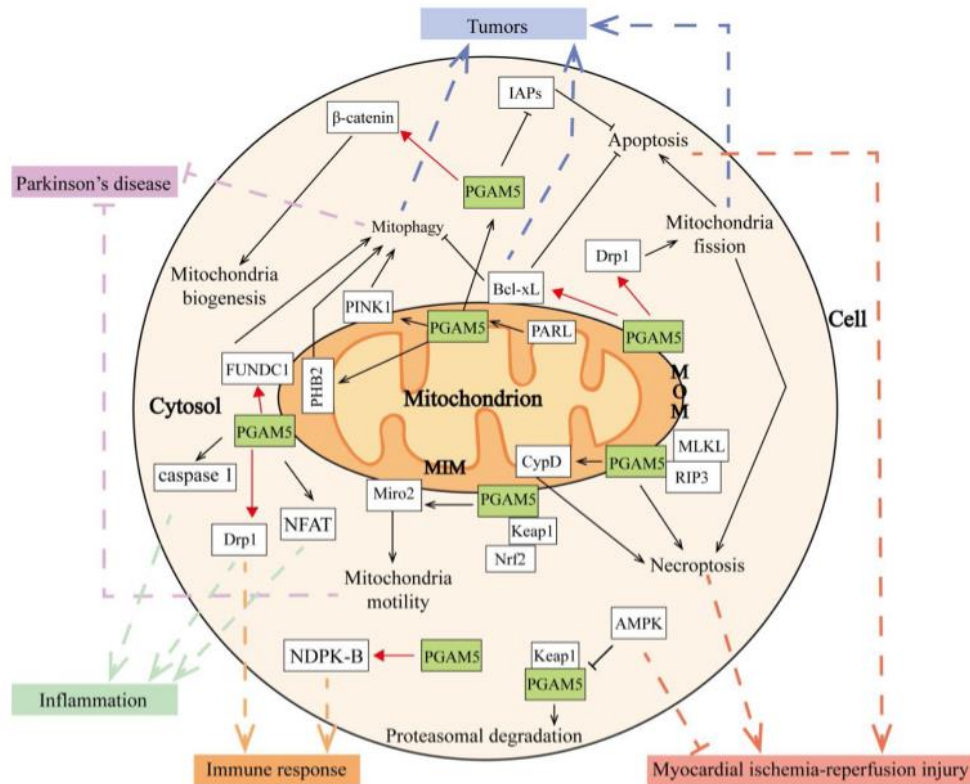


Figure 4.1 Les voies de réponses au stress impliquant PGAM5. PGAM5, une protéine mitochondriale, agit sur plusieurs voies de signalisation cellulaire, impliquées dans les processus de biogenèse mitochondriale, mitophagie, apoptose, fission mitochondriale, motilité mitochondriale et nécroptose. Cette influence de PGAM5 la rend une cible intéressante lors de l'étude de pathologies telles que l'inflammation chronique, certaines défaillances immunitaires, la maladie de Parkinson's, ou les blessures causées par des réperfusions ischémiques myocardiques. FUNDC1 : FUN14 domain-containing protein 1, Drp1 : Dynamin-related protein 1, NFAT : Nuclear factor of activated T cells, NDPK-B : Nucleoside diphosphate kinase B, Miro2 : Mitochondrial Rho GTPase 2, RIP3 : Receptor interacting protein 3, MLKL : Mixed lineage kinase domain like pseudokinase, IAPs : Inhibitors of apoptosis, PINK1 : PTEN-induced kinase 1, CypD : Cyclophilin D, PARL : Presenilin associated rhomboid like, PHB2 : Prohibitin 2, Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large. Tiré de Cheng *et al.* (2021)

Nos résultats démontrent que PGAM5 est modérément clivée à 40°C, et qu'à 42°C, il y a une accumulation générale de PGAM5. Un traitement d'apocynine et de MitoQ réduisent significativement le niveau protéique de PGAM5 à 42°C, mais non à 40°C. Un traitement antioxydant de PEG-CAT ou PEG-SOD réduit aussi le niveau de PGAM5, fournissant une preuve que le traitement avec apocynine ou MitoQ agit sur PGAM5 par leur effet inhibant d'ERO, et non de manière secondaire. La sensibilité rédox de PGAM5

pourrait alors dépendre du degré de chaleur auquel la cellule est exposée. La surexpression ou la sous-expression de Nrf2 réduisent significativement le niveau de PGAM5. Comme DJ-1, dans nos études, PGAM5 semble requérir obligatoirement une présence suffisante d'ERO, ainsi que Nrf2 pour maintenir son activité. Ces ERO doivent nécessairement provenir de la mitochondrie, car un traitement de MitoQ sur des cellules Nrf2 KD ne restaure pas PGAM5 tout en restaurant Nrf2. Considérant son origine mitochondriale (Liang *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2020), cette relation n'est pas surprenante.

Dans nos cellules TT, le niveau général de PGAM5 est significativement plus bas que dans les cellules contrôle. Considérant le rôle pro-apoptotique de PGAM5 lors d'un stress sévère (Cheng *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2015), il se pourrait que la réduction de PGAM5 représente un mécanisme par lequel la thermotolérance augmente la viabilité cellulaire. Un pré-traitement des cellules TT avec du MitoQ inverse l'effet protecteur de TT, et semble être accompagné par une augmentation significative du niveau de PGAM5 non-clivé. Le niveau clivé tend dans cette direction, mais reste similaire aux cellules TT. La création du complexe ternaire PGAM5-Bax-Drp1 pro-apoptotique à la membrane mitochondriale requiert la forme non clivée de PGAM5 pour induire l'apoptose via relâchement de cytochrome c (Xu *et al.*, 2015). Ainsi, il est possible que l'augmentation de PGAM5 non clivé dans les cellules TT prétraitées avec du MitoQ représente un axe cellulaire par lequel l'apoptose est promue.

D'un autre côté, les cellules Nrf2 OE démontraient une viabilité plus importante en relation aux cellules de contrôle, et détenaient aussi un niveau plus bas de PGAM5. Les cellules Nrf2 KD possédaient aussi un niveau protéique moins important de PGAM5, mais démontraient une viabilité significativement réduite. Il semble alors, que la favorisation de la survie par réduction de PGAM5 doit être accompagnée par un niveau suffisant de Nrf2. On retrouve un niveau plus élevé de Nrf2 dans les cellules TT, et le pré-traitement de ces cellules par MitoQ augmente le niveau de PGAM5 non clivé tout en réduisant le niveau de Nrf2. Ces résultats semblent confirmer la nécessité de Nrf2 avec une réduction de PGAM5 pour favoriser la survie cellulaire dans les cellules TT. Pour valider ces résultats, il faudrait sur et sous-exprimer PGAM5 et observer l'impact de cette modulation sur la survie cellulaire dans les cellules TT. La création d'un double mutant avec Nrf2 et PGAM5 pourrait aussi représenter un modèle valable pour valider les hypothèses présentées.

4.2.4 ATF5

La relation d'ATF5, un régulateur crucial de la réponse UPR mitochondriale, avec Nrf2 a seulement été étudiée une seule fois jusqu'à présent (Guo *et al.*, 2024). Cette étude de Guo *et al.* se penchait sur la

relation Nrf2-ATF5 dans un contexte de dysfonction cardiaque. Le type cellulaire, le tissu, ainsi que le stress impliqué, était notamment divergent entre cette étude et la nôtre. Malgré cela, ils ont démontré, pour la première fois, une régulation de ATF5 par Nrf2. Selon cette étude, la UPR mitochondriale serait inhibée par Nrf2, impliquant une régulation négative de la mtUPR dans les cardiomyocytes. Leur plan expérimental utilisait la « baicaleine », un agent pharmacologique, pour activer Nrf2 dans l'optique de réduire les dommages oxydatifs aux cardiomyocytes induits par exposition au sodium palmitate. Leurs résultats démontraient une amélioration dose-dépendante et Nrf2-dépendante de la viabilité cellulaire lorsque traitées avec l'agent pharmacologique ci-dessus. Cette amélioration était aussi associée avec une inhibition Nrf2-dépendante de la mtUPR, telle qu'observé par une baisse du niveau de biomarqueurs de la mtUPR, incluant ATF5. Ils ont conclu que Nrf2 avait un effet protecteur face à ce type de stress, et pouvait inhiber la mtUPR en restaurant l'équilibre homéostatique. Ils se basent sur le fait qu'une suractivation chronique de la mtUPR peut, à la place de protéger la cellule, induire l'apoptose via caspase 3 (Gupta et Knowlton, 2005). Cependant, ils n'ont pas démontré que la mtUPR, dans leur étude, contribuait à la mort cellulaire par apoptose. De plus, ils n'ont pas considéré la possibilité que la réduction de la mtUPR, par proxy d'une réduction de ATF4, ATF5, et CHOP, pouvait résulter d'un environnement cellulaire plus sain et moins oxydatif causé par une activation pharmacologique de Nrf2. En résumé, leur étude met en valeur un lien Nrf2-ATF5, mais présente une 'interprétation incomplète.

Notre étude présente, avec des cellules et un stress complètement différent, des résultats contraires à l'étude précédente. Nos résultats mettent en valeur une régulation positive de ATF5 par Nrf2. Au niveau basal, la surexpression de Nrf2 augmente le niveau protéique d'ATF5, et la sous-expression de Nrf2 réduit significativement sa concentration. Au fil du stress thermique, les cellules de contrôle voyaient une augmentation d'ATF5. Les cellules Nrf2 KD maintenaient un niveau bas sans changement, et les cellules Nrf2 OE ont même vu une diminution du niveau protéique d'ATF5 à travers le temps. Considérant le niveau bas d'ERO dans les cellules Nrf2 OE, et que l'induction d'ATF5 et du mtUPR est ERO-dépendante (Fiorese *et al.*, 2016; Lian *et al.*, 2024; Sears et Angelastro, 2017), nous pouvons supposer que la baisse d'ATF5 observée chez les cellules Nrf2 OE pourrait être attribuée à l'environnement moins oxydatif. Nos traitements de PEG-CAT et PEG-SOD démontrent que l'augmentation temporelle d'ATF5 à 42°C est ERO-dépendante. Cette augmentation est aussi absente dans les cellules Nrf2 KD. Ces résultats suggèrent une double activation d'ATF5 par Nrf2 et les ERO lors d'un stress thermique. Plus spécifiquement, nos traitements d'apocynine et de MitoQ démontrent que ces ERO peuvent provenir de la mitochondrie, ou même des NOX. Il est connu que les NOX peuvent se localiser à la membrane mitochondriale

externe (Block *et al.*, 2009; Kuroda *et al.*, 2010). L'impact plus important de l'apocynine que de MitoQ sur ATF5 pourrait être expliqué par cette localisation membranaire mitochondriale.

Suivant le préconditionnement à 40°C, les cellules TT ne démontrent plus de différences significatives d'ATF5 en comparaison aux cellules Nrf2 KD/OE. Il y a un(des) facteur(s) inconnu(s) qui mitige les différences initialement présentes dans les trois lignées cellulaires TT variant l'expression de Nrf2 (TT, Nrf2 KD, Nrf2 OE TT). Ces facteurs pourraient inclure des activateurs directs d'ATF5 sensibles à la chaleur comme « Heat shock factor protein 1 » (HSF1), ou plus indirects tel que « NAD-dependent deacetylase sirtuin-3, mitochondrial » (SIRT3) (Zhou *et al.*, 2022b). Sinon, l'explication pourrait être aussi reliée aux ERO produites durant le stress léger à 40°C. Il se pourrait que ces ERO suffisent à mitiger les différences initialement présentes dans les trois lignées cellulaires en ce qui a trait à ATF5. Ainsi, ce stress initial, produisant des ERO, pourrait palier la réduction d'ATF5 basale dans les cellules Nrf2 KD. Le pré-traitement de cellules TT avec MitoQ semble corroborer cette hypothèse, car le niveau d'ATF5 dans ces cellules TT avec MitoQ tend à être plus bas que dans les cellules TT sans pour autant être significativement différent.

Plus simplement, en éliminant le préconditionnement à 40°C de l'équation, ATF5 joue un rôle de réponse au stress. Dans la mtUPR, ce rôle implique la maintenance des fonctions de l'OXPPOS en protégeant l'intégrité des protéines du STE, entre autres. Spécifiquement, pour accomplir cela, ATF5 peut induire l'expression de HSP27, HSP60 et de la mtHSP70 dans les cardiomyocytes (Paerhati *et al.*, 2022). La HSP27 est activée en particulier lors d'un stress hyperthermique. Considérant le rôle de Nrf2 dans l'activation des HSPs (Bozaykut *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2024a; Teng *et al.*, 2019), et considérant la relation régulatoire de Nrf2 sur ATF5 démontrée dans nos résultats, il se pourrait que la voie Nrf2-ATF5 représente une nouvelle explication mécanistique par laquelle les HSPs peuvent être modulées. De plus, ATF5 peut contrôler l'activité de dégradation protéique via le protéasome mitochondrial LONP1 (Deng et Haynes, 2017; Fiorese *et al.*, 2016). Sous stress, LONP1 promeut, de manière ATF5-dépendante, la protéostasie mitochondriale. Nos résultats démontrent que Nrf2 réduit le niveau d'ERO cellulaires en agissant sur les ERO mitochondriaux. La voie ATF5-LONP1-HSP pourrait représenter un mécanisme régulatoire par lequel se traduit cette réduction.

Dans un contexte oncologique, l'importance d'ATF5 ne peut être sous-estimée. Elle joue un rôle primordial au sein de l'apoptose, l'autophagie, la tumorigenèse, ainsi que la migration et invasion cancéreuse (Paerhati *et al.*, 2022). Nrf2, de son côté, est connu comme un facteur pro-oncologique au sein

des cancers, car il permet la maintenance de l'environnement très oxydatif des cancers (Bae *et al.*, 2024; Ngo et Duennwald, 2022; Panieri *et al.*, 2022). Nrf2 agit, dans un modèle cellulaire cancéreux exposé à un stress hyperthermique, en stimulant l'autophagie et inhibant l'apoptose par réduction d'ERO (Grondin *et al.*, 2024). Sa favorisation de la prolifération dans les cancers est aussi bien connue (Ngo et Duennwald, 2022; Telkoparan-Akillilar *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2019). En comparaison, les mécanismes cellulaires affectés par Nrf2 et ATF5 semblent parallèles. Dans un contexte hyperthermique et oncologique, on pourrait, selon nos résultats, émettre l'hypothèse que le rôle de Nrf2 dans ces processus pourrait requérir l'activation d'ATF5. Cette avenue serait particulièrement intéressante au niveau thérapeutique, et représenterait une nouvelle avenue pour cibler l'impact de Nrf2 en aval, mais il faudrait tester et valider cette spéculation.

4.3 Limites de la thèse

Bien que les travaux de cette thèse aient clarifié la relation entre ERO, Nrf2 et ses partenaires d'interactions, et le stress hyperthermique, les manipulations menées de manière *in vitro* engendrent inévitablement des limites scientifiques qui peuvent affecter l'interprétation des résultats. Ces limites doivent être considérées lors de l'interprétation des résultats et de leurs répercussions. Cependant, ces limites n'affectent pas la validité scientifique présentée, qui avancent notre compréhension des mécanismes sous-jacents dans l'hyperthermie comme traitement anticancer. Ces limites ont été brièvement abordées dans la discussion de chaque article, mais seront développées dans cette dernière section de la discussion.

4.3.1 Apocynine et MitoQ

L'apocynine, aussi connue sous les noms de 4-hydroxy-3-méthoxyacétophénone ou acétovanillone, est un inhibiteur puissant des NOX (Chocry et Leloup, 2020). Il existe au-dessus d'une dizaine d'inhibiteurs associés aux NOX, mais l'apocynine est généralement le plus utilisé (Chocry et Leloup, 2020). Cette molécule est un catécholamine antioxydant puissant (Beura *et al.*, 2022). Initialement dérivée des racines de l'espèce végétale *Apocynum cannabinum*, elle a été décrite pour la première fois en 1883 (Stefanska et Pawliczak, 2008). Son effet inhibiteur sur les NOX provient de sa capacité à inhiber la translocation à la membrane de la sous-unité p47^{phox} (Barbieri *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2001). Cette sous-unité est présente dans tous les isoenzymes des NOX, et est critique dans leur fonction oxydative (Vermot *et al.*, 2021). Pour

s'activer, elle doit se convertir à un homodimère via oxydation par des peroxydases (Johnson *et al.*, 2002). Ce dimère est beaucoup plus efficace dans sa fonction inhibitrice que l'apocynine naturelle elle-même. Cet agent pharmacologique peut fortement réduire le stress oxydatif induit par des NOX, et il était, à un certain temps, considéré pour développer une thérapie basée sur son ingestion pour traiter plusieurs pathologies exacerbées par les ERO (Chocry et Leloup, 2020; Stefanska et Pawliczak, 2008). Cet objectif a largement été abandonné de nos jours, car cette molécule peut présenter une gamme de cibles secondaires non-relées aux NOX.

Le récepteur aryle hydrocarbure (AhR) peut positivement et négativement réguler l'expression de plusieurs gènes reliés à la détoxification oxydative. Il peut être activé par des contaminants environnementaux, et son activité a été démontrée comme requérant la sous-unité p47^{phox} pour être proprement maintenue (Pinel-Marie *et al.*, 2009). Considérant l'interaction par laquelle l'apocynine se lie à cette sous-unité, elle peut interrompre le fonctionnement des AhRs, et donc influencer l'expression des gènes sous le contrôle de AhR (Pinel-Marie *et al.*, 2009). L'apocynine peut aussi influencer l'expression de gènes métaboliques et de stress tels que PI3K, Akt, et CREB (Choi et Lee, 2012). Un nouvel agent, nommé mitoapocynine, a été développé après avoir remarqué que l'apocynine peut agir sur le stress oxydatif mitochondrial (Mahmood *et al.*, 2021). De plus, il est hypothétisé que l'effet protecteur de l'apocynine dans les ostéoblastes peut être expliqué par son activation de Nrf2 (Zhang *et al.*, 2023b). Considérant le potentiel hors-cible de l'apocynine, il se pourrait que son effet antioxydant ne soit pas directement lié à sa capacité inhibitrice des NOX. L'interprétation des résultats impliquant cet agent doivent alors considérer ses effets secondaires potentiels. Pour contourner certaines de ces limites autour de l'apocynine, nous pourrions mettre en œuvre des études qui, au lieu d'inhiber chimiquement les NOX, pourraient utiliser une inactivation des sous-unités des NOX par modification génétique. En effet, il serait même possible alors de non seulement cibler les NOX en particulier, mais aussi de noter quelles isoenzymes sont responsables de la production d'ERO, en plus des sous-unités requises. Cependant, cette approche demande un projet très vaste, et représente potentiellement une thèse en soi. La possibilité d'explorer l'implication des NOX, dans le futur, devra peut-être se pencher sur cette méthode, mais elle amène aussi ses limites. L'utilisation d'un double mutant (NOX, Nrf2) pourrait engendrer des modifications énormes à plusieurs voies cellulaires, et donc aussi limiter la précision et l'interprétation des résultats tirés de cette étude hypothétique.

MitoQ est un antioxydant spécifique à la mitochondrie (Hu *et al.*, 2018; Tsui et Li, 2023; Zhou *et al.*, 2018b). Il fonctionne en conjuguant la coenzyme Q10 (CoQ10) à un cation lipophile, permettant son accumulation dans la mitochondrie (Zinovkin et Zamyatnin, 2019). Une fois dans la mitochondrie, il possède un mécanisme d'action réutilisable. Lorsqu'elle neutralise le superoxyde, elle peut se régénérer par des mécanismes d'action similaires à la régénération de la CoQ10. Ces mécanismes peuvent soit impliquer une régénération dépendante du C1, CIII, la GSH, ou de la thioredoxine. Elle peut « donner » des électrons et ainsi retrouver sa forme réduite à nouveau (Zinovkin et Zamyatnin, 2019). Il a été récemment démontré que MitoQ peut stimuler l'activité de Nrf2 en déstabilisant son lien avec Keap1 dans des cellules intestinales ou neuronales (Hu *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018b). Ce mécanisme d'action peut contribuer à l'effet antioxydant connu de MitoQ. Dans notre étude, nous avons trouvé que MitoQ peut stimuler Nrf2 lors d'un stress thermique dans des cellules cancéreuses épithéliales. Ainsi, il est difficile de distinguer entre l'effet antioxydant direct par interaction avec les ERO, et l'effet antioxydant indirect par stimulation de Nrf2. De plus, en pouvant stimuler Nrf2, MitoQ peut aussi induire des changements métaboliques (Zakic *et al.*, 2023). Ces changements pourraient créer un effet papillon par lequel il y a sur- ou sous-production indirecte d'ERO en lien avec les changements métaboliques Nrf2-dépendants. Ainsi, l'utilisation de MitoQ demeure la meilleure option, mais il faut considérer son effet activateur sur Nrf2.

4.3.2 Nrf2 et ses partenaires d'interactions

Une partie de cette thèse se penche sur l'interaction entre Nrf2 et Nrf1/DJ-1/PGAM5/ATF5. La relation entre ces protéines et Nrf2 a été clarifiée par l'utilisation de lignées KD et OE pour Nrf2. De plus, nous avons explicité l'activité de ces protéines face à un stress hyperthermique léger de 40°C, et sévère de 42°C. Cependant, l'effet de ces protéines au niveau du stress et de la survie cellulaire a seulement été spéculé par utilisation de la littérature déjà présente. Même si nous connaissons l'impact supposé de DJ-1, par exemple, il demeure important de valider l'activité de cette protéine dans notre contexte hyperthermique. Pour ce faire, nous devrions utiliser des lignées KD et OE spécifiques à chaque protéine étudiée pour évaluer l'impact au niveau du stress oxydatif, et, concrètement, au niveau de la survie cellulaire en relation avec un choc thermique sévère de 42°C. Alternativement, il serait possible d'utiliser des activateurs et des inhibiteurs chimiques pour chacune des protéines, si un est connu. Cette procédure, en revanche, pourrait cependant mener à des effets secondaires hors cibles, tels qu'avec MitoQ et l'apocynine.

Concrètement, nos résultats ont explicité la relation entre Nrf2 et plusieurs protéines; nous avons proposé des hypothèses impliquant ces protéines. Ces hypothèses devront être validées, cependant, et en

attendant, l'implication des protéines étudiées demeure spéculative. De manière empirique, nous avons démontré l'implication de Nrf2 dans le développement de la thermotolérance transitoire ainsi que son activation par ERO mitochondriaux.

CONCLUSION

Cette thèse, qui est le résultat d'une demi-décennie de travaux ardents, valide des années d'expérimentations précédemment menées dans notre laboratoire. Elle démontre à nouveau l'implication de Nrf2 dans la résistance de cellules cancéreuses à la chaleur. Cependant, nos travaux vont un pas plus loin. Les travaux précédents ont caractérisé une thermotolérance, issue d'un préconditionnement à 40°C. Pour donner suite à cela, nous avons pu démontrer que cette thermotolérance est induite par Nrf2, et dépend de son niveau protéique. Nous avons démontré l'implication de plusieurs processus cellulaires, tels que l'autophagie, et l'induction des HSP, dans ce phénomène. Dernièrement, les travaux qui précédaient ma thèse ont fourni des preuves pour impliquer les ERO dans l'établissement de la résistance à la chaleur. C'est à partir de ce point que ma thèse s'insère dans la ligne de temps du laboratoire. Elle cherchait à caractériser l'origine des ERO, ainsi que leur impact source-dépendante sur la viabilité, et la résistance à la chaleur. Cependant, considérant les plus de 41 sources possibles d'ERO dans la cellule mammifère (Averill-Bates, 2024; Sies *et al.*, 2022; Sies et Jones, 2020), un projet doctoral ne suffirait pas pour évaluer la contribution proportionnelle de chaque source dans un contexte de stress hyperthermique. Donc, à cette issue, nous nous sommes concentrés sur les sources les plus probables : la mitochondrie et les NOX.

L'innovation de cette thèse réside dans plusieurs aspects. Premièrement, nous avons démontré l'origine (partielle du moins) mitochondrie et NOX-dépendante des ERO produits à 40°C et 42°C. Deuxièmement, l'implication différentielle des ERO en lien avec leur origine a été explicitée. Bien que les NOX produisent une importante quantité d'ERO, il semble que les ERO mitochondriaux soient primordiales dans l'établissement de la thermotolérance. De plus, cette tolérance passe nécessairement par l'axe cellulaire de Nrf2. Troisièmement, l'interaction entre les ERO, Nrf2, et plusieurs partenaires protéiques a été démontrée. Le lien régulateur entre Nrf2 et Nrf1/PGAM5/DJ-1/ATF5 dans un contexte hyperthermique n'a jamais été élucidé jusqu'à présent, et, ce projet doctoral représente la première étape dans cette étude. En particulier, la modulation potentielle d'ATF5 par Nrf2 n'a été étudiée qu'une seule fois à présent (Guo *et al.*, 2024). Ce lien pourrait représenter une avenue complètement innovante par laquelle Nrf2 pourrait agir sur les ERO mitochondriaux, créant une boucle régulatoire entre ERO et Nrf2 pour putativement moduler le degré de réponse à un stress thermique. Comme tout travail, si cette thèse a réussi à élucider certaines interactions mécanistiques importantes, nos résultats présentent de nouveaux questionnements fondamentaux sur toutes les voies cellulaires caractérisées dans ce projet.

Bien qu'un énorme travail entrepôt prend sa fin, il présente l'opportunité d'approfondir nos connaissances acquises dans les dernières cinq années en développant sur les fondations bâties par notre travail. Plusieurs perspectives potentielles s'avèreraient pertinentes. En premier lieu, ce projet caractérise l'implication de deux sources d'ERO seulement. Considérant les dizaines d'autres sources possibles, il serait pertinent de se pencher sur leur contribution proportionnelle ou même sur les facteurs cellulaires pouvant amplifier cette production. Ces sources peuvent inclure la xanthine oxydase, la NADPH-P450 réductase, les réactions d'oxydation d'acide gras dans les peroxyosomes, etc. (Averill-Bates, 2024; Zeeshan *et al.*, 2016). Idéalement, une étude de base, utilisant des inhibiteurs spécifiques à plusieurs sources, pourrait caractériser l'implication plus vaste de multiples sources d'ERO lors d'un stress thermique. Ensuite, à l'aide des résultats obtenus, nous pourrions cibler les sources les plus importantes et évaluer leur implication signalétique dans l'induction d'une résistance Nrf2-dépendante.

Une autre avenue future impliquerait la clarification mécanistique des ERO produits dans la mitochondrie. Par exemple, le calcium présent dans le réticulum endoplasmique peut stimuler la production d'ERO mitochondriaux (Zeeshan *et al.*, 2016). Lors d'un stress persistant au réticulum endoplasmique, il y a une libération calcique qui est récupérée par la mitochondrie. Ceci cause une augmentation du taux métabolique mitochondrial, et donc de la production d'ERO (Zeeshan *et al.*, 2016). Notre thèse a bien caractérisé l'importance des ERO mitochondriaux, mais l'explication mécanistique derrière cette production demeure non élucidée. Outre le potentiel oxydatif associé avec la stimulation par le calcium, il existe douze sources distinctes d'ERO liées avec l'OXPPOS et l'utilisation de substrats (Mailloux, 2020). Du CI, CIII, à l' α -cétooglutarate déshydrogénase, plusieurs mécanismes existent dans la mitochondrie ayant le potentiel de produire ces ERO. Cependant, il existe une limite méthodologique dans l'étude de ces sources. Pour que certains agents pharmacologiques pertinents puissent pénétrer dans la mitochondrie, il faudrait perméabiliser la membrane en utilisant soit de la saponine, soit de la digitonine (Malabed *et al.*, 2020). Ce processus, par sa perméabilisation non spécifique de toute membrane lipidique, peut fortement perturber l'homéostasie cellulaire (Sackin et Palmer, 2008). Cette perturbation pourrait introduire un biais dans les résultats obtenus subséquemment, car la cellule ne se retrouve plus dans un état physiologiquement neutre. Pour contourner cette limitation, notre étude a considéré la mitochondrie comme une source singulière. Avec le développement de nouvelles méthodes, et de nouveaux agents pharmacologiques, nous pourrions séparer, et étudier les sources internes présentes dans cet organe.

D'un autre côté, cette thèse a décrit plusieurs interactions protéiques ayant le potentiel d'impliquer Nrf2. Tel que mentionné précédemment, les protéines étudiées (Nrf1, PGAM5, DJ-1, et ATF5) jouent un rôle bien défini dans les réponses aux stress, mais ce rôle n'a pas été empiriquement validé par nos travaux. Pour ce faire, il faudrait créer des lignées KD et OE pour toutes les protéines d'intérêt, et ensuite les exposer aux stress variés de cette thèse. En observant l'impact de leur sous- ou surexpression sur la viabilité cellulaire, sur la production d'ERO, et globalement, sur l'acquisition d'une résistance hyperthermique, nous pourrions confirmer ou infirmer les hypothèses mécanistiques mises de l'avant dans ce projet. En particulier, le rôle de PGAM5, considérant son potentiel variable, servirait à valider son impact anti-apoptotique durant un stress modéré, et pro-apoptotique durant un stress sévère. Bien qu'on ait prouvé sa régulation par Nrf2, son rôle lors de l'acquisition d'une résistance transitoire demeure à élucider.

Les travaux de cette thèse ont porté exclusivement sur la régulation au niveau de l'expression protéique. Cependant, un énorme aspect régulateur n'est pas exploré dans ces travaux : l'expression génétique. Nous n'avons pas exploré l'impact de nos manipulations sur les niveaux d'ARNm. En particulier, les niveaux d'ARNm de Nrf2 pourraient nous informer sur la modulation de son activité. Il se pourrait que, lorsqu'activé et fortement exprimé, il y ait soit une surexpression de l'ARNm de Nrf2, une stabilisation de l'ARNm menant à une augmentation de Nrf2, ou même une combinaison de ces deux aspects. Cette augmentation de l'ARNm pourrait être régulée par un déroulement plus noté de l'ADN encadrant son gène. De plus, l'impact génétique de Nrf2 sur toutes les protéines étudiées pourrait définitivement clarifier certains liens régulatoires.

En dernier exemple, dans l'optique de bonifier nos bases acquises, il serait pertinent de valider les résultats les plus importants dans une autre lignée cellulaire cancéreuse, telle que les cellules alvéolaires A549, ou les cellules embryonnaires rénales HEK293. Considérant la propension des tumeurs solides à pouvoir affecter tout organe, la pertinence de la validation dans plusieurs lignées cellulaires devient doublement importante. Les tumeurs différentes présentent souvent des variations biochimiques qui requièrent des modifications dans le traitement impliqué. Ainsi, une validation dans deux ou trois autres lignées pourrait mettre de l'avant la spécificité et généralité des résultats obtenus dans cette thèse. Outre les lignées cellulaires, nous pourrions tenter de répliquer les résultats ERO-Nrf2 en variant le type de stress aussi. La cryothérapie, le traitement par laser, par rayon X, hypoxie, ou même la chimiothérapie représentent tous des stress particulièrement variables qui sont induits dans les cancers. La résistance à plusieurs

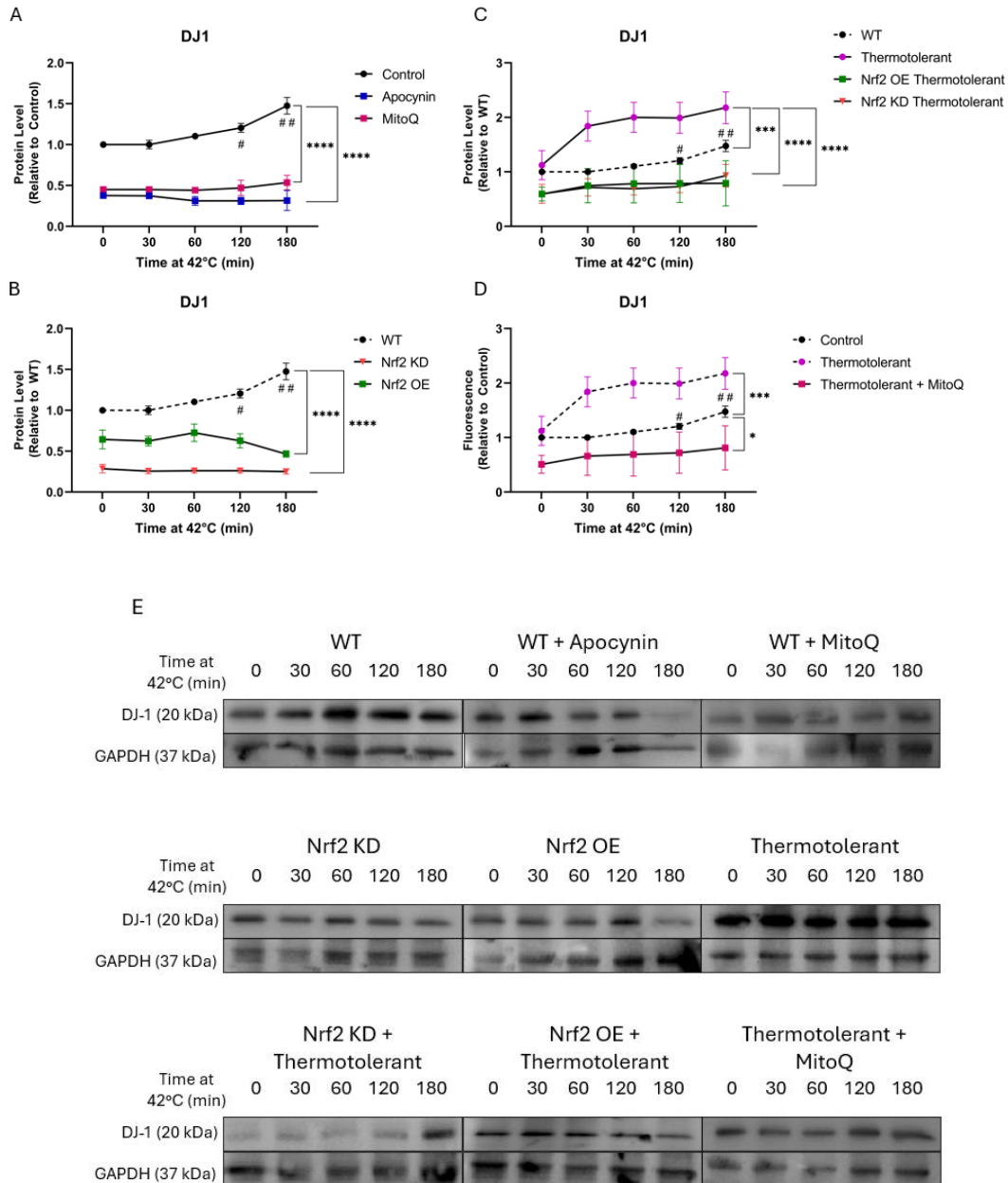
traitements, comme la radiothérapie ou à la chimiothérapie, a déjà été démontrée dans certains cancers (Judasz *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2017). Suivant la logique de nos résultats, l'axe Nrf2 pourrait jouer un rôle important dans ce phénomène. La validation de notre modèle pourrait représenter, alors, un potentiel thérapeutique plus vaste qu'originellement pensé.

En fin de compte, nos travaux ont contribué, de manière significative, à avancer nos connaissances sur la thermotolérance transitoire développée par exposition à un stress léger. Dans un contexte thérapeutique, ce modèle *in vitro* représente la tumeur qui peut acquérir une forme de résistance lorsqu'elle est surexposée à des traitements d'hyperthermie. Présentement, notre seule méthode qui vise à contrer ceci est d'espacer les traitements pour éviter la résistance. Cependant, en ayant validé le rôle de Nrf2, et en ayant démontré le pouvoir signalétique crucial des ERO mitochondriaux dans l'acquisition de la résistance au stress, nous pourrions offrir une alternative à l'espacement temporel. Bien que nos travaux proposent une piste thérapeutique à explorer, ces résultats ne constituent que l'enfance du projet, et il reste un long chemin à faire avant de pouvoir instrumentaliser ces trouvailles dans le champ médical.

L'hyperthermie demeure, encore de nos jours, un traitement anticancer couramment utilisé. Si les travaux et la recherche de cette thèse peuvent aider à prévenir le développement de métastases et le décès ne serait-ce que d'un patient, elle en aura valu l'effort. Afin d'envisager un avenir médical où le cancer sera chose du passé, nous devons toutefois continuer d'explorer de nouvelles avenues scientifiques, dans l'optique de découvrir des nouveaux traitements, et de réduire encore plus les risques de mortalités reliées au cancer. Le fait que ma thèse puisse un jour se joindre au corpus scientifique alimentant cette recherche, qui potentiellement aboutira à des thérapies, justifie amplement tous les obstacles que j'ai dû surmonter. En espérant nous rapprocher d'un monde dans lequel le cancer sera chose du passé, nous continuerons à utiliser les moyens dont la science nous pourvoie pour assurer au plus grand nombre la possibilité d'une vie riche et sans le risque d'une fin précoce et inattendue.

ANNEXE A

DATA WESTERN BLOT LIÉ AU CHAPITRE 3 (non publié)



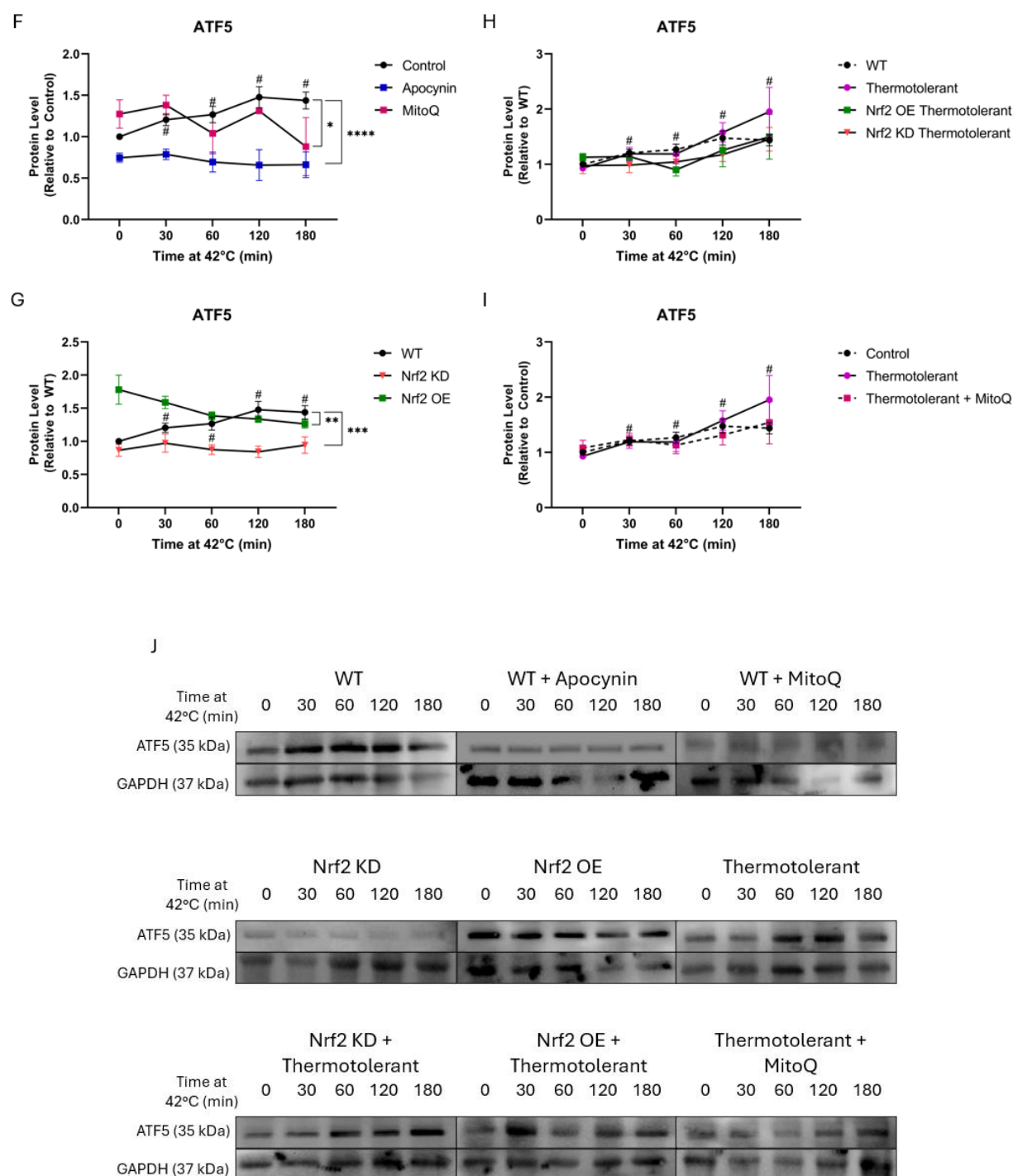
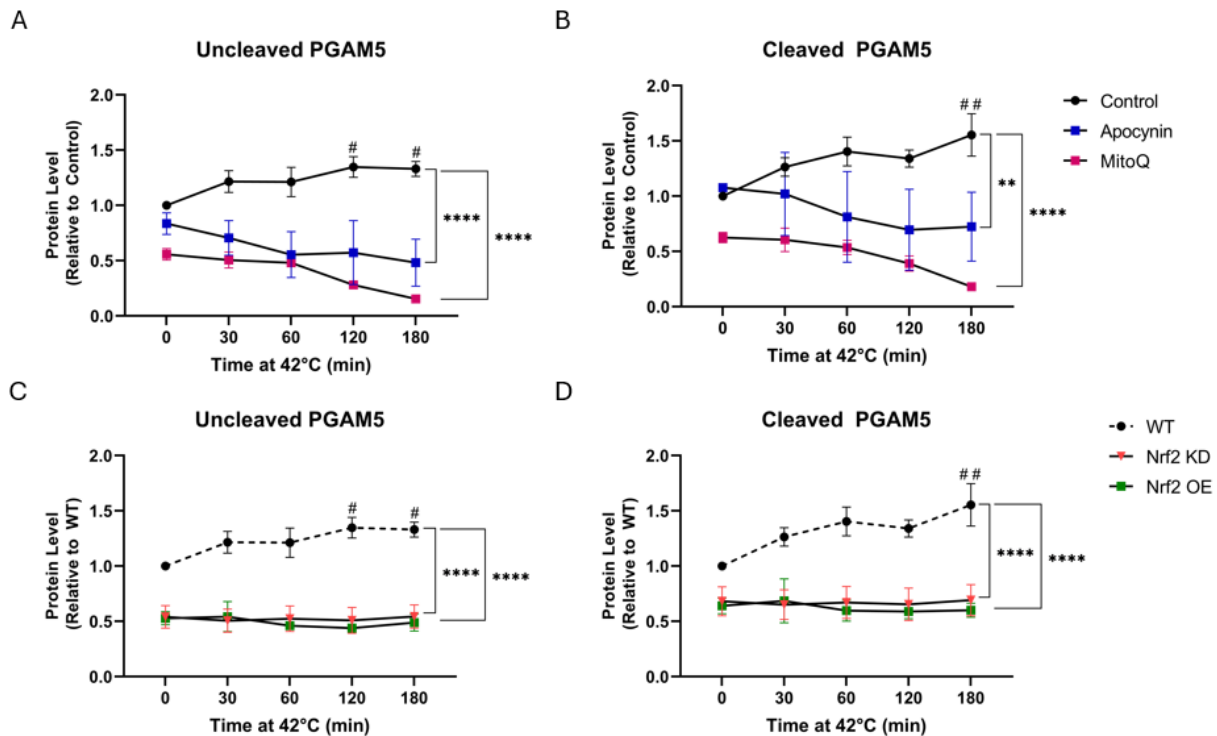


Figure 4.2 Les traitements variés à 42°C affectent l’expression de DJ-1 et ATF5 à 42°C. Des cellules ont été exposées à 42°C pendant 3h. L’expression de DJ-1 et ATF5 ont été monitorées à 30min, 60min, 120min, et 180min. L’expression de DJ-1 a été observée dans des cellules de contrôle (WT) (n = 4) (A) avec traitement d’apocynine (A) (n = 4), MitoQ (A) (n = 4), dans des cellules sous-exprimant Nrf2 (B) (n = 4), surexprimant Nrf2 (B) (n = 4), dans des cellules des trois lignées Nrf2 thermotolérantes (C) (n = 4), ainsi qu’avec un traitement de MitoQ suivant de la thermotolérance à 40°C (D) (n = 4). Des images représentatives de toutes les conditions pour DJ-1 sont présentées avec leur contrôle de

GAPDH en E. L'expression de ATF5 a été observée dans des cellules de contrôle (WT) (n = 4) (F), avec traitement d'apocynine (F) (n = 4), MitoQ (F) (n = 4), dans des cellules sous-exprimant Nrf2 (G) (n = 4), surexprimant Nrf2 (G) (n = 4), dans des cellules des trois lignées Nrf2 thermotolérantes (H) (n = 4), ainsi qu'avec un traitement de MitoQ suivant de la thermotolérance à 40°C (I) (n = 4). Des images représentatives de toutes les conditions pour ATF5 sont présentées avec leur contrôle de GAPDH en J. Les courbes de contrôle (WT) sont réutilisées dans toutes les figures de DJ-1 et ATF5, car les expériences ont été menées en parallèle. Les données de Western Blot ont été normalisées à des contrôles non chauffés. Les données ont été exprimées en tant que moyenne $\pm$ SEM (# p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). Les symboles de dièse représentent une différence significative temporelle dans la courbe de contrôle (WT) par rapport au contrôle non chauffé (T= 0). Les astérisques représentent des différences significatives entre les différents traitements relatifs à la courbe de contrôle.



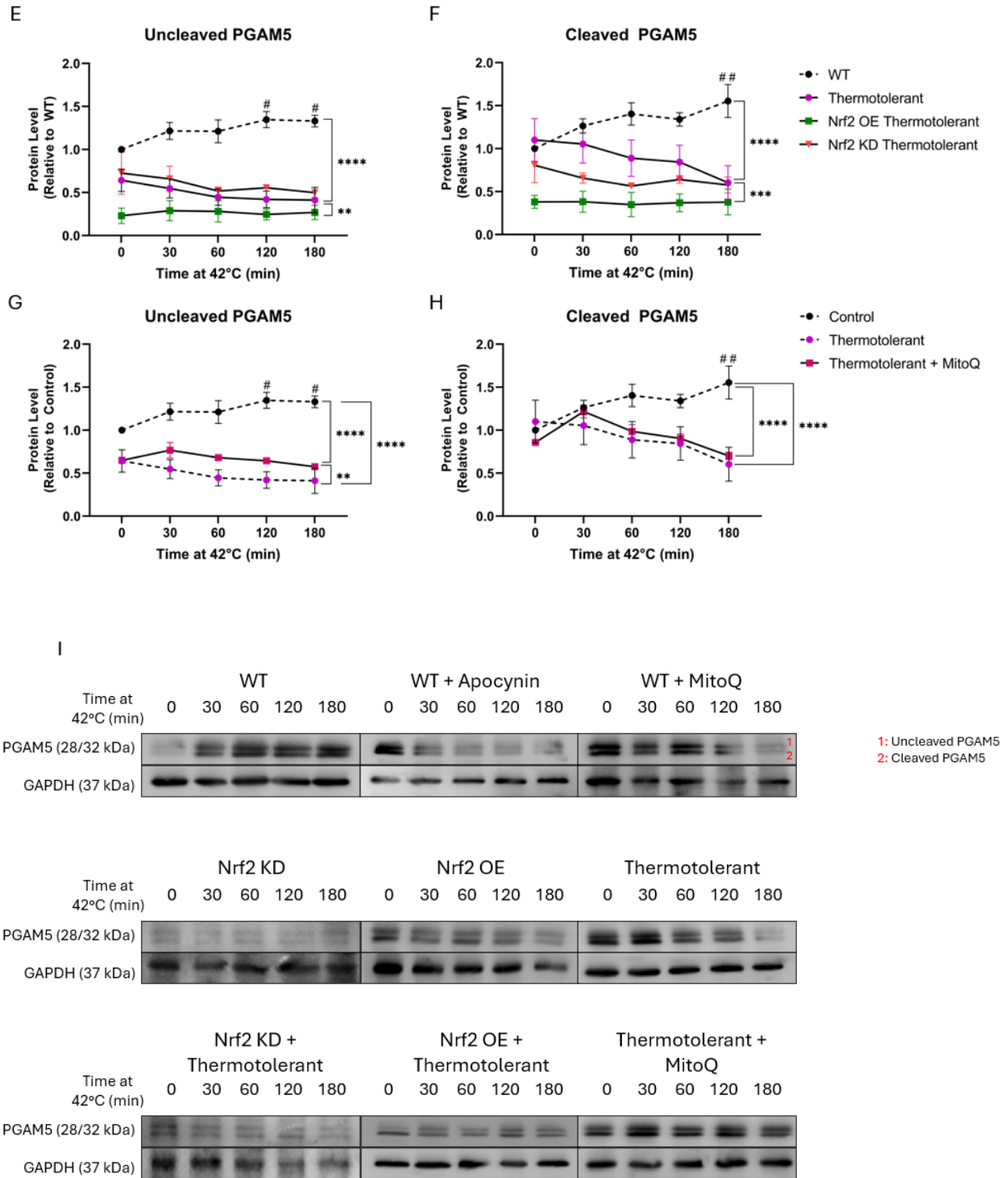


Figure 4.3 Les traitements variés affectent l'expression et le clivage de PGAM5 à 42°C. Des cellules ont été exposées à 42°C pendant 3h. L'expression de PGAM5 clivée et non-clivée ont été monitorées à 30min, 60min, 120min, et 180min. PGAM5 a été observée dans des cellules de contrôle (WT) (n = 4) (A) avec traitement d'apocynine (A-B) (n = 4), MitoQ (A-B) (n = 4), dans des cellules sous-exprimant Nrf2 (C-D) (n = 4), surexprimant Nrf2 (C-D) (n = 4), dans des cellules des trois lignées Nrf2 thermotolérantes (E-F) (n = 4), ainsi qu'avec un traitement de MitoQ suivant de la

thermotolérance à 40°C (G-H) (n = 4). Des images représentatives de toutes les conditions pour DJ-1 sont présentées avec leur contrôle de GAPDH en I. Les courbes de contrôle (WT) sont réutilisées dans toutes les figures PGAM5, car les expériences ont été menées en parallèle. Les données de Western Blot ont été normalisées à des contrôles non chauffés. Les données ont été exprimées en tant que moyenne $\pm$ SEM (# p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). Les symboles de dièse représentent une différence significative temporelle dans la courbe de contrôle (WT) par rapport au contrôle non chauffé (T= 0). Les astérisques représentent des différences significatives entre les différents traitements relatifs à la courbe de contrôle.

RÉFÉRENCES

- Abo, M. et Weerapana, E. (2019, Apr 1). Chemical Probes for Redox Signaling and Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 30(10), 1369-1386. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7408>
- Ademaj, A., Veltsista, D. P., Ghadjar, P., Marder, D., Oberacker, E., Ott, O. J., Wust, P., Puric, E., Hälgl, R. A., Rogers, S., Bodis, S., Fietkau, R., Crezee, H. et Riesterer, O. (2022, Jan 26). Clinical Evidence for Thermometric Parameters to Guide Hyperthermia Treatment. *Cancers (Basel)*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/cancers14030625>
- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S. et Stork, B. (2012, Jan). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 32(1), 2-11. <https://doi.org/10.1128/mcb.06159-11>
- Andrade, W. P., Gonçalves, B. Ô. P., Silva, L. M., Peixoto, I. O., Andrade, T. T. L. et Silva-Filho, A. L. d. (2022). Inhibition of the mTOR pathway with everolimus can modulate heat shock genes and ERCC1 gene expression and improves outcomes on serous ovarian cancer in HIPEC *in vitro* model. *Journal of Clinical Oncology*, 40(16_suppl), e17541-e17541. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.e17541
- Anwar, S., Alrumaihi, F., Sarwar, T., Babiker, A. Y., Khan, A. A., Prabhu, S. V. et Rahmani, A. H. (2024). Exploring Therapeutic Potential of Catalase: Strategies in Disease Prevention and Management. *Biomolecules*, 14(6), 697. <https://www.mdpi.com/2218-273X/14/6/697>
- Au, W. H., Miller-Fleming, L., Sanchez-Martinez, A., Lee, J. A., Twynning, M. J., Prag, H. A., Raik, L., Allen, S. P., Shaw, P. J., Ferraiuolo, L., Mortiboys, H. et Whitworth, A. J. (2024, Sep). Activation of the Keap1/Nrf2 pathway suppresses mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and motor phenotypes in C9orf72 ALS/FTD models. *Life Sci Alliance*, 7(9). <https://doi.org/10.26508/lsa.202402853>
- Averill-Bates, D. (2024, Feb). Reactive oxygen species and cell signaling. Review. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1871(2), 119573. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119573>
- Averill-Bates, D. A. (2023). The antioxidant glutathione. *Vitam Horm*, 121, 109-141. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002>
- Bae, T., Hallis, S. P. et Kwak, M. K. (2024, Mar). Hypoxia, oxidative stress, and the interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer. *Exp Mol Med*, 56(3), 501-514. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01180-8>
- Baird, L. et Yamamoto, M. (2020, Jun 15). The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol*, 40(13). <https://doi.org/10.1128/mcb.00099-20>
- Bánfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N. et Krause, K. H. (2000, Jan 7). A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. *Science*, 287(5450), 138-142. <https://doi.org/10.1126/science.287.5450.138>

- Barančík, M., Grešová, L., Barteková, M. et Dvořáková, I. (2016, Sep 19). Nrf2 as a key player of redox regulation in cardiovascular diseases. *Physiol Res*, 65 Suppl 1, S1-S10. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933403>
- Barbieri, L., Luchinat, E. et Banci, L. (2018, 2018/01/01). Intracellular metal binding and redox behavior of human DJ-1. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(1), 61-69. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1509-5>
- Barbieri, S. S., Cavalca, V., Eligini, S., Brambilla, M., Caiani, A., Tremoli, E. et Colli, S. (2004, Jul 15). Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 37(2), 156-165. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.020>
- Baronzio, G. (2014, 01/01). A Brief Overview of Hyperthermia in Cancer Treatment. *J Integr Oncol*, 3, 115-125. <https://doi.org/10.4172/2329-6777.1000115>
- Bates, D. A. et Mackillop, W. J. (1985, Sep). The effect of hyperthermia on the sodium-potassium pump in Chinese hamster ovary cells. *Radiat Res*, 103(3), 441-451.
- Bates, D. A. et Mackillop, W. J. (1986, Nov). Hyperthermia, adriamycin transport, and cytotoxicity in drug-sensitive and -resistant Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*, 46(11), 5477-5481.
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A. et Donato, R. (2018, May). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1865(5), 721-733. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
- Bellezza, I., Mierla, A. L. et Minelli, A. (2010). Nrf2 and NF- κ B and Their Concerted Modulation in Cancer Pathogenesis and Progression. *Cancers*, 2(2), 483-497. <https://www.mdpi.com/2072-6694/2/2/483>
- Benoit, A., Vogin, G., Duhem, C., Berchem, G. et Janji, B. (2023, Jul 5). Lighting Up the Fire in the Microenvironment of Cold Tumors: A Major Challenge to Improve Cancer Immunotherapy. *Cells*, 12(13). <https://doi.org/10.3390/cells12131787>
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. A. (2005, Oct). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *J Cell Physiol*, 205(1), 47-57. <https://doi.org/10.1002/jcp.20386>
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. A. (2008, Dec). Thermotolerance induced at a fever temperature of 40 degrees C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signalling. *Biochem Cell Biol*, 86(6), 521-538. <https://doi.org/10.1139/o08-136>
- Beura, S. K., Dhapola, R., Panigrahi, A. R., Yadav, P., Reddy, D. H. et Singh, S. K. (2022, 2022/10/01/). Redefining oxidative stress in Alzheimer's disease: Targeting platelet reactive oxygen species for novel therapeutic options. *Life Sciences*, 306, 120855. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120855>

- Bienert, G. P. et Chaumont, F. (2014, May). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*, 1840(5), 1596-1604.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>
- Block, K., Gorin, Y. et Abboud, H. E. (2009, Aug 25). Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14385-14390.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906805106>
- Botrus, G., Miller, R. M., Uson Junior, P. L. S., Kannan, G., Han, H. et Von Hoff, D. D. (2022, Dec 29). Increasing Stress to Induce Apoptosis in Pancreatic Cancer via the Unfolded Protein Response (UPR). *Int J Mol Sci*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010577>
- Bouchez, C. et Devin, A. (2019, Mar 27). Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway. *Cells*, 8(4).
<https://doi.org/10.3390/cells8040287>
- Bozaykut, P., Ozer, N. K. et Karademir, B. (2016, Aug). Nrf2 silencing to inhibit proteolytic defense induced by hyperthermia in HT22 cells. *Redox Biol*, 8, 323-332.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.03.001>
- Branca, J. J. V., Fiorillo, C., Carrino, D., Paternostro, F., Taddei, N., Gulisano, M., Pacini, A. et Becatti, M. (2020, Jun 5). Cadmium-Induced Oxidative Stress: Focus on the Central Nervous System. *Antioxidants (Basel)*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/antiox9060492>
- Brown, D. I. et Griendling, K. K. (2009, Nov 1). Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 47(9), 1239-1253. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.023>
- Cameron, B. D., Sekhar, K. R., Ofori, M. et Freeman, M. L. (2018, Aug). The Role of Nrf2 in the Response to Normal Tissue Radiation Injury. *Radiat Res*, 190(2), 99-106. <https://doi.org/10.1667/rr15059.1>
- Cao, J., Chen, X., Ying, M., He, Q. et Yang, B. (2017). DJ-1 as a Therapeutic Target Against Cancer. *Adv Exp Med Biol*, 1037, 203-222. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_13
- Chen, C., Chen, M., Wen, T., Awasthi, P., Carrillo, N. D., Anderson, R. A. et Cryns, V. L. (2024a, Nov 1). Regulation of NRF2 by Phosphoinositides and Small Heat Shock Proteins. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2023.10.26.564194>
- Chen, R., Lai, U. H., Zhu, L., Singh, A., Ahmed, M. et Forsyth, N. R. (2018). Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Front Cell Dev Biol*, 6, 132. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00132>
- Chen, S. D., Yang, D. I., Lin, T. K., Shaw, F. Z., Liou, C. W. et Chuang, Y. C. (2011). Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*, 12(10), 7199-7215. <https://doi.org/10.3390/ijms12107199>
- Chen, X., Zhou, Q., Chen, H., Bai, J., An, R., Zhang, K., Zhang, X., An, H., Zhang, J., Wang, Y. et Li, M. (2024b, Mar 27). Glutathione Induces Keap1 S-Glutathionylation and Mitigates Oscillating Glucose-Induced β -Cell Dysfunction by Activating Nrf2. *Antioxidants (Basel)*, 13(4).
<https://doi.org/10.3390/antiox13040400>

- Cheng, M., Lin, N., Dong, D., Ma, J., Su, J. et Sun, L. (2021, Jan). PGAM5: A crucial role in mitochondrial dynamics and programmed cell death. *Eur J Cell Biol*, 100(1), 151144. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151144>
- Chiang, S. K., Chen, S. E. et Chang, L. C. (2021, Sep 13). The Role of HO-1 and Its Crosstalk with Oxidative Stress in Cancer Cell Survival. *Cells*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/cells10092401>
- Chocry, M. et Leloup, L. (2020, Aug 10). The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors. *Antioxid Redox Signal*, 33(5), 332-353. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7915>
- Choi, E. M. et Lee, Y. S. (2012, Sep). Protective effect of apocynin on antimycin A-induced cell damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Appl Toxicol*, 32(9), 714-721. <https://doi.org/10.1002/jat.1689>
- Chorley, B. N., Campbell, M. R., Wang, X., Karaca, M., Sambandan, D., Bangura, F., Xue, P., Pi, J., Kleeberger, S. R. et Bell, D. A. (2012, Aug). Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res*, 40(15), 7416-7429. <https://doi.org/10.1093/nar/gks409>
- Cipriano, A., Viviano, M., Feoli, A., Milite, C., Sarno, G., Castellano, S. et Sbardella, G. (2023, Sep 14). NADPH Oxidases: From Molecular Mechanisms to Current Inhibitors. *J Med Chem*, 66(17), 11632-11655. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00770>
- Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W. et Ting, J. P. (2006, Oct 10). DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(41), 15091-15096. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607260103>
- Codogno, P., Mehrpour, M. et Proikas-Cezanne, T. (2011, Dec 14). Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(1), 7-12. <https://doi.org/10.1038/nrm3249>
- Cong, P., Liu, Y., Liu, N., Zhang, Y., Tong, C., Shi, L., Liu, X., Shi, X., Liu, Y., Tong, Z. et Hou, M. (2018, Feb 15). Cold exposure induced oxidative stress and apoptosis in the myocardium by inhibiting the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *BMC Cardiovasc Disord*, 18(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12872-018-0748-x>
- Crezee, J., Franken, N. A. P. et Oei, A. L. (2021, Mar 12). Hyperthermia-Based Anti-Cancer Treatments. *Cancers (Basel)*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/cancers13061240>
- Csoboz, B., Balogh, G. E., Kusz, E., Gombos, I., Peter, M., Crul, T., Gungor, B., Haracska, L., Bogdanovics, G., Torok, Z., Horvath, I. et Vigh, L. (2013, Aug). Membrane fluidity matters: hyperthermia from the aspects of lipids and membranes. *Int J Hyperthermia*, 29(5), 491-499. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.808765>
- Cui, G., Luk, S. C., Li, R. A., Chan, K. K., Lei, S. W., Wang, L., Shen, H., Leung, G. P. et Lee, S. M. (2015, Jan). Cytoprotection of baicalein against oxidative stress-induced cardiomyocytes injury through the Nrf2/Keap1 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*, 65(1), 39-46. <https://doi.org/10.1097/fjc.000000000000161>

- D'Arcy, M. S. (2019, Jun). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 43(6), 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Dang, C. V. (2012, May 1). Links between metabolism and cancer. *Genes Dev*, 26(9), 877-890. <https://doi.org/10.1101/gad.189365.112>
- Das, S. R. (2023). Phytochemicals Modify the Action of Cancer Cells Mitochondrial Drug-Resistance Mechanism. *Sciences of Pharmacy*, 2(3), 184-203. <https://etflin.com/article/132>
- Dash, B. K., Urano, Y., Saito, Y. et Noguchi, N. (2022, 01 Jul. 2022). Redox-sensitive DJ-1 protein: an insight into physiological roles, secretion, and therapeutic target. *Redox Experimental Medicine*, 2022(1), R96-R115. <https://doi.org/10.1530/rem-22-0007>
- Datta, N. R., Kok, H. P., Crezee, H., Gaip, U. S. et Bodis, S. (2020). Integrating Loco-Regional Hyperthermia Into the Current Oncology Practice: SWOT and TOWS Analyses. *Front Oncol*, 10, 819. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00819>
- Datta, N. R., Ordóñez, S. G., Gaip, U. S., Paulides, M. M., Crezee, H., Gellermann, J., Marder, D., Puric, E. et Bodis, S. (2015, Nov). Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future. *Cancer Treat Rev*, 41(9), 742-753. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.05.009>
- De Maio, A. (1999, Jan). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1097/00024382-199901000-00001>
- DeBerardinis, R. J. et Chandel, N. S. (2016, May). Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*, 2(5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Debnath, J., Gammoh, N. et Ryan, K. M. (2023, Aug). Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 24(8), 560-575. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00585-z>
- Deng, P. et Haynes, C. M. (2017, 2017/12/01/). Mitochondrial dysfunction in cancer: Potential roles of ATF5 and the mitochondrial UPR. *Seminars in Cancer Biology*, 47, 43-49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.05.002>
- Deramaut, T. B., Dill, C. et Bonay, M. (2013, Mar). Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases. *Med Mal Infect*, 43(3), 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.02.004>
- Dinkova-Kostova, A. T. et Talalay, P. (2008, Jun). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res*, 52 Suppl 1, S128-138. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700195>
- Driessen, R. P., Sitters, G., Laurens, N., Moolenaar, G. F., Wuite, G. J., Goosen, N. et Dame, R. T. (2014, Oct 21). Effect of temperature on the intrinsic flexibility of DNA and its interaction with architectural proteins. *Biochemistry*, 53(41), 6430-6438. <https://doi.org/10.1021/bi500344j>

- Dunn, K. W., Kamocka, M. M. et McDonald, J. H. (2011, Apr). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(4), C723-742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>
- Eberhard, D. et Lammert, E. (2017). The Role of the Antioxidant Protein DJ-1 in Type 2 Diabetes Mellitus. *Adv Exp Med Biol*, 1037, 173-186. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_11
- Eiyama, A. et Okamoto, K. (2015, Apr). PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*, 33, 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.002>
- Emami, M. H., Sereshki, N., Malakoutikhah, Z., Dehkordi, S. A. E., Fahim, A., Mohammadzadeh, S. et Maghool, F. (2022, Apr). Nrf2 signaling pathway in trace metal carcinogenesis: A cross-talk between oxidative stress and angiogenesis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 254, 109266. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109266>
- Esteras, N. et Abramov, A. Y. (2022, Aug 20). Nrf2 as a regulator of mitochondrial function: Energy metabolism and beyond. *Free Radic Biol Med*, 189, 136-153. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.07.013>
- Fan, W. et Evans, R. M. (2015, May 21). Turning up the heat on membrane fluidity. *Cell*, 161(5), 962-963. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.046>
- Feng, Z., Hu, Y., Yu, S., Bai, H., Sun, Y., Gao, W., Li, J., Qin, X. et Zhang, X. (2023, Sep 1). Exercise in cold: Friend than foe to cardiovascular health. *Life Sci*, 328, 121923. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121923>
- Fiorentini, G., Sarti, D., Gadaleta, C. D., Ballerini, M., Fiorentini, C., Garfagno, T., Ranieri, G. et Guadagni, S. (2020, Jan-Dec). A Narrative Review of Regional Hyperthermia: Updates From 2010 to 2019. *Integr Cancer Ther*, 19, 1534735420932648. <https://doi.org/10.1177/1534735420932648>
- Fiorese, C. J., Schulz, A. M., Lin, Y. F., Rosin, N., Pellegrino, M. W. et Haynes, C. M. (2016, Aug 8). The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR. *Curr Biol*, 26(15), 2037-2043. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.002>
- Fu, J., Xiong, Z., Huang, C., Li, J., Yang, W., Han, Y., Paiboonrungruan, C., Major, M. B., Chen, K. N., Kang, X. et Chen, X. (2019, Jan 4). Hyperactivity of the transcription factor Nrf2 causes metabolic reprogramming in mouse esophagus. *J Biol Chem*, 294(1), 327-340. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005963>
- Fu, Z. et Xi, S. (2020, Mar). The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicol Mech Methods*, 30(3), 167-176. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>
- Fulton, D. J. (2009, Oct). Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal*, 11(10), 2443-2452. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2587>
- Gadsby, D. C. (2009, May). Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5), 344-352. <https://doi.org/10.1038/nrm2668>

- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. et Kroemer, G. (2017, Feb). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*, 17(2), 97-111. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107>
- Gardiner, B., Dougherty, J. A., Ponnalagu, D., Singh, H., Angelos, M., Chen, C. A. et Khan, M. (2020). Measurement of Oxidative Stress Markers In Vitro Using Commercially Available Kits. Dans L. J. Berliner et N. L. Parinandi (dir.), *Measuring Oxidants and Oxidative Stress in Biological Systems* (p. 39-60). Springer
- Copyright 2020, Springer Nature Switzerland AG. https://doi.org/10.1007/978-3-030-47318-1_4.
- Gharavi, N., Haggarty, S. et El-Kadi, A. O. (2007, Jan). Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Curr Drug Metab*, 8(1), 1-7. <https://doi.org/10.2174/138920007779315035>
- Ghorani, E., Swanton, C. et Quezada, S. A. (2023, Oct 10). Cancer cell-intrinsic mechanisms driving acquired immune tolerance. *Immunity*, 56(10), 2270-2295. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.09.004>
- Glazer, E. S. et Curley, S. A. (2011, Apr). The ongoing history of thermal therapy for cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 20(2), 229-235, vii. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2010.11.001>
- Glory, A. et Averill-Bates, D. A. (2016, Oct). The antioxidant transcription factor Nrf2 contributes to the protective effect of mild thermotolerance (40°C) against heat shock-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 99, 485-497. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.032>
- Glory, A., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. A. (2014, Nov). Mild thermotolerance induced at 40 °C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins. *Int J Hyperthermia*, 30(7), 502-512. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.968641>
- Goldstein, L. D., Lee, J., Gnad, F., Klijn, C., Schaub, A., Reeder, J., Daemen, A., Bakalarski, C. E., Holcomb, T., Shames, D. S., Hartmaier, R. J., Chmielecki, J., Seshagiri, S., Gentleman, R. et Stokoe, D. (2016, Sep 6). Recurrent Loss of NFE2L2 Exon 2 Is a Mechanism for Nrf2 Pathway Activation in Human Cancers. *Cell Rep*, 16(10), 2605-2617. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.010>
- Görlach, A., Dimova, E. Y., Petry, A., Martínez-Ruiz, A., Hernansanz-Agustín, P., Rolo, A. P., Palmeira, C. M. et Kietzmann, T. (2015, Dec). Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biol*, 6, 372-385. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.016>
- Gottwald, E. M., Duss, M., Bugarski, M., Haenni, D., Schuh, C. D., Landau, E. M. et Hall, A. M. (2018, Apr). The targeted anti-oxidant MitoQ causes mitochondrial swelling and depolarization in kidney tissue. *Physiol Rep*, 6(7), e13667. <https://doi.org/10.14814/phy2.13667>
- Grondin, M., Chabrol, C. et Averill-Bates, D. A. (2024, Aug). Mild heat shock at 40 °C increases levels of autophagy: Role of Nrf2. *Cell Stress Chaperones*, 29(4), 567-588. <https://doi.org/10.1016/j.cstres.2024.06.001>
- Guo, L., Yang, J., Yuan, W., Li, C., Li, H., Yang, Y., Xue, R. et Yan, K. (2024, Apr). Baicalein ameliorated obesity-induced cardiac dysfunction by regulating the mitochondrial unfolded protein response

- through NRF2 signaling. *Phytomedicine*, 126, 155441. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155441>
- Gupta, S. et Knowlton, A. A. (2005, Jan-Mar). HSP60, Bax, apoptosis and the heart. *J Cell Mol Med*, 9(1), 51-58. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00336.x>
- Hanahan, D. et Weinberg, R. A. (2011, Mar 4). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hayes, J. D., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A. T. et Sutherland, C. (2015, Aug). Dual regulation of transcription factor Nrf2 by Keap1 and by the combined actions of β -TrCP and GSK-3. *Biochem Soc Trans*, 43(4), 611-620. <https://doi.org/10.1042/bst20150011>
- He, C. H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M. E., Choi, A. M. et Alam, J. (2001, Jun 15). Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem*, 276(24), 20858-20865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101198200>
- He, F., Antonucci, L. et Karin, M. (2020a, Jun 17). NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. *Carcinogenesis*, 41(4), 405-416. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa039>
- He, F., Ru, X. et Wen, T. (2020b, Jul 6). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*, 21(13). <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
- Heintzman, D. R., Sinard, R. C., Fisher, E. L., Ye, X., Patterson, A. R., Elasy, J. H., Voss, K., Chi, C., Sugiura, A., Rodriguez-Garcia, G. J., Chowdhury, N. U., Arner, E. N., Krystoviak, E. S., Mason, F. M., Toudji, Y. T., Steiner, K. K., Khan, W., Olson, L. M., Jones, A. L., Hong, H. S., Bass, L., Beier, K. L., Deng, W., Lyssiotis, C. A., Newcomb, D. C., Bick, A. G., Rathmell, W. K., Wilson, J. T. et Rathmell, J. C. (2024, Sep 20). Subset-specific mitochondrial stress and DNA damage shape T cell responses to fever and inflammation. *Sci Immunol*, 9(99), eadp3475. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.adp3475>
- Hennig, P., Garstkiewicz, M., Grossi, S., Di Filippo, M., French, L. E. et Beer, H. D. (2018, Feb 13). The Crosstalk between Nrf2 and Inflammasomes. *Int J Mol Sci*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020562>
- Herb, M., Gluscho, A. et Schramm, M. (2021). Reactive Oxygen Species: Not Omnipresent but Important in Many Locations. *Front Cell Dev Biol*, 9, 716406. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716406>
- Hijioka, M., Inden, M., Yanagisawa, D. et Kitamura, Y. (2017). DJ-1/PARK7: A New Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders. *Biol Pharm Bull*, 40(5), 548-552. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-01006>
- Holmström, K. M., Kostov, R. V. et Dinkova-Kostova, A. T. (2016, Dec). The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr Opin Toxicol*, 1, 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2016.10.002>
- Holze, C., Michaudel, C., Mackowiak, C., Haas, D. A., Benda, C., Hubel, P., Pennemann, F. L., Schnepf, D., Wettmarshausen, J., Braun, M., Leung, D. W., Amarasinghe, G. K., Perocchi, F., Staeheli, P., Ryffel, B. et Pichlmair, A. (2018, Feb). Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. *Nat Immunol*, 19(2), 130-140. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0013-y>

- Hong, J.-M. et Lee, S.-M. (2018, 2018/05/01/). Heme oxygenase-1 protects liver against ischemia/reperfusion injury via phosphoglycerate mutase family member 5-mediated mitochondrial quality control. *Life Sciences*, 200, 94-104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.017>
- Hong, Y., Boiti, A., Vallone, D. et Foulkes, N. S. (2024, Mar 1). Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. *Antioxidants (Basel)*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/antiox13030312>
- Hraoui, G., Grondin, M., Breton, S. et Averill-Bates, D. A. (2025, Jan 10). Nrf2 mediates mitochondrial and NADPH oxidase-derived ROS during mild heat stress at 40 °C. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1872(3), 119897. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2025.119897>
- Hu, Q., Ren, J., Li, G., Wu, J., Wu, X., Wang, G., Gu, G., Ren, H., Hong, Z. et Li, J. (2018, Mar 14). The mitochondrially targeted antioxidant MitoQ protects the intestinal barrier by ameliorating mitochondrial DNA damage via the Nrf2/ARE signaling pathway. *Cell Death Dis*, 9(3), 403. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0436-x>
- Ikeuchi, M., Matsusaka, H., Kang, D., Matsushima, S., Ide, T., Kubota, T., Fujiwara, T., Hamasaki, N., Takeshita, A., Sunagawa, K. et Tsutsui, H. (2005, Aug 2). Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. *Circulation*, 112(5), 683-690. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.104.524835>
- Imamoto, N. et Kose, S. (2012, Sep-Oct). Heat-shock stress activates a novel nuclear import pathway mediated by Hikeshi. *Nucleus*, 3(5), 422-428. <https://doi.org/10.4161/nucl.21713>
- Ishida, Y., Sekine, Y., Oguchi, H., Chihara, T., Miura, M., Ichijo, H. et Takeda, K. (2012). Prevention of apoptosis by mitochondrial phosphatase PGAM5 in the mushroom body is crucial for heat shock resistance in *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE*, 7(2), e30265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030265>
- Islam, M. T. (2017, Jan). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res*, 39(1), 73-82. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K. B., Awuh, J. A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J. D. et Johansen, T. (2010, Jul 16). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem*, 285(29), 22576-22591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118976>
- Jain, K., Suryakumar, G., Prasad, R., Singh, S. N. et Ganju, L. (2013, Oct). Myocardial ER chaperone activation and protein degradation occurs due to synergistic, not individual, cold and hypoxic stress. *Biochimie*, 95(10), 1897-1908. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.018>
- Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M. et Srdjenovic, B. U. (2021, Jan-Mar). Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther*, 17(1), 22-28. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_862_16
- Jiang, X. et Wang, X. (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 73, 87-106. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706>

- Johnson, D. K., Schillinger, K. J., Kwait, D. M., Hughes, C. V., McNamara, E. J., Ishmael, F., O'Donnell, R. W., Chang, M.-M., Hogg, M. G., Dordick, J. S., Santhanam, L., Ziegler, L. M. et Holland, J. A. (2002, 2002/01/01). Inhibition of NADPH Oxidase Activation in Endothelial Cells by ortho -Methoxy-Substituted Catechols. *Endothelium*, 9(3), 191-203. <https://doi.org/10.1080/10623320213638>
- Johnson, W. M., Golczak, M., Choe, K., Curran, P. L., Miller, O. G., Yao, C., Wang, W., Lin, J., Milkovic, N. M., Ray, A., Ravindranath, V., Zhu, X., Wilson, M. A., Wilson-Delfosse, A. L., Chen, S. G. et Mieyal, J. J. (2016, Aug 16). Regulation of DJ-1 by Glutaredoxin 1 in Vivo: Implications for Parkinson's Disease. *Biochemistry*, 55(32), 4519-4532. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01132>
- Judasz, E., Lisiak, N., Kopczyński, P., Taube, M. et Rubiś, B. (2022, Oct 25). The Role of Telomerase in Breast Cancer's Response to Therapy. *Int J Mol Sci*, 23(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232112844>
- Kaarniranta, K., Uusitalo, H., Blasiak, J., Felszeghy, S., Kannan, R., Kauppinen, A., Salminen, A., Sinha, D. et Ferrington, D. (2020, Nov). Mechanisms of mitochondrial dysfunction and their impact on age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 79, 100858. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100858>
- Kanamori, T., Yasuda, S., Duan, R., Ohashi, M., Amou, M., Hori, K., Tsuda, R., Fujimoto, T., Higashi, K., Xu, W., Niidome, T. et Hatakeyama, H. (2025, Mar 24). Cholesterol depletion suppresses thermal necrosis resistance by alleviating an increase in membrane fluidity. *Sci Rep*, 15(1), 10133. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-92232-0>
- Kang, D., Kim, S. H. et Hamasaki, N. (2007, Feb-Apr). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*, 7(1-2), 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.11.017>
- Kannan, M. B., Solovieva, V. et Blank, V. (2012, Oct). The small MAF transcription factors MAFF, MAFK and MAFK: current knowledge and perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1823(10), 1841-1846. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.012>
- Karunanithi, S. et Brown, I. R. (2015). Heat shock response and homeostatic plasticity. *Front Cell Neurosci*, 9, 68. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00068>
- Kasai, S., Shimizu, S., Tatara, Y., Mimura, J. et Itoh, K. (2020, Feb 17). Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020320>
- Kassis, S., Grondin, M. et Averill-Bates, D. A. (2021, Mar). Heat shock increases levels of reactive oxygen species, autophagy and apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1868(3), 118924. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118924>
- Kaur, R., Bhardwaj, A. et Gupta, S. (2023, Nov). Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. *Mol Biol Rep*, 50(11), 9663-9676. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08809-3>

- Kawahara, T., Jackson, H. M., Smith, S. M., Simpson, P. D. et Lambeth, J. D. (2011, Mar 29). Nox5 forms a functional oligomer mediated by self-association of its dehydrogenase domain. *Biochemistry*, 50(12), 2013-2025. <https://doi.org/10.1021/bi1020088>
- Kim, S. K. et Cho, S. W. (2022). The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. *Front Pharmacol*, 13, 868695. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.868695>
- Kobayashi, A., Azuma, K., Ikeda, K. et Inoue, S. (2020). Mechanisms Underlying the Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes by Nuclear Steroid Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6683. <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6683>
- Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. et Yamamoto, M. (2004, Aug). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*, 24(16), 7130-7139. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.16.7130-7139.2004>
- Kok, H. P., Cressman, E. N. K., Ceelen, W., Brace, C. L., Ivkov, R., Grüll, H., Ter Haar, G., Wust, P. et Crezee, J. (2020). Heating technology for malignant tumors: a review. *Int J Hyperthermia*, 37(1), 711-741. <https://doi.org/10.1080/02656736.2020.1779357>
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y. S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K. et Yamamoto, M. (2010, Mar). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*, 12(3), 213-223. <https://doi.org/10.1038/ncb2021>
- Kong, X., Liu, H., He, X., Sun, Y. et Ge, W. (2020). Unraveling the Mystery of Cold Stress-Induced Myocardial Injury. *Front Physiol*, 11, 580811. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.580811>
- Koyama, H., Kamogashira, T. et Yamasoba, T. (2024). Heavy Metal Exposure: Molecular Pathways, Clinical Implications, and Protective Strategies. *Antioxidants*, 13(1), 76. <https://www.mdpi.com/2076-3921/13/1/76>
- Krause, K. H. (2004, Oct). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis*, 57(5), S28-29.
- Krivoruchko, A. et Storey, K. (2010, 04/02). Forever Young: Mechanisms of Natural Anoxia Tolerance and Potential Links to Longevity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3, 186-198. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.3.12356>
- Kuroda, J., Ago, T., Matsushima, S., Zhai, P., Schneider, M. D. et Sadoshima, J. (2010, Aug 31). NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(35), 15565-15570. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002178107>
- Landry, J., Bernier, D., Chrétien, P., Nicole, L. M., Tanguay, R. M. et Marceau, N. (1982, Jun). Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res*, 42(6), 2457-2461.

- Lau, A., Tian, W., Whitman, S. A. et Zhang, D. D. (2013, Jan 1). The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxid Redox Signal*, 18(1), 91-93. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4754>
- Leach, J. K., Van Tuyle, G., Lin, P. S., Schmidt-Ullrich, R. et Mikkelsen, R. B. (2001, May 15). Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res*, 61(10), 3894-3901.
- Lee, J. et Song, C. H. (2021, May 28). Effect of Reactive Oxygen Species on the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria during Intracellular Pathogen Infection of Mammalian Cells. *Antioxidants (Basel)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antiox10060872>
- Lepock, J. R. (2005, 2005/12/01). How do cells respond to their thermal environment? *International Journal of Hyperthermia*, 21(8), 681-687. <https://doi.org/10.1080/02656730500307298>
- Lepock, J. R., Frey, H. E. et Ritchie, K. P. (1993, Sep). Protein denaturation in intact hepatocytes and isolated cellular organelles during heat shock. *J Cell Biol*, 122(6), 1267-1276. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.6.1267>
- Leuenberger, P., Ganscha, S., Kahraman, A., Cappelletti, V., Boersema, P. J., von Mering, C., Claassen, M. et Picotti, P. (2017, Feb 24). Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermostability. *Science*, 355(6327). <https://doi.org/10.1126/science.aai7825>
- Li, B., Kim, Y. L. et Lippert, A. R. (2022, Feb). Chemiluminescence Measurement of Reactive Sulfur and Nitrogen Species. *Antioxid Redox Signal*, 36(4-6), 337-353. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0195>
- Li, H., Niu, N., Yang, J., Dong, F., Zhang, T., Li, S. et Zhao, W. (2021, Aug). Nuclear respiratory factor 1 protects H9C2 cells against hypoxia-induced apoptosis via the death receptor pathway and mitochondrial pathway. *Cell Biol Int*, 45(8), 1784-1796. <https://doi.org/10.1002/cbin.11619>
- Li, N., Muthusamy, S., Liang, R., Sarojini, H. et Wang, E. (2011, Mar). Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1. *Mech Ageing Dev*, 132(3), 75-85. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.12.004>
- Lian, X., Wang, X., Xie, Y., Sheng, H., He, J., Peng, T., Xie, N., Wang, C. et Lian, Y. (2024, Feb). ATF5-regulated Mitochondrial Unfolded Protein Response Attenuates Neuronal Damage in Epileptic Rat by Reducing Endoplasmic Reticulum Stress Through Mitochondrial ROS. *Neurochem Res*, 49(2), 388-401. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-04042-3>
- Liang, M. Z., Ke, T. L. et Chen, L. (2021). Mitochondrial Protein PGAM5 Emerges as a New Regulator in Neurological Diseases. *Front Mol Neurosci*, 14, 730604. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.730604>
- Liemburg-Apers, D. C., Willems, P. H., Koopman, W. J. et Grefte, S. (2015, Aug). Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Arch Toxicol*, 89(8), 1209-1226. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1520-y>
- Lin, L., Wu, Q., Lu, F., Lei, J., Zhou, Y., Liu, Y., Zhu, N., Yu, Y., Ning, Z., She, T. et Hu, M. (2023). Nrf2 signaling pathway: current status and potential therapeutic targetable role in human cancers. *Front Oncol*, 13, 1184079. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1184079>

- Liu, J., Kang, R. et Tang, D. (2022a, Nov). Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis. *Febs j*, 289(22), 7038-7050. <https://doi.org/10.1111/febs.16059>
- Liu, M., Galli, G., Wang, Y., Fan, Q., Wang, Z., Wang, X. et Xiao, W. (2020). Novel Therapeutic Targets for Hypoxia-Related Cardiovascular Diseases: The Role of HIF-1. *Front Physiol*, 11, 774. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00774>
- Liu, R., Bian, Y., Liu, L., Liu, L., Liu, X. et Ma, S. (2022b, May). Molecular pathways associated with oxidative stress and their potential applications in radiotherapy (Review). *Int J Mol Med*, 49(5). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5121>
- Liu, X., Ward, K., Xavier, C., Jann, J., Clark, A. F., Pang, I. H. et Wu, H. (2016, Aug). The novel triterpenoid RTA 408 protects human retinal pigment epithelial cells against H₂O₂-induced cell injury via NF-E2-related factor 2 (Nrf2) activation. *Redox Biol*, 8, 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.12.005>
- Lo, S. C. et Hannink, M. (2008, May 1). PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp Cell Res*, 314(8), 1789-1803. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.02.014>
- Lu, W., Sun, J., Yoon, J. S., Zhang, Y., Zheng, L., Murphy, E., Mattson, M. P. et Lenardo, M. J. (2016). Mitochondrial Protein PGAM5 Regulates Mitophagic Protection against Cell Necroptosis. *PLOS ONE*, 11(1), e0147792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147792>
- Lu, Y., Bian, J., Kan, H., Ding, W., Wang, D., Wang, X., Luo, Q., Wu, X. et Zhu, L. (2021, Jul). Intermittent hypoxia preconditioning protects WRL68 cells against oxidative injury: Involvement of the PINK1/Parkin-mediated mitophagy regulated by nuclear respiratory factor 1. *Mitochondrion*, 59, 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.04.012>
- Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A. et Hutchins, G. M. (2009, Sep). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med*, 133(9), 1463-1467. <https://doi.org/10.5858/133.9.1463>
- Lunt, S. Y. et Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 441-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Lyakhovich, A. et Lleonart, M. E. (2016). Bypassing Mechanisms of Mitochondria-Mediated Cancer Stem Cells Resistance to Chemo- and Radiotherapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 1716341. <https://doi.org/10.1155/2016/1716341>
- Ma, K., Zhang, Z., Chang, R., Cheng, H., Mu, C., Zhao, T., Chen, L., Zhang, C., Luo, Q., Lin, J., Zhu, Y. et Chen, Q. (2020, 2020/03/01). Dynamic PGAM5 multimers dephosphorylate BCL-xL or FUNDC1 to regulate mitochondrial and cellular fate. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 1036-1051. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0396-4>
- Madkour, L. H. (2020). Chapter 23 - Effects of interactions between antioxidant defense therapy and ROS. Dans L. H. Madkour (dir.), *Reactive Oxygen Species (ROS), Nanoparticles, and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Cell Death Mechanisms* (p. 645-691). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822481-6.00023-2>.

- Mahmood, A., Bisoyi, P., Banerjee, R., Yousuf, M. et Goswami, S. K. (2021, May). Mitoapocynin, a mitochondria targeted derivative of apocynin induces mitochondrial ROS generation and apoptosis in multiple cell types including cardiac myoblasts: a potential constraint to its therapeutic use. *Mol Cell Biochem*, 476(5), 2047-2059. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-04039-4>
- Mailloux, R. J. (2020, Jun 2). An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants (Basel)*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>
- Malabed, R., Hanashima, S., Murata, M. et Sakurai, K. (2020, Apr 7). Interactions of OSW-1 with Lipid Bilayers in Comparison with Digitonin and Soyasaponin. *Langmuir*, 36(13), 3600-3610. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03957>
- Mao, H., Chen, W., Chen, L. et Li, L. (2022, May). Potential role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane proteins in diseases. *Biochem Pharmacol*, 199, 115011. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115011>
- McIntosh, S. A., Alam, F., Adams, L., Boon, I. S., Callaghan, J., Conti, I., Copson, E., Carson, V., Davidson, M., Fitzgerald, H., Gautam, A., Jones, C. M., Kargbo, S., Lakshmipathy, G., Maguire, H., McFerran, K., Mirandari, A., Moore, N., Moore, R., Murray, A., Newman, L., Robinson, S. D., Segaran, A., Soong, C. N., Walker, A., Wijayaweera, K., Atun, R., Cutress, R. I. et Head, M. G. (2023, Jun). Global funding for cancer research between 2016 and 2020: a content analysis of public and philanthropic investments. *Lancet Oncol*, 24(6), 636-645. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(23\)00182-1](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(23)00182-1)
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. et Hayes, J. D. (2004, Jul 23). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem*, 279(30), 31556-31567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403061200>
- Melgarejo Segura, M. T., Yáñez Castillo, Y., Lozano Lorca, M., Morales Martínez, A., Arrabal Polo, M. et Arrabal Martín, M. (2024, Sep). Efficacy of conduction hyperthermia in the treatment of non-muscle invasive bladder cancer: A systematic review. *Urol Oncol*, 42(9), 251-265. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2024.03.013>
- Milani, P., Ambrosi, G., Gammoh, O., Blandini, F. et Cereda, C. (2013). SOD1 and DJ-1 converge at Nrf2 pathway: a clue for antioxidant therapeutic potential in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 836760. <https://doi.org/10.1155/2013/836760>
- Milenkovic, M., De Deken, X., Jin, L., De Felice, M., Di Lauro, R., Dumont, J. E., Corvilain, B. et Miot, F. (2007, Mar). Duox expression and related H₂O₂ measurement in mouse thyroid: onset in embryonic development and regulation by TSH in adult. *J Endocrinol*, 192(3), 615-626. <https://doi.org/10.1677/joe-06-0003>
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M. et Zujko, M. E. (2018, 2018/03/01/). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68-78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>

- Mitra, A., Raicu, A. M., Hickey, S. L., Pile, L. A. et Arnosti, D. N. (2021, Feb). Soft repression: Subtle transcriptional regulation with global impact. *Bioessays*, 43(2), e2000231. <https://doi.org/10.1002/bies.202000231>
- Moghadam, Z. M., Henneke, P. et Kolter, J. (2021). From Flies to Men: ROS and the NADPH Oxidase in Phagocytes. *Front Cell Dev Biol*, 9, 628991. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628991>
- Mohamed Yusoff, A. A. (2015). Understanding Mitochondrial DNA in Brain Tumorigenesis. Dans (p. 3-27).
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. et Kan, Y. W. (1994, Oct 11). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(21), 9926-9930. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926>
- Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J. D. et Yamamoto, M. (2004, Apr 27). Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17), 6379-6384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305902101>
- Motohashi, H. et Yamamoto, M. (2004, Nov). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 10(11), 549-557. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.09.003>
- Murphy, M. P. (2009, Jan 1). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/bj20081386>
- Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N. G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Van Remmen, H., Schumacker, P. T., Thornalley, P. J., Toyokuni, S., Winterbourn, C. C., Yin, H. et Halliwell, B. (2022, Jun). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab*, 4(6), 651-662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>
- Muthuramalingam, K., Cho, M. et Kim, Y. (2020, 2020/01/09). Role of NADPH oxidase and its therapeutic intervention in TGF- β -mediated EMT progression: an in vitro analysis on HeLa cervical cancer cells. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0485-6>
- Nargund, A. M., Fiorese, C. J., Pellegrino, M. W., Deng, P. et Haynes, C. M. (2015, Apr 2). Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATF5-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Mol Cell*, 58(1), 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.008>
- Neves, M., Grãos, M., Anjo, S. I. et Manadas, B. (2022, 2022/05/01/). Modulation of signaling pathways by DJ-1: An updated overview. *Redox Biology*, 51, 102283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102283>
- Ngo, V., Brickenden, A., Liu, H., Yeung, C., Choy, W. Y. et Duennwald, M. L. (2022, Apr 1). A novel yeast model detects Nrf2 and Keap1 interactions with Hsp90. *Dis Model Mech*, 15(4). <https://doi.org/10.1242/dmm.049258>

- Ngo, V. et Duennwald, M. L. (2022, Nov 27). Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants (Basel)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/antiox11122345>
- Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P. J. et Pickett, C. B. (2005, Dec). The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 25(24), 10895-10906. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.24.10895-10906.2005>
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. et Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*, 2(3), 213-219. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>
- Noel, J. E. et Sinclair, C. F. (2023, Dec 21). Radiofrequency Ablation for Benign Thyroid Nodules. *J Clin Endocrinol Metab*, 109(1), e12-e17. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgad357>
- O'Mealey, G. B., Plafker, K. S., Berry, W. L., Janknecht, R., Chan, J. Y. et Plafker, S. M. (2017, Oct 15). A PGAM5-KEAP1-Nrf2 complex is required for stress-induced mitochondrial retrograde trafficking. *J Cell Sci*, 130(20), 3467-3480. <https://doi.org/10.1242/jcs.203216>
- Okon, I. S. et Zou, M. H. (2015, Oct). Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacol Res*, 100, 170-174. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.06.013>
- Paerhati, P., Liu, J., Jin, Z., Jakoš, T., Zhu, S., Qian, L., Zhu, J. et Yuan, Y. (2022, Jun 27). Advancements in Activating Transcription Factor 5 Function in Regulating Cell Stress and Survival. *Int J Mol Sci*, 23(13). <https://doi.org/10.3390/ijms23137129>
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D. (2010, Mar 15). Mild thermotolerance induced at 40 degrees C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53. *Arch Biochem Biophys*, 495(2), 97-111. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.014>
- Pan, Q., Li, M., Shi, Y. L., Liu, H., Speakman, J. R. et Wang, D. H. (2014, Jul). Lipidomics reveals mitochondrial membrane remodeling associated with acute thermoregulation in a rodent with a wide thermoneutral zone. *Lipids*, 49(7), 715-730. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3900-0>
- Panieri, E., Pinho, S. A., Afonso, G. J. M., Oliveira, P. J., Cunha-Oliveira, T. et Saso, L. (2022). NRF2 and Mitochondrial Function in Cancer and Cancer Stem Cells. *Cells*, 11(15), 2401. <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/15/2401>
- Peng, C., Li, X., Ao, F., Li, T., Guo, J., Liu, J., Zhang, X., Gu, J., Mao, J. et Zhou, B. (2023, Mar 25). Mitochondrial ROS driven by NOX4 upregulation promotes hepatocellular carcinoma cell survival after incomplete radiofrequency ablation by inducing of mitophagy via Nrf2/PINK1. *J Transl Med*, 21(1), 218. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04067-w>
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G. et Migliaccio, A. (2020, Feb). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med*, 52(2), 192-203. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>

- Peters, E. A., Hiltermann, J. T. et Stolk, J. (2001, Dec 1). Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radic Biol Med*, 31(11), 1442-1447. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00725-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00725-0)
- Piantadosi, C. A., Carraway, M. S., Babiker, A. et Suliman, H. B. (2008, Nov 21). Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res*, 103(11), 1232-1240. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000338597.71702.ad>
- Pinel-Marie, M. L., Sparfel, L., Desmots, S. et Fardel, O. (2009, Sep 15). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the NADPH oxidase subunit NCF1/p47 phox expression leading to priming of human macrophage oxidative burst. *Free Radic Biol Med*, 47(6), 825-834. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.025>
- Poganik, J. R., Long, M. J. C., Disare, M. T., Liu, X., Chang, S. H., Hla, T. et Aye, Y. (2019, Dec). Post-transcriptional regulation of Nrf2-mRNA by the mRNA-binding proteins HuR and AUF1. *Faseb j*, 33(12), 14636-14652. <https://doi.org/10.1096/fj.201901930R>
- Prior, K. K., Leisegang, M. S., Josipovic, I., Löwe, O., Shah, A. M., Weissmann, N., Schröder, K. et Brandes, R. P. (2016, Oct). CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity. *Redox Biol*, 9, 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.013>
- Priya, A., Johar, K. et Wong-Riley, M. T. (2013, Jan). Nuclear respiratory factor 2 regulates the expression of the same NMDA receptor subunit genes as NRF-1: both factors act by a concurrent and parallel mechanism to couple energy metabolism and synaptic transmission. *Biochim Biophys Acta*, 1833(1), 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.014>
- Przybytkowski, E., Bates, J. H., Bates, D. A. et Mackillop, W. J. (1986, Sep). Thermal adaptation in CHO cells at 40 degrees C: the influence of growth conditions and the role of heat shock proteins. *Radiat Res*, 107(3), 317-331.
- Qin, S., He, X., Lin, H., Schulte, B. A., Zhao, M., Tew, K. D. et Wang, G. Y. (2021, 2021/06/01/). Nrf2 inhibition sensitizes breast cancer stem cells to ionizing radiation via suppressing DNA repair. *Free Radical Biology and Medicine*, 169, 238-247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.006>
- Raniga, P. V., Di Trapani, G. et Tonissen, K. F. (2017). The Multifaceted Roles of DJ-1 as an Antioxidant. *Adv Exp Med Biol*, 1037, 67-87. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_6
- Rastogi, R., Geng, X., Li, F. et Ding, Y. (2016). NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease. *Front Cell Neurosci*, 10, 301. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00301>
- Redza-Dutordoir, M., Kassis, S., Ve, H., Grondin, M. et Averill-Bates, D. A. (2016, Dec). Inhibition of autophagy sensitises cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis: Protective effect of mild thermotolerance acquired at 40°C. *Biochim Biophys Acta*, 1863(12), 3050-3064. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.015>
- Remijns, Q., Goossens, V., Grootjans, S., Van den Haute, C., Vanlangenakker, N., Dondelinger, Y., Roelandt, R., Bruggeman, I., Goncalves, A., Bertrand, M. J. M., Baekelandt, V., Takahashi, N.,

- Berghe, T. V. et Vandenabeele, P. (2014, 2014/01/01). Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *Cell Death & Disease*, 5(1), e1004-e1004. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.531>
- Repici, M. et Giorgini, F. (2019, Sep 3). DJ-1 in Parkinson's Disease: Clinical Insights and Therapeutic Perspectives. *J Clin Med*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/jcm8091377>
- Romero, R., Sayin, V. I., Davidson, S. M., Bauer, M. R., Singh, S. X., LeBoeuf, S. E., Karakousi, T. R., Ellis, D. C., Bhutkar, A., Sánchez-Rivera, F. J., Subbaraj, L., Martinez, B., Bronson, R. T., Prigge, J. R., Schmidt, E. E., Thomas, C. J., Goparaju, C., Davies, A., Dolgalev, I., Heguy, A., Allaj, V., Poirier, J. T., Moreira, A. L., Rudin, C. M., Pass, H. I., Vander Heiden, M. G., Jacks, T. et Papagiannakopoulos, T. (2017, Nov). Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat Med*, 23(11), 1362-1368. <https://doi.org/10.1038/nm.4407>
- Rybak, L. P., Mukherjea, D., Jajoo, S., Kaur, T. et Ramkumar, V. (2012, Jul). siRNA-mediated knock-down of NOX3: therapy for hearing loss? *Cell Mol Life Sci*, 69(14), 2429-2434. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1016-3>
- Sackin, H. et Palmer, L. G. (2008). CHAPTER 8 - Electrophysiological Analysis of Transepithelial Transport. Dans R. J. Alpern et S. C. Hebert (dir.), *Seldin and Giebisch's The Kidney (Fourth Edition)* (p. 211-245). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012088488-9.50011-5>.
- Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E. et Saso, L. (2020, Nov 23). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*, 25(22). <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>
- Sahin, E. et Gümüşlü, S. (2004, May). Cold-stress-induced modulation of antioxidant defence: role of stressed conditions in tissue injury followed by protein oxidation and lipid peroxidation. *Int J Biometeorol*, 48(4), 165-171. <https://doi.org/10.1007/s00484-004-0205-7>
- Sajjad, M. U., Green, E. W., Miller-Fleming, L., Hands, S., Herrera, F., Campesan, S., Khoshnan, A., Outeiro, T. F., Giorgini, F. et Wyttenbach, A. (2013). DJ-1 modulates aggregation and pathogenesis in models of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 23(3), 755-766. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt466>
- Sandrelli, F. et Bisaglia, M. (2023, Apr 21). Molecular and Physiological Determinants of Amyotrophic Lateral Sclerosis: What the DJ-1 Protein Teaches Us. *Int J Mol Sci*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/ijms24087674>
- Sanghvi, V. R., Leibold, J., Mina, M., Mohan, P., Berishaj, M., Li, Z., Miele, M. M., Lailler, N., Zhao, C., de Stanchina, E., Viale, A., Akkari, L., Lowe, S. W., Ciriello, G., Hendrickson, R. C. et Wendel, H. G. (2019, Aug 8). The Oncogenic Action of NRF2 Depends on De-glycation by Fructosamine-3-Kinase. *Cell*, 178(4), 807-819.e821. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.031>
- Sangokoya, C., Telen, M. J. et Chi, J. T. (2010, Nov 18). microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood*, 116(20), 4338-4348. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214817>

- Schieber, M. et Chandel, Navdeep S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24(10), R453-R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schiliro, C. et Firestein, B. L. (2021, Apr 29). Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051056>
- Scutigliani, E. M., Lobo-Cerna, F., Mingo Barba, S., Scheidegger, S. et Krawczyk, P. M. (2022, Dec 24). The Effects of Heat Stress on the Transcriptome of Human Cancer Cells: A Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/cancers15010113>
- Sears, T. K. et Angelastro, J. M. (2017, Oct 13). The transcription factor ATF5: role in cellular differentiation, stress responses, and cancer. *Oncotarget*, 8(48), 84595-84609. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21102>
- Selman, C., McLaren, J. S., Himanka, M. J. et Speakman, J. R. (2000, Apr 15). Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal. *Free Radic Biol Med*, 28(8), 1279-1285. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00263-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00263-x)
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A. et Ribas, A. (2017, Feb 9). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(4), 707-723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>
- Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T. et Abeliovich, A. (2004, Nov). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol*, 2(11), e362. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020362>
- Shilovsky, G. A. et Ashapkin, V. V. (2022, Dec). Transcription Factor Nrf2 and Mitochondria - Friends or Foes in the Regulation of Aging Rate. *Biochemistry (Mosc)*, 87(12), 1477-1486. <https://doi.org/10.1134/s0006297922120057>
- Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M. et Winterbourn, C. (2022, Jul). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 23(7), 499-515. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>
- Sies, H., Berndt, C. et Jones, D. P. (2017, Jun 20). Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*, 86, 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Sies, H. et Jones, D. P. (2020, Jul). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(7), 363-383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Sinenko, S. A., Starkova, T. Y., Kuzmin, A. A. et Tomilin, A. N. (2021). Physiological Signaling Functions of Reactive Oxygen Species in Stem Cells: From Flies to Man. *Front Cell Dev Biol*, 9, 714370. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.714370>
- Singh, B., Ronghe, A. M., Chatterjee, A., Bhat, N. K. et Bhat, H. K. (2013, May). MicroRNA-93 regulates NRF2 expression and is associated with breast carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 34(5), 1165-1172. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt026>

- Skulachev, V. P. (2012). Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J Alzheimers Dis*, 28(2), 283-289. <https://doi.org/10.3233/jad-2011-111391>
- Slimen, I. B., Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M. et Abdrabbah, M. (2014, Nov). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperthermia*, 30(7), 513-523. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>
- Smith, R. A. et Murphy, M. P. (2010, Jul). Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann N Y Acad Sci*, 1201, 96-103. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05627.x>
- Somero, G. N. (2020, Jul). The cellular stress response and temperature: Function, regulation, and evolution. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol*, 333(6), 379-397. <https://doi.org/10.1002/jez.2344>
- Somero, G. N., Lockwood, B. L. et Tomanek, L. (2016). *Biochemical adaptation: response to environmental challenges, from life's origins to the Anthropocene*. Sinauer Associates, Incorporated Publishers Sunderland (MA).
- Stefanska, J. et Pawliczak, R. (2008). Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm*, 2008, 106507. <https://doi.org/10.1155/2008/106507>
- Su, L., Zhang, J., Gomez, H., Kellum, J. A. et Peng, Z. (2023, Feb). Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury. *Autophagy*, 19(2), 401-414. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2084862>
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K. et Lambeth, J. D. (1999, Sep 2). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 401(6748), 79-82. <https://doi.org/10.1038/43459>
- Sun, L., Wang, X., Saredy, J., Yuan, Z., Yang, X. et Wang, H. (2020, 2020/10/01/). Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biology*, 37, 101759. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101759>
- Suzuki, T., Blank, V., Sesay, J. S. et Crawford, D. R. (2001, Jan 12). Maf genes are involved in multiple stress response in human. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(1), 4-8. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4064>
- Suzuki, T., Takahashi, J. et Yamamoto, M. (2023, Mar 31). Molecular Basis of the KEAP1-NRF2 Signaling Pathway. *Mol Cells*, 46(3), 133-141. <https://doi.org/10.14348/molcells.2023.0028>
- Suzuki, T. et Yamamoto, M. (2017, Oct 13). Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. *J Biol Chem*, 292(41), 16817-16824. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.800169>
- Taylor, A. M., Shih, J., Ha, G., Gao, G. F., Zhang, X., Berger, A. C., Schumacher, S. E., Wang, C., Hu, H., Liu, J., Lazar, A. J., Cherniack, A. D., Beroukhir, R. et Meyerson, M. (2018, Apr 9). Genomic and Functional Approaches to Understanding Cancer Aneuploidy. *Cancer Cell*, 33(4), 676-689.e673. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.007>

- Tchouagué, M., Grondin, M., Glory, A. et Averill-Bates, D. (2019, Sep 1). Heat shock induces the cellular antioxidant defenses peroxiredoxin, glutathione and glucose 6-phosphate dehydrogenase through Nrf2. *Chem Biol Interact*, 310, 108717. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.06.030>
- Telkoparan-Akillilar, P., Panieri, E., Cevik, D., Suzen, S. et Saso, L. (2021). Therapeutic Targeting of the NRF2 Signaling Pathway in Cancer. *Molecules*, 26(5), 1417. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/5/1417>
- Teng, R., Liu, Z., Tang, H., Zhang, W., Chen, Y., Xu, R., Chen, L., Song, J., Liu, X. et Deng, H. (2019, Jun). HSP60 silencing promotes Warburg-like phenotypes and switches the mitochondrial function from ATP production to biosynthesis in ccRCC cells. *Redox Biol*, 24, 101218. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101218>
- Teske, B. F., Fusakio, M. E., Zhou, D., Shan, J., McClintick, J. N., Kilberg, M. S. et Wek, R. C. (2013, Aug). CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Mol Biol Cell*, 24(15), 2477-2490. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-01-0067>
- Thannickal, V. J. et Fanburg, B. L. (2000, Dec). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279(6), L1005-1028. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>
- Tirichen, H., Yaigoub, H., Xu, W., Wu, C., Li, R. et Li, Y. (2021). Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. *Front Physiol*, 12, 627837. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.627837>
- Tonelli, C., Chio, I. I. C. et Tuveson, D. A. (2018, Dec 10). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, 29(17), 1727-1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
- Tönnies, E. et Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 57(4), 1105-1121. <https://doi.org/10.3233/jad-161088>
- Touska, F., Turnquist, B., Vlachova, V., Reeh, P. W., Leffler, A. et Zimmermann, K. (2018, Aug 6). Heat-resistant action potentials require TTX-resistant sodium channels Na(V)1.8 and Na(V)1.9. *J Gen Physiol*, 150(8), 1125-1144. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711786>
- Tripathi, S., Kharkwal, G., Mishra, R. et Singh, G. (2024, Sep 30). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling in heavy metals-induced oxidative stress. *Heliyon*, 10(18), e37545. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37545>
- Tsui, K. H. et Li, C. J. (2023, Jan 9). Mitoquinone shifts energy metabolism to reduce ROS-induced oxeiptosis in female granulosa cells and mouse oocytes. *Aging (Albany NY)*, 15(1), 246-260. <https://doi.org/10.18632/aging.204475>
- Uceda, A. B., Mariño, L., Casasnovas, R. et Adrover, M. (2024, Apr). An overview on glycation: molecular mechanisms, impact on proteins, pathogenesis, and inhibition. *Biophys Rev*, 16(2), 189-218. <https://doi.org/10.1007/s12551-024-01188-4>
- van der Zee, J. (2002, Aug). Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol*, 13(8), 1173-1184. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf280>

- Ventura-Clapier, R., Moulin, M., Piquereau, J., Lemaire, C., Mericskay, M., Veksler, V. et Garnier, A. (2017, May 1). Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. *Clin Sci (Lond)*, 131(9), 803-822. <https://doi.org/10.1042/cs20160485>
- Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S. M. E. et Fieschi, F. (2021, Jun 1). NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants (Basel)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antiox10060890>
- Villalpando-Rodriguez, G. E. et Gibson, S. B. (2021). Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 9912436. <https://doi.org/10.1155/2021/9912436>
- Wang, B., Teng, Y. et Liu, Q. (2016). MicroRNA-153 Regulates NRF2 Expression and is Associated with Breast Carcinogenesis. *Clin Lab*, 62(1-2), 39-47. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2015.150518>
- Wang, L., Zhang, X., Xiong, X., Zhu, H., Chen, R., Zhang, S., Chen, G. et Jian, Z. (2022a, Nov 30). Nrf2 Regulates Oxidative Stress and Its Role in Cerebral Ischemic Stroke. *Antioxidants (Basel)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/antiox11122377>
- Wang, X., Chen, X., Zhou, W., Men, H., Bao, T., Sun, Y., Wang, Q., Tan, Y., Keller, B. B., Tong, Q., Zheng, Y. et Cai, L. (2022b, Feb). Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane via AMPK/NRF2 pathways. *Acta Pharm Sin B*, 12(2), 708-722. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.10.005>
- Wang, Y. S., Zhou, J., Liang, C., Hong, K., Cheng, X. S. et Wu, Z. G. (2013, Sep). ERK5 knock down aggravates detrimental effects of hypothermal stimulation on cardiomyocytes via Bim upregulation. *Environ Toxicol Pharmacol*, 36(2), 724-731. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.012>
- Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F. et Wang, X. (2012, Jan 20). The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*, 148(1-2), 228-243. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.030>
- Winterbourn, C. C. (2018, Aug 20). Biological Production, Detection, and Fate of Hydrogen Peroxide. *Antioxid Redox Signal*, 29(6), 541-551. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7425>
- Wu, S., Lu, H. et Bai, Y. (2019, May). Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Med*, 8(5), 2252-2267. <https://doi.org/10.1002/cam4.2101>
- Wu, T., Zhao, F., Gao, B., Tan, C., Yagishita, N., Nakajima, T., Wong, P. K., Chapman, E., Fang, D. et Zhang, D. D. (2014, Apr 1). Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis. *Genes Dev*, 28(7), 708-722. <https://doi.org/10.1101/gad.238246.114>
- Xie, W., Tan, B., Yang, Z., Yu, X., Chen, L., Ran, D., Xu, Q. et Zhou, X. (2020, Apr 20). Nrf2/ARE pathway activation is involved in negatively regulating heat-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 52(4), 439-445. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa013>

- Xu, W., Jing, L., Wang, Q., Lin, C.-C., Chen, X., Diao, J., Liu, Y. et Sun, X. (2015). Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. *Oncotarget*, 6(30). <https://www.oncotarget.com/article/5013/text/>
- Yang, C., Liu, X., Yang, F., Zhang, W., Chen, Z., Yan, D., You, Q. et Wu, X. (2017, Mar). Mitochondrial phosphatase PGAM5 regulates Keap1-mediated Bcl-xL degradation and controls cardiomyocyte apoptosis driven by myocardial ischemia/reperfusion injury. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 53(3), 248-257. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0105-2>
- Yang, L., Mih, N., Anand, A., Park, J. H., Tan, J., Yurkovich, J. T., Monk, J. M., Lloyd, C. J., Sandberg, T. E., Seo, S. W., Kim, D., Sastry, A. V., Phaneuf, P., Gao, Y., Broddrick, J. T., Chen, K., Heckmann, D., Szubin, R., Hefner, Y., Feist, A. M. et Palsson, B. O. (2019). Cellular responses to reactive oxygen species are predicted from molecular mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(28), 14368-14373. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1905039116>
- Yang, L., Tan, G. Y., Fu, Y. Q., Feng, J. H. et Zhang, M. H. (2010a, Mar). Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 151(2), 204-208. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.010>
- Yang, M., Yao, Y., Eades, G., Zhang, Y. et Zhou, Q. (2011, Oct). MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. *Breast Cancer Res Treat*, 129(3), 983-991. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1604-1>
- Yang, Y., Xing, D., Zhou, F. et Chen, Q. (2010b, Apr 30). Mitochondrial autophagy protects against heat shock-induced apoptosis through reducing cytosolic cytochrome c release and downstream caspase-3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 395(2), 190-195. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.155>
- Yang, Z., Zhao, Y., Wang, Y., Liu, X., Jiang, Y., Jiang, Y., Liu, T., Hu, Y. et Chang, H. (2024, Jun). Echinacoside ameliorates post-stroke depression by activating BDNF signaling through modulation of Nrf2 acetylation. *Phytomedicine*, 128, 155433. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155433>
- Yates, M. S., Tran, Q. T., Dolan, P. M., Osburn, W. O., Shin, S., McCulloch, C. C., Silkworth, J. B., Taguchi, K., Yamamoto, M., Williams, C. R., Liby, K. T., Sporn, M. B., Sutter, T. R. et Kensler, T. W. (2009, Jun). Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis*, 30(6), 1024-1031. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp100>
- Yu, B., Ma, J., Li, J., Wang, D., Wang, Z. et Wang, S. (2020, May 21). Mitochondrial phosphatase PGAM5 modulates cellular senescence by regulating mitochondrial dynamics. *Nat Commun*, 11(1), 2549. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16312-7>
- Zakic, T., Stojanovic, S., Jankovic, A., Korac, A., Pekovic-Vaughan, V. et Korac, B. (2023, May-Jun). Redox-metabolic reprogramming of skin in mice lacking functional Nrf2 under basal conditions and cold acclimation. *Biofactors*, 49(3), 600-611. <https://doi.org/10.1002/biof.1931>
- Zeb, A., Choubey, V., Gupta, R., Kuum, M., Safiulina, D., Vaarmann, A., Gogichaishvili, N., Liiv, M., Ilves, I., Tamm, K., Veksler, V. et Kaasik, A. (2021, Nov 11). A novel role of KEAP1/PGAM5 complex: ROS

- sensor for inducing mitophagy. *Redox Biol*, 48, 102186.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102186>
- Zeeshan, H. M., Lee, G. H., Kim, H. R. et Chae, H. J. (2016, Mar 2). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci*, 17(3), 327. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>
- Zeng, T., Li, J. J., Wang, D. Q., Li, G. Q., Wang, G. L. et Lu, L. Z. (2014, Nov). Effects of heat stress on antioxidant defense system, inflammatory injury, and heat shock proteins of Muscovy and Pekin ducks: evidence for differential thermal sensitivities. *Cell Stress Chaperones*, 19(6), 895-901.
<https://doi.org/10.1007/s12192-014-0514-7>
- Zeng, X., Chen, Y., Wang, J., He, M., Qiu, J. et Huang, Y. (2024). Targeting autophagy to enhance chemotherapy and immunotherapy in oral cancer. *Front Immunol*, 15, 1535649.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1535649>
- Zhang, J., Xu, H. X., Zhu, J. Q., Dou, Y. X., Xian, Y. F. et Lin, Z. X. (2023a). Natural Nrf2 Inhibitors: A Review of Their Potential for Cancer Treatment. *Int J Biol Sci*, 19(10), 3029-3041.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.82401>
- Zhang, L., Bao, Y. et Li, J. (2011, Aug). Nuclear respiratory factor-1 is involved in mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in human bronchial epithelial cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 109(2), 115-122. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00697.x>
- Zhang, M. et Bi, X. (2024, Jan 10). Heat Shock Proteins and Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 25(2).
<https://doi.org/10.3390/ijms25020876>
- Zhang, X., Pang, R., Zhang, K., Xu, Q., Xu, C., Shi, W., Liang, X., Li, D., Cui, W., Bai, S., Li, Z., Li, H. et Zhang, H. (2023b, Dec). Apocynin exerts cytoprotective effects on dexamethasone-induced osteoblasts by inhibiting oxidative stress through the Nrf2 signalling pathway. *J Cell Mol Med*, 27(23), 3911-3927. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17974>
- Zhang, Y., Hu, N., Hua, Y., Richmond, K. L., Dong, F. et Ren, J. (2012a, Jul 15). Cardiac overexpression of metallothionein rescues cold exposure-induced myocardial contractile dysfunction through attenuation of cardiac fibrosis despite cardiomyocyte mechanical anomalies. *Free Radic Biol Med*, 53(2), 194-207. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.005>
- Zhang, Y., Li, L., Hua, Y., Nunn, J. M., Dong, F., Yanagisawa, M. et Ren, J. (2012b, Apr). Cardiac-specific knockout of ET(A) receptor mitigates low ambient temperature-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *J Mol Cell Biol*, 4(2), 97-107. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs002>
- Zhao, J., Lin, X., Meng, D., Zeng, L., Zhuang, R., Huang, S., Lv, W. et Hu, J. (2020). Nrf2 Mediates Metabolic Reprogramming in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*, 10, 578315.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.578315>
- Zhou, D., Palam, L. R., Jiang, L., Narasimhan, J., Staschke, K. A. et Wek, R. C. (2008, Mar 14). Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *J Biol Chem*, 283(11), 7064-7073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708530200>

- Zhou, H., Li, D., Zhu, P., Ma, Q., Toan, S., Wang, J., Hu, S., Chen, Y. et Zhang, Y. (2018a, Oct). Inhibitory effect of melatonin on necroptosis via repressing the Ripk3-PGAM5-CypD-mPTP pathway attenuates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury. *J Pineal Res*, 65(3), e12503. <https://doi.org/10.1111/jpi.12503>
- Zhou, J., Wang, H., Shen, R., Fang, J., Yang, Y., Dai, W., Zhu, Y. et Zhou, M. (2018b). Mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ provides neuroprotection and reduces neuronal apoptosis in experimental traumatic brain injury possibly via the Nrf2-ARE pathway. *Am J Transl Res*, 10(6), 1887-1899.
- Zhou, Z., Fan, Y., Zong, R. et Tan, K. (2022a, 2022/11/01/). The mitochondrial unfolded protein response: A multitasking giant in the fight against human diseases. *Ageing Research Reviews*, 81, 101702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101702>
- Zhou, Z., Fan, Y., Zong, R. et Tan, K. (2022b, Nov). The mitochondrial unfolded protein response: A multitasking giant in the fight against human diseases. *Ageing Res Rev*, 81, 101702. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101702>
- Zhu, Y. P., Zheng, Z., Hu, S., Ru, X., Fan, Z., Qiu, L. et Zhang, Y. (2019, Dec 19). Unification of Opposites between Two Antioxidant Transcription Factors Nrf1 and Nrf2 in Mediating Distinct Cellular Responses to the Endoplasmic Reticulum Stressor Tunicamycin. *Antioxidants (Basel)*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010004>
- Zinovkin, R. A. et Zamyatnin, A. A. (2019). Mitochondria-Targeted Drugs. *Curr Mol Pharmacol*, 12(3), 202-214. <https://doi.org/10.2174/1874467212666181127151059>
- Zschaecck, S. et Beck, M. (2022). Whole-Body Hyperthermia in Oncology: Renaissance in the Immunotherapy Era? Dans P. Vaupel (dir.), *Water-filtered Infrared A (wIRA) Irradiation: From Research to Clinical Settings* (p. 107-115). Springer Copyright 2022, The Author(s). https://doi.org/10.1007/978-3-030-92880-3_8.