

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INDUCTION DES DEFENSES CELLULAIRES PAR CHOC THERMIQUE:  
PEROXIRÉDOXINE ET GLUCOSE 6-PHOSPHATE DÉSHYDROGÉNASE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MARCELINE TCHOUAGUÉ

OCTOBRE 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). 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.»

## DÉDICACES

**À Dieu mon guide**

**À mes parents et mes sœurs**

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche le docteur Diana Averill-Bates qui m'a démontrée sa confiance au cours de ses 2 dernières années. Je me souviens encore quand je suis venue à mon entretien dans votre bureau. Je vous ai avoué que je n'avais pas beaucoup de connaissance pratiques mais que j'avais toute la volonté du monde pour y arriver. Vous m'avez prise sur vos ailes et m'avez accompagné dans la réalisation de ce chef d'œuvre. Merci encore d'avoir cru en moi.

Je remercie les membres du jury qui ont acceptés de prendre de leur précieux temps pour évaluer ce travail. Grâce à vous la qualité de cette œuvre scientifique sera valorisée avec mérite.

Je remercie également mes collègues de laboratoire le docteur Mélanie Grondin, Maureen Redza, Mélanie Chow Shi Yee et Sarah Kassis. Et puis finalement j'aimerais exprimer toute, mais alors là vraiment toute ma reconnaissance à Audrey Glory pour les heures passées à m'écouter à me conseiller, à me relire, à me corriger, à me suggérer des solutions pour mon mémoire.



## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ .....	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 Cancer .....	1
1.1.1 Introduction et historique .....	1
1.1.2 Statistiques et faits saillants .....	3
1.1.3 Développement du cancer .....	4
1.1.4 Facteurs de risques .....	5
1.2 Traitements du cancer .....	6
1.2.1 Chirurgie .....	7
1.2.2 Radiothérapie .....	7
1.2.3 Chimiothérapie.....	8
1.2.4 Immunothérapie .....	9
1.3 Hyperthermie .....	11
1.3.1 Introduction et historique .....	11
1.3.2 Les différents types d'hyperthermie.....	12
1.3.2.1 Hyperthermie globale.....	12

1.3.2.2	L'hyperthermie régionale .....	13
1.3.2.3	Hyperthermie locale .....	14
1.3.3	Combinaison de l'hyperthermie et les autres thérapies anticancéreuses..	14
1.3.3.1	Hyperthermie et chimiothérapie .....	15
1.3.3.2	Hyperthermie et radiothérapie.....	17
1.3.3.3	Effets moléculaires de l'hyperthermie .....	17
1.4	Le stress oxydatif .....	21
1.4.1	Les espèces réactives oxygénées et leurs effets nocifs.....	21
1.4.2	Rôle du stress oxydatif dans l'induction de l'apoptose .....	24
1.4.3	Mécanismes d'élimination des EORs par la cellule .....	24
1.4.3.1	Famille des peroxirédoxines.....	27
1.4.3.2	Famille des thiorédoxines.....	300
1.4.3.3	Voie des pentoses phosphates .....	32
1.5	Apoptose .....	36
1.5.1	Introduction.....	36
1.5.2	Voies apoptotiques .....	37
1.5.2.1	Voie des récepteurs de mort.....	37
1.5.2.2	Voie mitochondriale.....	39
1.5.2.3	Voie du réticulum endoplasmique.....	44
1.6	Présentation du projet.....	48
1.6.1	Introduction.....	48
1.6.2	Hypothèse.....	49
1.6.3	Objectifs du projet.....	49
1.6.3.1	Objectif générale .....	50

1.6.3.2 Les objectifs spécifiques .....	50
1.6.4 Choix du modèle .....	50
CHAPITRE II	
RESULTATS EXPÉRIMENTAUX .....	52
2.1 Préface.....	52
2.2 Article .....	53
CHAPITRE III	
CONCLUSIONS.....	93
REFERENCES.....	99

## LISTE DES FIGURES

1.1	Les radicaux libres oxygénés représentant les différents états de réduction du dioxygène.....	22
1.2	Régulation de la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) par les systèmes de défenses antioxydantes. ....	25
1.3	Élimination du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	29
1.4	Réaction redox d'élimination des EROs catalysée par le système Trx.. ....	30
1.5	Système Trx de mammifères, un acteur central étroitement lié à de nombreuses maladies humaines.....	31
1.6	Représentation schématique de la branche oxydative et non oxydative de la voie des pentoses phosphates.. ....	35
1.7	Voie des récepteurs de mort .....	39
1.8	Représentation des domaines structuraux des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 .....	41
1.9	Régulation de l'apoptose par les protéines Bcl-2.. ....	43
1.10	Apoptosome.....	44
1.11	Événements de transductions des signaux associés au stress du RE.....	47

## ARTICLE

2.1	Heat shock induces apoptosis: protective effet of thermotolerance (40 °C). ....	84
2.2	Heat shock increases expression of peroxiredoxin antioxydant enzymes.....	85
2.3	Inhibition of heat shock-induced increases in expression of peroxiredoxins by PEG catalase and MnTBAP.....	87
2.4	Mild thermotolerance at 40°C increases intracellular levels of the antioxidant GSH... ..	89
2.5	Increases in levels of GLUT1 and G6PD in heated cells.. ....	90

2.6	Summary of changes to intracellular levels of antioxidant molecules and enzymes caused by 42-43°C hyperthermia (red arrows) and mild thermotolerance induced at 40°C (green arrows) in the cytosol and mitochondria.....	92
-----	--	----

## LISTE DES TABLEAUX

1.1	Liste des différents antioxydants.....	26
1.1	Liste des différents antioxydants.....	27

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AIF</b>	Facteur inducteur de l'apoptose
<b>AP-1</b>	«Activator protein-1»
<b>Apaf-1</b>	Facteur d'activation des protéases apoptotiques
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ASK 1</b>	«Apoptosis signal-regulating kinase 1»
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>Bax</b>	«Bcl-2-associated protein X»
<b>Bcl-2</b>	«B-cell lymphoma-2»
<b>BH</b>	«Bcl-2 homology»
<b>BSA</b>	Albumine sérique bovine
<b>Caspase</b>	«Cysteinyll aspartate-specific protease»
<b>CAT</b>	Catalase
<b>DED</b>	Domaine effecteur de la mort cellulaire
<b>DISC</b>	Complexe inducteur de signal de mort

<b>DMEM</b>	Dulbecco modified eagle's medium
<b>EDTA</b>	«Ethylene diamine tetraacetic acid»
<b>EROs</b>	Espèces réactives oxygénées
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>FADD</b>	Domaine de mort associé à la protéine Fas
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>G6PD</b>	Glucose 6-phosphate déshydrogénase
<b>HIF<math>\alpha</math></b>	Facteur induit par l'hypoxie alpha
<b>HT</b>	Hyperthermie
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>JNK</b>	Kinase de la partie aminoterminal de la protéine c-Jun
<b>MDR</b>	Phénomène de résistance multidrogues
<b>MRP1</b>	«Multidrug resistance protein 1»
<b>MSR</b>	Méthionine sulfoxyde réductase
<b>NAPDH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NF-kB</b>	Facteur nucléaire-kB



<b>PDI</b>	Protéine disulfure isomérase
<b>PD-L1</b>	«Programmed death ligand-1»
<b>PgP</b>	Glycoprotéine-P
<b>Prxs</b>	Peroxi-rédoxines
<b>PTEN</b>	«Phosphatase and tensin homolog»
<b>Ref-1</b>	«Redox effector factor-1»
<b>RNR</b>	Ribonucléotide réductase
<b>RNS</b>	Espèces réactives azotées
<b>RT</b>	Radiothérapie
<b>Trx</b>	Thiorédoxine
<b>TrxR</b>	Thiorédoxine réductase
<b>TXNIP</b>	«Thioredoxin interacting protein»
<b>VDAC</b>	«Voltage-dépendent anion channel»
<b>VPP</b>	Voie des pentoses phosphates
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Différence de potentiel de la membrane mitochondriale

## RÉSUMÉ

L'hyperthermie ou thermothérapie, l'une des rares stratégies à adopter en tant que thérapie alternative prometteuse, est utilisée dans le domaine médical en combinaison avec la radiothérapie et/ou la chimiothérapie pour traiter le cancer. Elle a recours à la chaleur (39-43 °C) pour détruire les cellules cancéreuses. Bien qu'utilisée efficacement lors des essais cliniques en Europe, au Japon, en Australie aux États-Unis et dans d'autres pays, il existe des zones d'ombres sur son fonctionnement au niveau de la cellule. Les températures létales (>42 °C) causent de multiples dommages ainsi que la mort cellulaire, mais les températures plus douces (39-41 °C) causent de la thermotolérance, qui est la résistance aux chocs thermiques subséquents. L'hypothèse du projet est que l'hyperthermie létale et douce cause un stress aux cellules, ce qui augmente la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui pourrait modifier les niveaux d'antioxydants et le transport et le métabolisme du glucose. Notre intérêt s'est porté particulièrement sur les peroxirédoxines (Prxs) qui sont des protéines de type thiol peroxydases jouant un rôle majeur comme antioxydants dans la détoxification des peroxydes et dans le contrôle de la signalisation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le glucose dans le sang est transporté dans les cellules par des protéines transporteuses de la famille GLUT et il y est métabolisé grâce au glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) dans la voie des pentoses phosphates pour leurs fournir du NADPH. Le NADPH est également essentiel pour maintenir l'antioxydant glutathion, un peptide thiol, dans sa forme réduite (GSH). Le GSH est oxydé en GSSG lorsqu'il y a une augmentation des EROs dans les cellules. Ainsi, les objectifs du projet sont de déterminer l'implication des antioxydants tels que les peroxirédoxines et le glutathion dans la réponse de stress cellulaire induite par l'hyperthermie. Par la suite, on évalue si l'hyperthermie modifie le métabolisme du glucose et son transport dans les cellules HeLa pour fournir du NADPH pour maintenir du GSH. Enfin, on détermine le rôle des EROs dans l'induction des antioxydants et le métabolisme du glucose lors de l'hyperthermie. Les résultats montrent qu'en condition d'hyperthermie (42 et 43 °C), les caspases-9 et -3 sont activées ainsi que l'apoptose après 3 h. Par contre on a une diminution de l'apoptose dans les cellules thermotolérantes (3 h à 40 °C). L'hyperthermie et la thermotolérance entraîne aussi une augmentation du niveau d'expression de Prx2, Prx3 et la forme oxydée Prx-SO<sub>3</sub> après 3 h. Le niveau intracellulaire de GSH est augmenté après 1 h à 3 h d'exposition à 40°C. L'hyperthermie et la thermotolérance augmente aussi le niveau d'expression de GLUT1 de 1h à 3h. L'expression de G6PD augmente après 3 h à 42-43 °C mais son activité enzymatique est augmentée de 1 h à 3 h pour les deux

conditions (hyperthermie et thermotolérance). Le niveau cellulaire du NADPH quant à elle ne change pas après 3 h d'exposition à 40°C et à 42 °C. L'augmentation de l'expression de Prx-SO<sub>3</sub> et Prx3 a été inhibée par les antioxydants, la PEG-catalase et le MnTBAP, ce qui suggère que les EROs sont impliquées dans l'induction de l'expression de ces molécules par l'hyperthermie. Ces résultats apportent plus de lumière sur le rôle des antioxydants dans la réponse cellulaire induit par le choc thermique. De plus, ils contribuent à approfondir nos connaissances sur les mécanismes de toxicité et mort cellulaire induits par l'hyperthermie. De plus, cela nous permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la thermotolérance et la toxicité de l'hyperthermie chez les cellules cancéreuses.

**Mots clés:** hyperthermie, thermotolérance, peroxyrédoxine, glucose 6-phosphate déshydrogénase, glutathion, apoptose.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Cancer

##### 1.1.1 Introduction et historique

Le cancer n'est pas une maladie qui date de l'époque contemporaine, au contraire, il existait déjà depuis la préhistoire et des traces de cancer ont été retrouvées dans des fragments de squelettes datant de cette époque. Entre 3000 à 2000 ans avant (av) JC, les vestiges des momies humaines en Égypte ont fourni la première preuve de cancer chez l'homme. Les papyrus égyptiens ont décrit les tumeurs et ulcères de seins et le cancer osseux de l'humérus a été mis en évidence. Les écrits d'Edwin Smith qui sont supposés être les plus anciens disponibles décrivent 7 cas de tumeurs ou ulcères de poitrine et l'auteur conclut que la tumeur du sein est une maladie sans option thérapeutique significative et recommande la cautérisation comme palliatif (Hajdu, 2004).

Bien longtemps après la première définition du cancer est attribuée à Hippocrate (460-377 av JC) pour qui la progression et la longue persistance

de la maladie dans le corps humain rappelait la démarche du crabe. Il a nommé la maladie Karakinos (mot grec qui signifie crabe). Il sera d'ailleurs le premier à reconnaître la différence entre les tumeurs malignes et bénignes. Il a utilisé le mot *carcinus* pour décrire une tumeur, *carcinome* pour décrire une tumeur maligne et *cancer* pour décrire un ulcère malin non guérissable (Zhang et Yue, 2012). Le mot "*carcinus*" fut traduit en "*cancer*" et introduit au latin par le médecin romain Celsus (28 av. JC.-50 ap. JC; (Auerbach 1955)) (Castiglioni, 1931). La définition du cancer selon Hippocrate est reprise ultérieurement par Galien (130-120 après (ap) JC) qui décrit plus précisément les tumeurs comme étant dues à un excès "d'humeurs" de bile noire qui se solidifierait dans certaines parties du corps comme les lèvres, la langue et les seins. Il propose de traiter les malades avec des purgatifs pour diminuer l'accumulation de la bile noire. Aetaeus (81-183 ap JC) a été le premier à compiler les signes, les symptômes et le traitement du cancer de l'utérus. Il a reconnu qu'il existait deux formes distinctes de cancer : l'un était ferme au toucher et sans ulcération et l'autre ulcérait et avait une mauvaise odeur. Il a écrit que les deux types de lésions pouvait être chroniques et mortelles, mais la version ulcérée était particulièrement mauvaise et sans aucun espoir de guérison (Hajdu, 2011). Les travaux de Galien et Hippocrate ont révolutionnés la recherche sur le cancer. Plusieurs médecins ont continué à croire que le cancer était causé par un excès de bile noire et que la maladie pouvait juste être traitée pendant son premier stade. Aetius (527-565) a proposé une mastectomie comme traitement du cancer du sein. Rhazes (860-932) a étudié les tumeurs malignes et a suggéré que la chirurgie ne pouvait pas enlever l'obstruction causé par le cancer à moins que ce dernier ne soit complètement excisé (Onuigbo, 1962).

A l'ère de la renaissance les recherches ont pris une autre tournure avec la découverte du système lymphatique par Gaspard (1581-1626) qui a mis fin à

la théorie ancienne de cancer causé par l'excès de bile noire (Turner-Warwick, 1959). La nouvelle théorie est celle selon laquelle le cancer est causé par des anomalies dans la lymphe et le système lymphatique. Jean Pecquet (1622-1674) préconisa le retrait des ganglions lymphatiques locorégionaux pour prévenir les maladies métastatiques. Du XVIIIème siècle à l'ère moderne, les recherches sur le cancer ont fait des progrès phénoménaux, notamment avec la découverte de l'anesthésie en 1844, des rayons X en 1895, de la radioactivité en 1896, et le développement de meilleurs microscopes pour étudier les tissus cancéreux à la fin du 19 siècle (DeVita Jr et Rosenberg, 2012). La fin du 20e siècle voit également des améliorations considérables dans la compréhension des mécanismes cellulaires liés à la croissance et la division cellulaire, et les connaissances continuent de croître.

### 1.1.2 Statistiques et faits saillants

Le cancer représente l'une des causes majeure de décès dans le monde. Les experts de plusieurs organismes à l'instar de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Union internationale contre le cancer (UICC) travaillent chaque jour pour pouvoir prévenir cette maladie qui évolue rapidement malgré les progrès notoires dans la recherche pour son éradication. Selon l'OMS 8.2 millions de personnes sont mortes du cancer en 2012. 14.1 millions de nouveaux cas de cancer ont été recensés contre 12.7 millions en 2008 (Organisation mondiale de la santé, 2012). 60% de nouveaux cas de cancer concerne les pays en voie de développement, ces derniers représentent 70% des décès par cancer dans le monde. L'OMS estime que le nombre de cas de décès par an devrait augmenter de 14 millions en 2012 à 22 millions au cours des 2 prochaines décennies.



Toutes les heures, environ 22 personnes ont reçu un diagnostic de cancer au Canada en 2014. Le nombre de nouveaux cas chaque année constitue un moyen de mesurer le fardeau que représente le cancer pour la population et le système de santé au Canada. Les tendances et le taux d'incidence peuvent être utilisés pour prédire le fardeau futur du cancer (Société Canadienne du cancer, 2014). Si on s'en tient aux dernières données statistiques de la Société canadienne du cancer, on s'attendrait à ce que 76 600 Canadiens soient morts d'un cancer en 2014. Elle prévoit aussi qu'un Canadien sur 4 mourra du cancer, la probabilité étant plus élevée chez les hommes (environ 1 sur 3,5) que chez les femmes (environ 1 sur 4,2). Selon leurs estimations, on prévoit que 191 300 nouveaux cas de cancers soient diagnostiqués au Canada en 2014. Les principaux cancers au Canada sont le cancer de la prostate (23 600 nouveaux cas attendus, ou 24 % de tous les nouveaux cas chez les hommes) et le cancer du sein (24 400 nouveaux cas attendus, ou 26 % de tous les nouveaux cas chez les femmes). Le taux de mortalité varie en fonction des provinces, l'Atlantique et le Québec affichent généralement les taux d'incidence les plus élevés, tandis que la Colombie-Britannique affiche les taux d'incidence les plus faibles.

La mise en corrélation des données sur l'incidence avec les renseignements sur les facteurs de risques régionaux, comme les taux relatifs au tabagisme ou à l'obésité, pourrait aider à mieux cibler les efforts de prévention régionaux et locaux afin de diminuer les taux d'incidence ou permettre un diagnostic ou un traitement plus précoce, améliorant ainsi les taux de survie et réduisant la mortalité (Société Canadienne du cancer, 2014).

### 1.1.3 Développement du cancer

Le terme cancer est utilisé pour un grand groupe de maladies pouvant prendre naissance dans nos cellules et toucher n'importe quelle partie de l'organisme. Notre

organisme compte des millions de cellules qui sont regroupées en organes et en tissus. Chacune de ces cellules contient des gènes qui régissent son fonctionnement, et sa mort. Mais il arrive parfois que certaines cellules perdent cette faculté à se réguler et se multiplient de façon anarchique : on parle de cancer. Des milliers de mutations ponctuelles, des translocations, amplifications et délétions de l'ADN peuvent contribuer au développement du cancer. L'ADN est susceptible de muter à la suite des dommages causés par des sources externes telles que des radiations ou simplement de façon naturelle par le processus métabolique, et de se réparer par la suite. Mais dans le cas du cancer, les dommages ne sont pas réparés et aboutissent alors à la transformation de la cellule (Cairns *et al.*, 2011; Halazonetis *et al.*, 2008; Halliwell, 2002). Au-delà d'un certain temps, ces groupes de cellules anormales peuvent se mettre en circulation dans le sang ou le système immunitaire, ou encore former une masse appelée tumeur. Les tumeurs peuvent être bénignes et rester localisées dans une partie du corps ou alors être malignes et envahir les parties adjacentes de l'organisme, puis essaimer dans d'autres organes. On parle alors de métastase (Aznavoorian *et al.*, 1993).

#### 1.1.4 Facteurs de risques

La plupart des cancers semblent être liés à un grand nombre de facteurs de risques qui jouent des rôles plus ou moins importants dans le développement de ceux-ci. Parmi les facteurs de risques les plus connus on trouve le tabagisme, la consommation d'alcool, les infections virales et bactériennes, les expositions professionnelles à des produits toxiques, l'obésité et le surpoids, l'inactivité physique, le traitement de la ménopause et l'exposition aux rayons ultra-violets. Le facteur de risque le plus important du cancer est le tabagisme. Il est en cause dans 27 à 30% de tous les cancers, et dans approximativement 90% des cancers du poumon (Boyle *et al.*, 2014). Il est aussi lié aux cancers de la bouche, du larynx et de l'œsophage, de la vessie, du



rein et du pancréas (Doll *et al.*, 1994; Wogan *et al.*, 2004). Une étude menée aux États-Unis prouve que le cholangiocarcinome intra-hépatique qui représente 15% des cas de cancer du foie est lié au diabète, au tabagisme et aux infections à l'hépatite C (Shaib *et al.*, 2005). Un examen des données épidémiologiques sur le surpoids, le diabète et l'insuline réalisée par un groupe de chercheurs prouvent que ses derniers sont en relations étroites avec le cancer du sein. Cette étude démontre que les femmes en surpoids ont un risque supérieur à 2% de développer un cancer du sein par rapports aux autres femmes qui est de 1,5% et que ce taux est plus grand lorsqu'on l'associe à l'âge (La Vecchia *et al.*, 2011). Il est impératif de bien contrôler son alimentation car les amines hétérocycliques, les aflatoxines B1 et certains hydrocarbures polycycliques aromatiques (benzo[a]pyrène) qui se retrouvent parfois dans les aliments peuvent être génétiquement toxiques à forte dose (Wogan *et al.*, 2004). Une surexposition aux rayonnements ultra-violets est susceptible de provoquer un cancer de la peau. Elle est la cause de 90% des cancers de la peau en Amérique du nord (Société Canadienne du cancer, 2014). Ces expositions aux rayonnements ultra-violets se font souvent dans le cadre du travail. En plus de cela les travailleurs sont souvent exposés à d'autres agents tels que l'amiante, l'aluminium, le chrome et les hydrocarbures polycycliques qui peuvent aussi causer le cancer.

## 1.2 Traitements du cancer

La mise au point d'un traitement pour chaque patient atteint du cancer nécessite la réunion de plusieurs paramètres et se fait en principe pour éliminer la tumeur au complet et dans la mesure du possible arrêter sa propagation aux tissus environnants. Pour cela on a généralement recours aux trois principaux traitements qui sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (Sadat *et al.*, 2012). Ces traitements peuvent ne pas être efficaces ou appropriées pour éliminer la tumeur mais dans certains cas on a recours à des traitements plus spécialisés telles que

l'immunothérapie, l'hormonothérapie, la thérapie génique, l'enzymothérapie, la thérapie photo-dynamique, la thérapie nutritionnelle (Vanneman et Dranoff, 2012) et bien d'autres tels que l'hyperthermie (Issels, 2008).

### 1.2.1 Chirurgie

La chirurgie a été pendant longtemps l'unique moyen de traiter le cancer et reste à l'heure actuelle l'une des méthodes les plus utilisées. Elle demeure parmi les seuls traitements qui permettent de respecter au maximum l'intégrité corporelle. La chirurgie est utilisée pour traiter les tumeurs solides surtout lorsque celles-ci sont primitives (Causey *et al.*, 2012). Elle consiste à enlever la tumeur de façon partielle (chirurgie limitée) ou totale (opération radicale) pour s'assurer une marge de sécurité. Pour des cas extrêmes elle peut être utilisée pour enlever une zone (résection de la zone cancéreuse) ou encore la totalité de l'organe malade (amputation). Il existe plusieurs types d'interventions chirurgicales suivant le type de cancer et le stade de la maladie. La chirurgie d'exérèse à visée curative est utilisée pour l'ablation des tumeurs primitives ou secondaires. La chirurgie cytoréductrice s'utilise pour les tumeurs solides chimio-sensibles avancées. La chirurgie de rattrapage s'adresse aux récurrences de tumeurs sans extension métastatique. La chirurgie des masses résiduelles s'applique pour certains cancers dans le but d'apprécier si ces derniers ont évolué ou non. Enfin, la chirurgie des métastases est utilisée à un stade avancé de la maladie dans l'espoir de réaliser une exérèse des métastases (Pathak *et al.*, 2013).

### 1.2.2 Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers qui utilise des radiations qui causent des cassures sur l'ADN double brin et aboutit à la destruction des

cellules cancéreuses (Kaur *et al.*, 2011). Elle est le plus souvent faite par voie externe, mais elle peut faire intervenir des sources radioactives qui sont placées directement dans l'organisme (curiethérapie). Dans certains cas (cancers de la thyroïde, maladie de vaquez), la radiothérapie métabolique peut être utilisée. Elle consiste à administrer par injection intraveineuse ou par voie orale une substance radioactive qui ira se fixer préférentiellement sur les cellules cancéreuses afin de les détruire. La radiothérapie de conformation avec modulation d'intensité (IRCM) est une nouvelle technique qui permet d'adapter le volume d'irradiation à la tumeur en protégeant les organes environnants. Elle est une arme thérapeutique efficace dans les cancers localisés de la prostate (Azria *et al.*, 2009). Elle représente aussi une méthode d'optimisation potentiellement efficiente pour mieux épargner le tractus digestif lors des irradiations du cancer du col de utérus (Barillot, 2009). La radiothérapie peut être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres thérapies anti-cancéreuses. En combinaison avec la chirurgie elle peut intervenir avant l'opération pour diminuer la taille de la tumeur: on parle de radiothérapie préparatoire ou après celle-ci pour détruire les cellules cancéreuses restantes : dans ce cas on parle de radiothérapie postopératoire. Pendant l'opération elle est utilisée pour envoyer une dose unique élevée de rayons sur la zone cancéreuse ce qui réduit l'irradiation des tissus sains (Kapiteijn *et al.*, 2001). La radiochimiothérapie consiste elle à administrer des médicaments de chimiothérapie en même temps que la radiothérapie (Liao *et al.*, 2007). Elle est utilisée dans le cas du cancer du col de l'utérus, du canal anal, de l'œsophage, etc (Kup *et al.*, 2015).

### 1.2.3 Chimiothérapie

La chimiothérapie est l'utilisation des médicaments (agents chimiques cytotoxiques) pour détruire les cellules cancéreuses ou empêcher leur croissance (Feng et Chien, 2003). Cette thérapie est le plus souvent utilisée pour éliminer les cellules cancéreuses qui se sont dispersées dans l'organisme. Avant une intervention

chirurgicale ou une radiothérapie, elle peut être utilisée pour réduire la taille de la tumeur ou après ces deux interventions pour détruire les cellules cancéreuses qui auraient échappé aux traitements. Il existe un grand nombre d'agents chimiothérapeutiques qui peuvent être subdivisés en plusieurs catégories comprenant les agents alkylants, les antimétaboliques (antipurines, antipyrimidine, antifolates), les alcaloïdes végétaux (vinca-alcaloïdes, taxanes et epothilons), les antibiotiques anti-tumoraux et les inhibiteurs de la topoisomérase (doxorubicine) (Brannon-Peppas et Blanchette, 2012). Les cellules cancéreuses ayant la caractéristique de se multiplier rapidement et anarchiquement, la majorité de ces agents anticancéreux agissent sur le cycle cellulaire en inhibant les enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN et par là, la division cellulaire (Brannon-Peppas et Blanchette, 2012). Les agents alkylants tels que le cyclophosphamide et le cisplatine sont utilisés dans le traitement du cancer ovarien (Tattersall, 2002). Les taxanes (Paclitaxel et Docétaxel) sont utilisés pour traiter le cancer du sein avancé (Earhart, 1999). Ces agents cytotoxiques peuvent être utilisés individuellement ou être combiné entre eux. Il a été démontré que la combinaison de ces agents permet une éradication plus efficace du cancer du poumon et du col de l'utérus (Perera *et al.*, 2014).

#### 1.2.4 Immunothérapie

Le système immunitaire est normalement considéré comme offrant une protection contre les maladies infectieuses (Bergman, 2009). La capacité du système immunitaire à reconnaître et à éliminer le cancer est la raison fondamentale de l'utilisation de l'immunothérapie comme thérapie anticancéreuse. Le rétablissement spontané des patients atteints de cancer sans traitement, la présence des cellules T cytotoxiques tumorales spécifiques à l'intérieur des tumeurs ou dans les ganglions lymphatiques, la présence de monocytes, lymphocytes et plasmocytes dans les tumeurs sont plusieurs raisons qui s'ajoutent à l'augmentation de l'incidence de

certaines types de cancer chez les patients qui sont immunodéprimés et la documentation des rémissions de cancer avec l'utilisation des immuno-modulateurs pour renforcer l'idée selon laquelle l'immunothérapie serait une option thérapeutique majeure en cancérologie (Bergman, 2009).

L'immunothérapie peut être active, passive ou adoptive. Lorsqu'elle est active, elle stimule et renforce la réponse du système immunitaire afin de lui permettre d'attaquer et de détruire les cellules cancéreuses. Cette immunothérapie active peut être non spécifique à base d'interféron ou d'interleukine. Dans ce cas, elle stimule ou active le système immunitaire de manière très générale. L'immunothérapie spécifique a recours à des vaccins capables de maintenir la capacité des cellules effectrices du système immunitaire à reconnaître et à lyser les cellules tumorales. L'immunothérapie passive fait appel notamment à des anticorps monoclonaux qui agissent de la même façon que certaines parties du système immunitaire et qui attaquent des cellules spécifiques. Ces anticorps sont produits en laboratoire. Ils se lient aux antigènes des cellules tumorales et induisent une cascade d'évènements menant à leurs destructions (Baurain *et al.*, 2008; Weiner *et al.*, 2009). L'immunothérapie adoptive la plus souvent utilisée pour traiter les cancers solides consiste à apporter au patient des cellules immunologiquement compétentes stimulées *in vitro* (Ludewig et Hoffmann, 2005).

Au cours des deux dernières décennies, l'immunologie des tumeurs a connu un réel bouleversement et un foisonnement de découvertes fondamentales qui se sont traduites en applications cliniques. Un certain nombre de vaccins contre les cancers sont très prometteurs et sont en phases II/III actuellement (Copier *et al.*, 2009; Vergati *et al.*, 2010). Le récepteur de mort programmé PD-1 est un régulateur négatif de mécanismes des cellules T effectrices qui limite la réponse immunitaire contre le cancer. Des tests préliminaires sur des patients souffrant des cancers avancés du poumon, de la peau ou encore des reins montrent un avenir prometteurs aux

traitements anti PD-1 («Programmed Death-1») et anti-PD-L1 («Programmed Death Ligand-1») pour améliorer la survie de ces derniers (Hamid *et al.*, 2013; Topalian *et al.*, 2012).

### 1.3 Hyperthermie

#### 1.3.1 Introduction et historique

L'hyperthermie, encore appelée thérapie thermique ou thermothérapie, est une méthode de traitement de cancer qui consiste généralement à exposer les patients à des températures élevées (39-43 °C) pour endommager et détruire les cellules cancéreuses, ou pour les rendre plus sensibles aux effets des radiations et de certains agents anticancéreux (Palazzi *et al.*, 2010).

L'utilisation de l'hyperthermie date de plusieurs siècles avant l'ère moderne. Les papyrus médicaux égyptiens seraient d'ailleurs les plus vieux écrits portant sur l'hyperthermie. Ils rapportent que le cancer du sein fut traité à cette époque grâce à des bâtons chauffés (Bettaieb *et al.*, 2013). Ayurvedic, un médecin indien aurait pratiqué une hyperthermie locale et une hyperthermie globale (sur le corps entier) 3000 ans av JC (Baronzio *et al.*, 2006). Plusieurs publications concernant l'hyperthermie citent aussi Hippocrate (460-370 ans av JC) qui préconisait la cautérisation pour traiter les tumeurs (van der Zee, 2002). Entre le 19ème et le 20ème siècle, avec l'observation de la guérison soudaine du cancer chez des patients souffrant d'infections diverses, Busch conclut que la fièvre induit par certaines bactéries comme l'érésipèle peut causer une régression de la tumeur ou guérir le cancer. En 1891, le Dr Coley un américain va incorporer la bactérie *serratia marcescens* dans le vaccin streptococcique pour former ce qu'il appellera "Coley's toxin" un mélange qui lui permettra de contrôler la croissance tumorale. Le traitement

est administré par voie intraveineuse et la dose de toxine est efficace sauf si celle-ci est accompagnée par de la fièvre (39-40 degrés Celsius) (Baronzio *et al.*, 2006). L'intérêt international pour l'hyperthermie s'est vu accroître avec le premier congrès sur l'utilisation de l'hyperthermie en oncologie à Washington en 1975. Un nombre important de publications intéressantes sur l'hyperthermie voient le jour chaque année et les résultats cliniques sont de plus en plus prometteurs (Baronzio *et al.*, 2014; Twombly, 2010).

### 1.3.2 Les différents types d'hyperthermie

La plupart des thérapies anticancéreuses (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie, etc) ne touchent pas les cellules au centre de la tumeur. Le but étant de cibler et de détruire la tumeur en limitant la cytotoxicité des traitements aux tissus sains, différents types d'hyperthermie sont utilisés pour y arriver dépendamment du type de cancer, de sa localisation et du stade auquel il se trouve (Baronzio *et al.*, 2014).

#### 1.3.2.1 Hyperthermie globale

L'hyperthermie globale (HTG), utilisé pour traiter les cancers métastatiques, implique un réchauffement global du corps à des températures étant le plus souvent autour de 41.8- 42 °C à l'aide de plusieurs sources de chaleurs telles que les ondes radio, les ultrasons, la perfusion et l'énergie électromagnétique. Ces différentes techniques peuvent être utilisées seule ou combinées (Baronzio *et al.*, 2006; Palazzi *et al.*, 2010). Le caractère commun à ses différents types de traitement est l'introduction de l'énergie dans le corps en prévenant les pertes d'énergies et en restaurant les fluides électrolytes. Dépendamment du sous type d'HTG, les patients peuvent subir une anesthésie générale ou une sédation profonde lorsqu'ils sont soumis à une HTG



extrême (élévation de la température à 42 °C pendant 60 min) ou alors à une HTG modérée (élévation de la température entre 39.5-41 °C pendant 4 h) (Chichef *et al.*, 2007). Des études récentes ont démontré que l'hyperthermie globale était utilisée de façon efficace en clinique pour lutter contre le cancer de l'ovaire, les sarcomes de tissus mous et le mélanome malin (Palazzi *et al.*, 2010). De plus, l'HTG combiné avec les agents chimio-thérapeutiques (doxorubicin et l'interféron- $\alpha$ ) pour traiter des enfants souffrant d'un carcinome avancé des cellules rénales s'est avéré efficace et sans complications (Ismail-zade *et al.*, 2005). Néanmoins quelques effets secondaires tels que la diarrhée, la nausée, et les vomissements peuvent être associés à l'HTG (Chichef *et al.*, 2007).

#### 1.3.2.2 L'hyperthermie régionale

L'hyperthermie régionale (HTR) est une méthode appliquée par perfusion avec des fluides chauffants pour traiter les grandes zones de tissus telles que les cavités corporelles, les organes ou les membres. Selon le type de cancer et sa localisation plusieurs composantes de l'HTR peuvent être utilisées. Par exemple: l'HTR profonde est utilisée pour traiter les cancers du col de l'utérus et de la vessie. La perfusion péritonéale est utilisée pour les cancers affectant la cavité péritonéale à l'instar du cancer péritonéal primaire et de l'estomac. Enfin, la perfusion régionale est appliquée pour les cancers des jambes et des bras ou encore les cancers des organes tel que le foie et les poumons (Chichef *et al.*, 2007). L'HTR combinée avec la radiothérapie est une méthode prometteuse pour une élimination plus efficace des cancers avancés et récurrents de la prostate (Tilly *et al.*, 2005). Elle permet aussi de prolonger la survie des patients dans certains cas de cancer du pancréas primaire ou avancé lorsqu'elle est associée à la radio- et la chimiothérapie (Maluta *et al.*, 2011).



### 1.3.2.3 Hyperthermie locale

L'hyperthermie locale (HTL) est dédiée à l'élimination des petites tumeurs (inférieur à 3 cm de hauteur et 5-6 cm de diamètre). Elle peut être appliquée grâce à la méthode externe, intra-luminaire ou encore interstitielle pour traiter les cancers de peau, du sein ou encore des tumeurs profondes telles que la tumeur du cerveau (Baronzio *et al.*, 2006). Les micro-ondes, les ondes radio, et les ultrasons sont utilisés pour fournir de la chaleur à la tumeur. Au cours du traitement du cancer par l'HTL, juste une petite zone cancéreuse est ciblée. Cette zone est chauffée aussi fort et aussi longtemps que les tissus sains environnant peuvent le supporter. Aussi pour prévenir les effets secondaires du chauffage, les appareils sont équipés de boules d'eau au niveau de leurs points de contact avec la peau permettant ainsi de maintenir la température de la peau à environ 37 °C (Baronzio *et al.*, 2014; Chicheł *et al.*, 2007). Il a été reporté que la combinaison de l'HTL avec la radiothérapie permettait de mieux éliminer la tumeur et de réduire les risques de récurrences chez les patients souffrants de tumeur superficielle par rapport à la radiothérapie seule (Lartigau *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 1984). Aussi l'utilisation de la doxorubicine liposomale à faible température combinée avec l'HTL est un traitement sûr et efficace pour les patients ayant subi un prétraitement lourd pour le cancer du sein local récurrent et récidiviste (Zagar *et al.*, 2014).

### 1.3.3 Combinaison de l'hyperthermie et les autres thérapies anticancéreuses

La combinaison de l'hyperthermie avec les autres thérapies anticancéreuses s'avère plus efficace que l'hyperthermie utilisée seule avec une bonne réponse accompagnée d'un meilleur contrôle de la tumeur, des effets palliatifs et un taux de survie amélioré. En générale, l'HT combiné à la radiothérapie ne provoque pas une augmentation de la toxicité des rayonnements aux tissus sains. Aussi la toxicité de la chimiothérapie aux

tissus sains est nettement diminuée dépendamment du mode d'administration des deux séquences de traitement et de la façon donc les tissus sont chauffés (Baronzio *et al.*, 2014; van der Zee, 2002).

#### 1.3.3.1 Hyperthermie et chimiothérapie

La chaleur modifie la cytotoxicité de nombreux agents chimiothérapeutiques (Issels, 2008). Les médicaments montrant une dépendance à la chaleur lors de leurs utilisations sont des agents chimiothérapeutiques parfaits pour être combiné à l'HT car cette dernière augmente de façon significative leur efficacité dans la zone où se trouve la tumeur. En effet l'HT permet une bonne diffusion des médicaments dans la zone tumorale ce qui permet une diminution des concentrations des médicaments à utiliser et donc une diminution du temps de traitement par chimiothérapie et des effets secondaires.

Il a été démontré dans une étude *in vivo* que l'efficacité cytotoxique de certains agents chimiothérapeutiques était maximisée à des températures allant de 40.5- 43 °C (Chae *et al.*, 2014; Urano, 1999). De même, dans ces investigations, l'effet du temps d'administration des deux traitements est évalué *in vitro*. Il en découle que pour certains anticancéreux comme la doxorubicine, les dérivés du platine (le cisplatine, le carboplatine), les agents alkylants bifonctionnels (melphalan) et les antimétabolites (méthotrexate), l'activité cytotoxique maximale est obtenue lorsque les agents anticancéreux et l'HT sont administrés de façon rapprochée. Des études sur l'exposition à des séquences chaleur/médicaments montrent que l'administration des médicaments juste après l'HT est plus efficace sauf pour certains antimétaboliques telles que la gemcitabine ou un intervalle de temps de 24 h est requis pour un effet synergique *in vivo* et *in vitro* (Issels 2008).

Les mécanismes par lesquels l'hyperthermie améliore la toxicité de ces médicaments ne sont pas entièrement connus. Néanmoins, les mécanismes possibles comprennent l'amélioration de l'administration de médicaments à la tumeur due à l'augmentation de la perfusion sanguine, l'augmentation de l'absorption intracellulaire des médicaments, et l'augmentation du taux de réaction des médicaments avec des cibles thérapeutiques (Baronzio *et al.*, 2006; Bettaieb *et al.*, 2013). Des expériences *in vivo* montrent aussi que le médicament de choix à température physiologique n'est pas forcément le médicament de choix à température élevée (Urano, 1999). Cela a été prouvé pour les agents alkylants qui sont plus efficaces à température élevée pour plusieurs types de cancer (Takemoto *et al.*, 2003).

La multi-résistance aux médicaments est un obstacle majeur dans le traitement du cancer et représente environ 90% des échecs thérapeutiques. L'addition de l'HT et la chimiothérapie est capable de renverser la résistance de nombreux médicaments anticancéreux telles que la doxorubicine, le cisplatine, la mitomycine C le mitoxantrone et les nitrosurées (van der Zee, 2002). L'HT (42-43 °C) a montré des effets bénéfiques en inversant la MDR (phénomène de résistance aux médicaments) impliquant la glycoprotéine-P (PgP) (Wrzal *et al.*, 2008) ou la multi-résistance protéine 1 (MRP1) (Souslova et Averill-Bates, 2004) et lorsque le melphalan ou adriamycine ont été combinées avec des modulateurs de la PgP tels que la cyclosporine A ou le vérapamil (voir revue, Bettaieb *et al.*, 2013). De plus, l'HT augmente nettement l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et l'activité de la caspase-3 dans les cellules cancéreuses (Bettaieb *et al.*, 2013; Glory *et al.*, 2014). L'HT associée avec la 5-bromotétrandrine et la doxorubicine diminue sensiblement l'expression de la PgP et de la protéine anti-apoptotique Bcl2 et augmente nettement l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax inversant par-là la multi-résistance médicamenteuse dans le traitement de la leucémie (Ren *et al.*, 2012).

### 1.3.3.2 Hyperthermie et radiothérapie

L'HT est considérée comme l'un des puissants radio-sensibilisateurs. En effet, elle augmente la perfusion et donc l'oxygénation des cellules hypoxiques tumorales, qui sont trois fois plus résistantes aux rayonnements ionisants que les cellules saines; par conséquent l'action de la radiothérapie (RT) devient de 1,5 à 5 fois plus efficace (Palazzi *et al.*, 2010). Les cellules tumorales qui sont résistantes aux radiations incluant celles qui sont hypoxiques, qui ont un pH faible, qui sont privées de nutriments et qui sont en phase S sont précisément les cellules qui sont sensibles à l'HT. L'HT permet alors d'améliorer leurs sensibilités à la radiothérapie par induction de l'apoptose et d'autres mécanismes de mort cellulaire. Cela entraîne une diminution des doses d'irradiations de 15% à 25%, une augmentation de l'efficacité du traitement des tumeurs et une diminution des effets secondaires dus aux radiations.

L'HT a un impact clinique significatif et améliore la survie lorsqu'elle est utilisée de manière synergique avec la RT. Cela a été prouvé dans le traitement des tumeurs locales et avancées du col de l'utérus (Franckena, 2012; Heijkoop *et al.*, 2012) et du poumon (Babincová *et al.*, 2014). Cette combinaison pourrait être aussi prometteuse pour le traitement des glioblastomes (Man *et al.*, 2015). Une étude a démontré que la combinaison de l'HT avec la chimiothérapie et la RT pour traiter les patients atteints d'un cancer avancé du col de l'utérus est réalisable et efficace avec une amélioration globale de survie de 15% comparé aux patients à ceux traités avec une radiochimiothérapie standard (Westermann *et al.*, 2005).

### 1.3.3.3 Effets moléculaires de l'hyperthermie

Plusieurs facteurs affectent la réponse de la tumeur à la chaleur, entre autres, les caractéristiques intrinsèques de la tumeur et son environnement. Selon les

scientifiques, la mort par apoptose des cellules cancéreuses soumises à une hyperthermie serait due aux lésions causées au niveau de la membrane plasmique, du cytosquelette et du noyau cellulaire (Baronzio *et al.*, 2014; Bettaieb *et al.*, 2013). Les cellules cancéreuses existent dans un environnement à pH bas, dû à l'incapacité à éliminer les métabolites anaérobies ce qui les rend plus sensible à l'HT. L'HT rompt la stabilité des protéines cellulaires et les détruit (Baronzio, *et al.*, 2006).

La sensibilité de la cellule à la chaleur varie avec la phase du cycle cellulaire dans laquelle elle se trouve. L'hyperthermie cause des changements au niveau de la mitose en arrêtant généralement la phase G et causant la perte de la capacité de reproduction de la cellule (Bettaieb *et al.*, 2013). De façon générale, la synthèse de l'ADN et de l'ARN ainsi que le mécanisme de réparation de l'ADN et de la respiration cellulaire vont être inhibées. Des études réalisées sur différents types de cellules incluant les cellules HeLa montrent que l'hyperthermie (42-43 °C) peut causer la condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN conduisant à l'apoptose (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Aussi, lorsque la RT est suivie d'un traitement par HT on assiste à une diminution de la synthèse de l'ADN après 60 min d'incubation. L'enzyme ADN polymérase- $\beta$  intervenant dans plusieurs processus de réparation étant fortement inhibée peut être considérée comme une bonne cible grâce à sa sensibilité thermique déjà connue (Baronzio *et al.*, 2006).

Au niveau de la membrane, plusieurs changements sont observés comme celui de l'augmentation de la fluidité et la diminution de la stabilité membranaire et du changement de la forme de la cellule affectant le transport transmembranaire (Baronzio *et al.*, 2014). Une augmentation de la fluidité membranaire a été observée chez les cellules thermosensibles et pas chez les cellules thermotolérantes suggérant que les altérations membranaires représentent une cible importante dans la mort cellulaire par HT (Bates *et al.*, 1985; Stevenson *et al.*, 1981). Ces changements ont donné lieu à des nombreuses investigations qui permettent de constater une



modification du potentiel membranaire de la cellule (Bettaieb et Averill-Bates, 2005) et la modulation des pompes à flux transmembranaire, menant la cellule vers une mort apoptotique (Hildebrandt *et al.*, 2002).

L'hyperthermie induit aussi la mort cellulaire par apoptose en passant par la voie des mitochondries et la voie des récepteurs de mort (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Ces deux voies impliquent l'activation des caspase-9 et caspase-8, respectivement, suivi par l'activation de caspase-3 dans la phase d'exécution d'apoptose. Évidemment, cet effet apoptotique accrue s'accompagne d'une modification de l'expression des protéines apoptotiques p53, Bcl-2 et Bax (Liang et al., 2007). Une étude récente a d'ailleurs montré que l'hyperthermie crée un déséquilibre entre les membres de la famille Bcl-2 en faveur des protéines pro-apoptotique tels que Bax et Bak, au niveau cellulaire et mitochondriale (Glory et al., 2014).

D'autres part, on assiste à une dilatation des crêtes mitochondriales, et à une augmentation du flux des espèces réactives de l'oxygène qui vont induire en partie la cytotoxicité (Baronzio *et al.*, 2006). L'hyperthermie provoque une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale, le recrutement de la protéine pro-apoptotique Bax à la membrane mitochondriale et la libération du facteur pro-apoptotique cytochrome c dans le cytosol (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). La libération du cytochrome c conduit à l'activation de la caspase-9 initiateur. L'activation de la caspase-9 conduit à son tour à l'activation des caspases exécutrices 3, 6 et 7 menant à la mort de la cellule par apoptose. Cette mort de la cellule en réponse à l'hyperthermie est médiée par la génération des EROs (Bettaieb et Averill-Bates, 2008). La source probable des EROs dans la mitochondrie suite à une hyperthermie est la chaîne des transporteurs d'électrons (voir revue, Bettaieb et al, 2013). L'hyperthermie entraîne sûrement une augmentation de la formation du superoxyde par la chaîne des transporteurs d'électron. Ce superoxyde est ensuite

transformé en peroxyde d'hydrogéné qui est susceptible d'être diffusé hors de la mitochondrie. La grande sensibilité des cellules tumorales à la chaleur dépend du bon déroulement des effets biochimiques ci-dessus, mais aussi du microenvironnement dans lequel les cellules tumorales se trouvent.

En situation d'hyperthermie, les protéines de chocs thermiques vont être synthétisées de façon accrue (Multhoff *et al.*, 1995). En effet, lorsque soumises à un choc thermique, seules les cellules cancéreuses présentent à leur surface des protéines de choc thermique. Cela va stimuler les macrophages et les cellules dendritiques qui vont sécréter les cytokines et activer les défenses cellulaires pour éliminer ces cellules cancéreuses. Aussi l'induction des protéines de choc thermique est en corrélation avec d'autres évènements tels que le développement de la thermotolérance (Bettaieb et Averill-Bates, 2005) et l'augmentation de la cytotoxicité au niveau des protéines associées à la matrice nucléaire (Baronzio *et al.*, 2006). Les protéines de choc thermique sont largement associées à la résistance des tumeurs à la chimiothérapie (Baronzio *et al.*, 2014). Il a été démontré que l'expression de protéines de choc thermique 1A est associée à la radiorésistance (Kaur *et al.*, 2011).

Par contre, la cellule est capable de développer une réponse adaptative suite à son exposition à des températures allant de 39.5 à 40 °C (température observée lors des fièvres) et devenir résistante à un stress subséquent comme le choc thermique : cette réponse est la thermotolérance. Elle peut également protéger les cellules et les tissus contre les dommages causés par d'autres formes de stress tels que le stress oxydatif (Martindale et Holbrook, 2002) et les facteurs de stress environnementaux. La thermotolérance peut être développée par exposition à court terme (30 min par exemple) à des températures létales (de 42 à 45 °C). Elle peut aussi être développée par chauffage continu (par exemple 24 h) à des températures non-létales (39.5 à 41.5 °C) (Przybytkowski *et al.*, 1986). La thermotolérance est transitoire et diminue généralement en quelques jours, ce qui n'affecte pas l'utilisation de l'hyperthermie en

clinique. Il a été démontré que la thermotolérance protège les cellules contre l'activation de la voie des récepteurs de mort et de la voie mitochondriale causé par le choc thermique et le peroxyde d'hydrogène évitant ainsi à la cellule de mourir par apoptose (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Pallepati et Averill-Bates, 2010; Pallepati et Averill-Bates, 2011).

#### 1.4 Le stress oxydatif

Dans un contexte physiologique, il existe un équilibre entre la production d'ERO et les systèmes de défenses antioxydants. Le stress oxydatif est une condition biochimique caractérisée par le déséquilibre entre un niveau relativement élevé des espèces réactives toxiques principalement constituées des espèces réactives oxygénées (EROs), et des espèces réactives azotées (RNS) et les mécanismes de défense antioxydants de l'organisme (Carmody et Cotter, 2001; Thannickal et Fanburg, 2000). Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'une activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une oxydation des molécules comme le glucose et l'hémoglobine ou encore d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices. Pour finir, une alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant (Pincemail *et al.*, 2002).

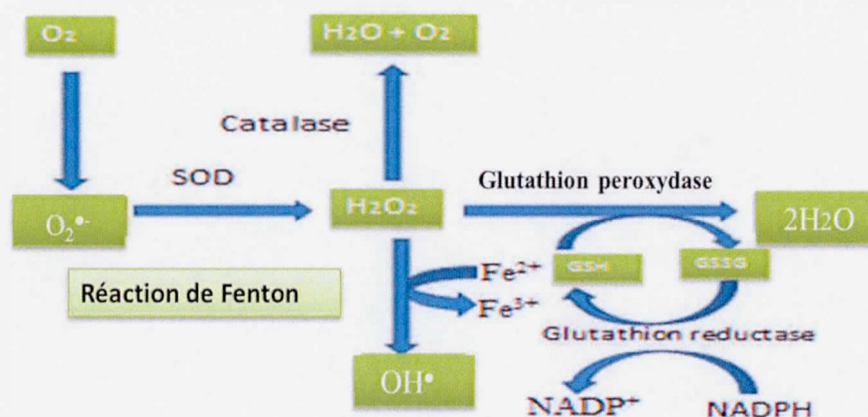
##### 1.4.1 Les espèces réactives oxygénées et leurs effets nocifs

Les EROs sont des molécules organiques ou inorganiques ayant un nombre impair d'électron. Elles sont fortement réactives et formées *in vivo* par des réactions d'oxydo-réductions. Elles sont essentielles à la vie grâce à leur rôle dans de nombreux processus vitaux tels que l'activité bactéricide des phagocytes et la



transduction du signal. Elles peuvent servir de messenger dans la voie de transduction de signaux cellulaires, et peuvent aussi promouvoir la croissance et la prolifération cellulaire en interagissant avec les récepteurs spécifiques et en modulant l'état redox des molécules et les mécanismes de signalisations responsables de la stimulation et de la croissance des cellules (Pelicano *et al.*, 2004). Bien que l'oxygène soit important dans le métabolisme oxydatif, il peut aussi être partiellement réduit pour former des EROs (Aslan et Özben, 2003; Ozben, 2007).

Les EROs sont constitués des espèces radicalaires et non radicalaires. On en dénombre plusieurs donc les principales sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), le radical peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ), le radical alkyle ( $R^{\bullet}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). L' $O_2^{\bullet-}$  est le premier ERO qui se forme dans l'organisme. Il provient le plus souvent d'une transformation incomplète de l' $O_2$  en  $H_2O$  principalement causé par les électrons qui se sont échappés du système de transport d'électrons au niveau de la mitochondrie. L' $O_2$  en milieu protoné subit généralement une réaction spontanée qui aboutit à la formation du  $H_2O_2$  et de l'oxygène. Le  $H_2O_2$  quant à lui est capable d'oxyder les groupements thiol des résidus cystéines. Il se dégrade en radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) en présence des métaux de transition  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{1+}$  (voir figure 1.1). Les radicaux alkyles sont les derniers dans la chaîne de production des EROs. Ils résultent de l'action oxydant du  $OH^{\bullet}$  sur la chaîne d'acide gras poly-insaturées (RH) (Halliwell, 2007; Shi *et al.*, 2005). Les  $OH^{\bullet}$  sont les espèces réactives les plus dangereuses et les plus réactives comparativement au  $H_2O_2$  et à l' $O_2^{\bullet-}$ .



**Figure 1.1** Les radicaux libres oxygénés représentant les différents états de réduction du dioxygène.

Une production élevée d'oxyde nitrique ( $NO^{\bullet}$ ) prédispose la cellule à une tumorigénèse à travers les lésions de l'ADN, l'inhibition de la réparation de l'ADN et l'altération ou l'activation de la voie de prolifération cellulaire (Haddad, 2004; Kim *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2000). Lorsqu'on perd l'équilibre redox, les EROs peuvent aussi contribuer à une prolifération cellulaire incontrôlée compromettant par-là les fonctions de régulation du cycle cellulaire aboutissant au développement du cancer (Gopalakrishna et Jaken, 2000; Pelicano *et al.*, 2004). L'ADN mitochondrial est plus vulnérable aux dommages causés par les EROs que l'ADN nucléaire. Les mutations de l'ADN sont le plus souvent détectées dans les cellules cancéreuses à proximité des lieux de production des EROs dans les mitochondries. Ces mutations sont susceptibles d'affecter la fonction des protéines pour lesquelles l'ADN mitochondrial code, entraînant un dysfonctionnement dans la chaîne respiratoire, donc une amplification de la production des EROs (Copeland *et al.*, 2002; Jackson et

Loeb, 2001; Pelicano *et al.*, 2004). Les dommages au niveau de la membrane des mitochondries peuvent causer une libération des cytochromes c et activer l'apoptose (Pelicano *et al.*, 2004).

#### 1.4.2 Rôle du stress oxydatif dans l'induction de l'apoptose

Les radicaux libres en particuliers les EROs sont connus comme étant des médiateurs de l'apoptose. Une génération aigue, transitoire ou élevée des EROs est souvent observée dans l'apoptose induite par divers agents anticancéreux. L'exposition des cellules cancéreuses aux EROs générés par les agents anticancéreux, épuisent la capacité de défense antioxydant de la cellule et entraîne la mort par apoptose au-delà d'un seuil des EROs. Il a d'ailleurs été démontré qu'en incubant des cellules cancéreuses avec des agents oxydants exogènes on assiste à une mort cellulaire par apoptose (Haddad, 2004; Kehrer, 2000; Palapati et Averill-Bates, 2010). En absence d'une défense efficace par les antioxydants les dommages produits par le stress oxydatif peuvent conduire à l'activation des gènes responsables de l'apoptose. L'augmentation des EROs est aussi associée à l'activation de la voie de signalisation redox JNK/SAPK qui est très impliquée dans l'activation transcriptionnelle des gènes de modification post-traductionnelles des protéines nécessaires à l'apoptose (Haddad, 2004).

#### 1.4.3 Mécanismes d'élimination des EORs par la cellule

L'excès de productions des ERO peut mener la cellule à la mort. Cependant, les organismes vivants ont développés des puissantes défenses antioxydantes et une signalisation très fine qui repose sur des systèmes de défense composés d'enzymes SOD, CAT, GPx, couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, hème oxygénase,

peroxyrédoxine), de molécules antioxydantes de petites tailles (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, acide lipoïque, ubiquinone.) (voir figure 1.2). Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases et ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail *et al.*, 2002; Sies, 1997). Ces systèmes font intervenir des enzymes antioxydantes, et des molécules antioxydants endogènes et exogènes (voir tableau 1.1).

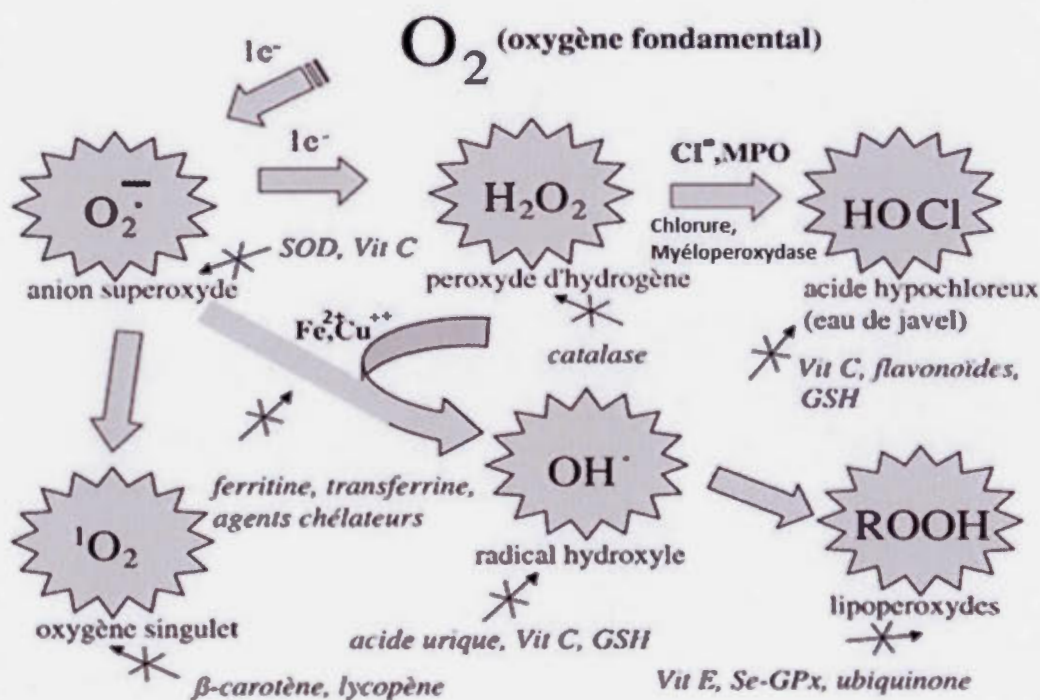


Figure 1.2 Régulation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail *et al.*, 2002).



**Tableau 1.1 Liste des différents antioxydants:** Les antioxydants peuvent être classés en antioxydants endogènes synthétisés par l'organisme et en antioxydants exogènes apportés par l'alimentation. Leurs actions varient selon la nature de l'antioxydant. Certains d'entre eux assurent une protection continue alors que d'autres agissent suite à un stress et assurent par conséquent une détoxification active ou passive (Bettaieb, 2009).

Anti-oxydant	Voie d'apport	Niveau de défense	Action
Transferrine Lactoferrine Hémosidérine Cerruloplasmine	Endogène	Ligne de défense continue	Transport de fer et de cuivre
Coenzyme Q10	Endogène	Ligne de défense continue	Prévention des réactions radicalaires dans les mitochondries
Acide urique	Endogène	Ligne de détoxification passive	Neutralisation des RLO dans les compartiment extra-cellulaires
Melatonine	Endogène	Ligne de détoxification passive	Hormone anti-oxydante
Albumine	Endogène	Ligne de détoxification continue	Neutralisation des RLO Protéines chélatrices de cuivre
Cu SOD Zn SOD Mn SOD	Endogène	Ligne de détoxification active	Neutralisation et transformation des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène
GSH-transférase GSH-sélénium dépendante ou GSH-transférase	Endogène	Ligne de détoxification active	Elimination du peroxyde d'hydrogène et des lipoperoxydes

Anti-oxydant	Vole d'apport	Niveau de défense	Action
Acide phyllique	exogène	Ligne de détoxification passive	Minimiser la concentration des minéraux qui peuvent donner naissance à des RLO
Sulfo...	exogène	Ligne de détoxification passive	Induit des enzymes de détoxification s'opposant à la formation du radical superoxyde
Thioredoxine réductases	endogène	Ligne de détoxification active	Enzyme utilisant le NADPH ou le glutathion pour neutraliser les effets des RLO
Diaphorase	endogène	Ligne de détoxification active	Enzyme qui empêche la réduction monovalente des quinones via l'utilisation de NADH
L'hème oxygénase	endogène	Ligne de détoxification active	Méiateur et antagoniste du monoxyde d'azote

#### 1.4.3.1 Famille des peroxirédoxines

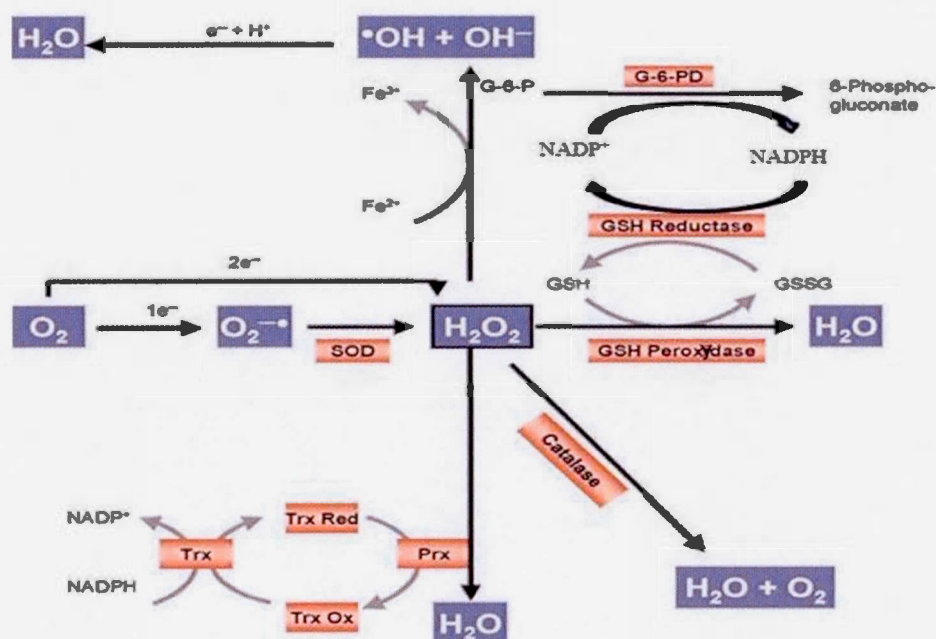
Les peroxirédoxines (Prxs) furent initialement identifiées sur la base de leur capacité à protéger les protéines contre les dommages oxydatifs induits par les EROs en présence de dithiothréitol (DTT). Elle fut appelée protéine de protection ou encore antioxydant thiol-spécifique avant d'être rebaptisée Prx (Rhee *et al.*, 2001). Prx est une famille de peroxydases présente dans tous les organismes et ayant des poids moléculaires qui varient entre 20 et 30 kDa. De nombreuses espèces contiennent plus d'une Prx; les mammifères ont six Prxs différentes. Chaque isoforme est unique. Elles présentent différents profils au cours du développement, sont distribuées différemment dans les organelles et interviennent dans différentes réactions pendant

la catalyse (Rhee *et al.*, 2001). Prx1 et Prx2 sont des protéines cytosoliques, Prx3 est présente dans les mitochondries et Prx4 dans le réticulum endoplasmique et les lysosomes et peut également être sécrétée dans l'espace extracellulaire (Kang *et al.*, 1998). Prx5 est située dans les peroxysomes, les mitochondries et le cytosol et est classée dans le sous-groupe 2-cys atypique. Prx6 est localisée dans le cytosol. Elle est le seul membre de la famille appartenant au sous-groupe 1-Cys peroxirédoxine (Kang *et al.*, 1998). Les Prxs 1-4 ont deux cystéines conservées et appartiennent donc au sous-groupe 2-Cys typique. Elles sont présentes sous forme d'homodimères non covalents disposés dans une formation en tête-à-queue (Poynton et Hampton, 2014). Il a été démontré que chez ces derniers le NH<sub>2</sub>-terminal du groupe Cys-SH est le site primaire de l'oxydation et lorsqu'il est oxydé, il réagit rapidement avec l'autre cystéine conservé dans le terminus COOH pour former une liaison disulfure intramoléculaire (Cox *et al.*, 2009; Verdoucq *et al.*, 1999).

Les Prxs sont une classe de peroxydases thiol qui comme la catalase et le glutathion peroxydase participent à la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau à l'aide du système thiorédoxine (Trx)/thiorédoxine réductase (TrxR) en présence de NADPH (voir figure 1.3). Le mécanisme d'élimination du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les Prxs implique l'oxydation de cette dernière et elle est ensuite réduite par son cofacteur la Trx permettant de la régénérer pour qu'elle puisse se lier à une nouvelle molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Trx2 à son tour est réduit par TrxR par transfert d'électron du NADPH à Trx2 (Cox *et al.*, 2009) (voir figure 1.4). Toutefois, les données récentes sur la réactivité et l'abondance des Prxs ont révélé qu'elle peut être aussi l'un des membres éminents du réseau de défense antioxydant. Aussi le rôle des Prxs comme antioxydants de défense est plus complexe que la suppression des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les Prxs peuvent être facilement inactivées par du peroxyde d'hydrogène. La désactivation de l'activité peroxydase limite ainsi leur capacité à agir en tant qu'antioxydants (Yang *et al.*, 2002).

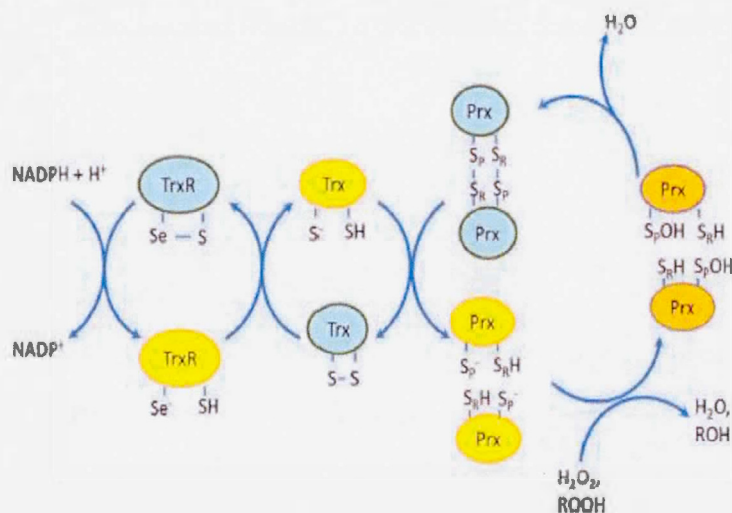


La combinaison des multiples connaissances sur les Prxs conduit à l'hypothèse que les Prxs agissent comme des capteurs redox et elles régulent les voies de transduction des signaux lors de l'oxydation (Fourquet *et al.*, 2008). Les capteurs redox ayant le rôle de détecter des perturbations dans l'homéostasie redox, cela fait des Prxs des entités idéales pour surveiller les signes de stress oxydatif (Poynton et Hampton, 2014). Il a été prouvé que les Prxs pourraient être des cibles potentielles pour la radiothérapie dans le traitement du cancer car elles peuvent être induites par rayonnement et donc leurs statuts d'expressions pourraient déterminer la radiosensibilité des cellules cancéreuses (Zhang *et al.*, 2009).



**Figure 1.3 Élimination du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** L'anion superoxyde réagit avec elle-même pour former du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de l'oxygène par une réaction spontanée et par une réaction enzymatique de dismutation. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réduit en eau (H<sub>2</sub>O) par la peroxirédoxine, le glutathion peroxydase, ou la catalase. Adapté de (Lubos *et al.*, 2008).



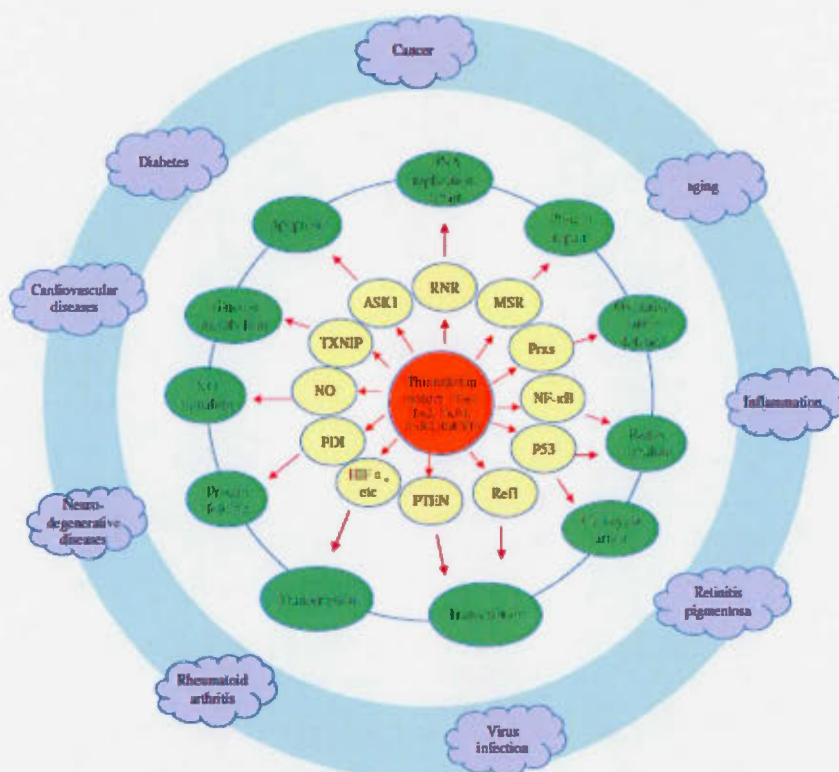


**Figure 1.4 Réaction redox d'élimination des EROs catalysée par le système Trx.** La source d'électron du système est le NADPH qui provient de la voie des pentoses phosphate. Le Trx oxydé (Trx-S<sub>2</sub>) est réduit par le NADPH et l'enzyme TrxR. Le Trx réduit (Trx-SH<sub>2</sub>) par la suite va catalyser la réduction du disulfure de Prx oxydé (Prx-S<sub>2</sub>) en Prx réduit (Prx-SH<sub>2</sub>) permettant la régénération de ce dernier afin qu'il attaque une nouvelle molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou ROOH. Adapté de Lu et Holmgren 2010.

#### 1.4.3.2 Famille des thiorédoxines

Les thiorédoxines (Trxs) sont des petites réductases de 12 kDa qui catalysent le changement des protéines disulfure/dithiol avec un site actif en motif CGPC conservé. Il existe différentes formes de Trx : Trx1 qui est une enzyme cytosolique et extracellulaire et Trx2 qui est situé dans les mitochondries (Lillig et Holmgren, 2007). TrxR est un sélénoenzyme avec trois isoformes : TrxR1 dans le cytosol, TrxR2 dans les mitochondries et TrxR3 ou TGR (Trx GSH réductase) présents principalement dans les testicules (Holmgren et Lu, 2010). Trx et TrxR interviennent dans plusieurs voies de signalisation. Ce sont des acteurs étroitement liés à de nombreuses maladies (voir figure 1.5). Les taux plasmatiques de Trx1 et de TrxR1

ont été utilisés comme un marqueur de l'inflammation dans le cas du cancer et de l'infection par le VIH (Holmgren et Lu, 2010).



**Figure 1.5** Système Trx de mammifères, un acteur central étroitement lié à de nombreuses maladies humaines. Il joue un rôle essentiel dans les mécanismes biochimiques. L'expression des protéines du système Trx est modifiée dans de nombreuses maladies à l'instar du cancer, du diabète, des maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives. Dans des conditions de vieillissement, d'inflammation et infections virales les niveaux de Trx sont également modifiés. Trx1 réduit la ribonucléotide réductase (RNR), qui est essentielle pour la synthèse de l'ADN. Trx fournit des électrons à la méthionine sulfoxyde réductase (MSR) et aux peroxyredoxines (Prxs) pour réparer respectivement des résidus méthionine sulfoxyde dans les protéines ou pour protéger contre le stress oxydatif via l'élimination du peroxyde d'hydrogène et le peroxy-nitrite. Le système Trx intervient dans la signalisation redox cellulaire en contrôlant l'activité de plusieurs facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, p53, Ref-1, HIF $\alpha$ , PTEN, AP-1, et un récepteur de glucocorticoïdes. Trx-(SH<sub>2</sub>) peut se lier, inactiver l'ASK1 et régule ASK1 apoptose dépendante. Trx interagissant avec TXNIP (« thioredoxin interacting protein»), qui se lie à Trx-(SH<sub>2</sub>) et régule l'activité Trx. TrxR peut réduire une protéine disulfure

isomérase (PDI) un acteur critique pour la formation de liaisons disulfure. Trx-(SH<sub>2</sub>) affecte l'activité de certaines protéines clés telles que les caspases par contrôle de la protéine S-nitrosylation et dénitrosylation. Adapté de Holmgren et al 2010.

La Trx combinée avec la TrxR et le NADPH forme le système Trx. Il a été découvert par Peter et ses collaborateurs en 1964 comme étant un donneur d'hydrogène pour la synthèse de la cytidine désoxyribonucleoside diphosphate par la ribonucléoside réductase (RNR) d'*E. coli* (Laurent *et al.*, 1964). Ils ont plusieurs rôles dans la synthèse de l'ADN, la défense contre le stress oxydatif et l'apoptose. La description la plus générale du système Trx est son rôle en tant que protéine disulfure réductase. L'enzyme fonctionne en prenant des électrons de NADPH via TrxR. Ceux-ci sont transférés dans le site actif de la Trx, qui est en générale disulfure-réductase. Le TrxR des mammifères se compose de deux sous-unités dans un arrangement tête à queue avec un grand nombre de formes d'épissage (Arner, 2009). Les électrons provenant du NADPH permettent de réduire le disulfure et le transfert au C-terminal du site actif du sélénothiol (Sec) lui-même localisé dans la séquence qui est conservée dans toutes les isoformes de TrxR. De là, les électrons se déplacent au Trx, ce qui réduit les protéines thiols comme la Prx ou d'autres substrats (Holmgren et Lu, 2010). Ce système Trx/TrxR est responsable de la réduction de la 2-Cys Prx tant que Trx et TrxR sont présents à des concentrations inférieures dans les cellules que les Prxs. Des études *in vitro* indiquent que la réduction du disulfure est l'étape limitant la vitesse dans le cycle catalytique du Prx (Parsonage *et al.*, 2005; Thannickal et Fanburg, 2000).

#### 1.4.3.3 Voie des pentoses phosphates

L'histoire du rôle métabolique de la voie des pentoses phosphates (VPP) a commencé en 1926, lorsque l'introduction de nouveaux médicaments antipaludiques, comme la

primaquine, a conduit à la première description médicale des médicaments induisant l'anémie hémolytique en corrélation avec un manque de GSH (Beutler *et al.*, 1985; Riganti *et al.*, 2012). La VPP est branchée avec la glycolyse dans la première étape du métabolisme du glucose. Elle comprend deux phases ou branches: la branche oxydative et la branche non oxydative. La branche non oxydante comprend une série de réactions réversibles qui recrutent des intermédiaires de la glycolyse supplémentaires, tels que le fructose 6-phosphate (F6P) et le glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P), qui peuvent être convertis en phosphates pentose et vice versa. La branche oxydative génère le NADPH et les ribonucléotides (Horecker, 2002) (voir figure 1.6).

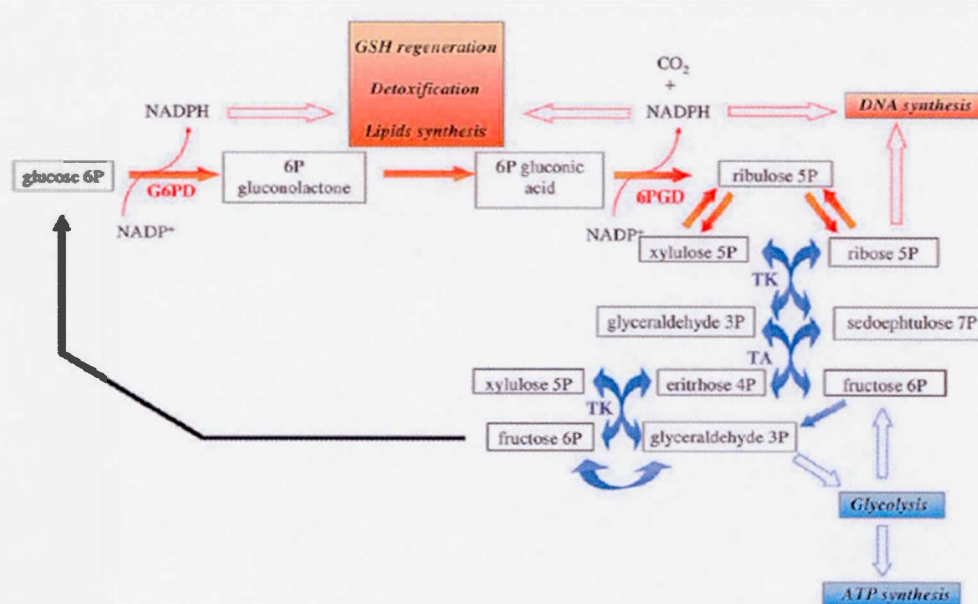
La VPP est particulièrement critique pour les cellules cancéreuses parce qu'elle génère non seulement les pentoses phosphates pour compenser leur taux élevé de synthèse d'acide nucléique, mais produit également le NADPH qui est nécessaire à la fois pour la synthèse des acides gras et la survie des cellules dans des conditions de stress. Ce dernier est consommé au cours de la synthèse des acides gras et est nécessaire pour piéger des EROs. Par conséquent, la VPP joue un rôle essentiel en aidant les cellules cancéreuses à métaboliser le glucose pour répondre à leurs exigences anaboliques et de lutter contre le stress oxydatif (Patra et Hay, 2014).

Le glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est l'enzyme critique dans la voie des pentoses phosphates. Il existe soit sous forme de monomère inactif ou de dimère actif. Un complexe d'ordre supérieur (un tétramère) a également été rapporté (Horecker, 2002). Il catalyse l'étape limitant la vitesse dans la branche oxydative de la VPP qui génère la première molécule de NADPH (voir figure 1.6). Par conséquent, son expression et son activité sont strictement réglementées. Des niveaux relativement élevés de cette enzyme sont présents dans de nombreux tissus à métabolismes normaux, tels que le foie, les tissus adipeux, et les glandes surrénales et mammaires (Hilf *et al.*, 1975; Rudack *et al.*, 1971). Les cellules cancéreuses



expriment également des niveaux relativement élevés de cette enzyme (Patra et Hay, 2014). Son activité est étroitement liée avec le rapport  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  dans la cellule. Le NADPH régule négativement l'activité de la G6PD, alors que le  $\text{NADP}^+$  est nécessaire pour son activité enzymatique et sa conformation correcte (Horecker, 2002; Patra et Hay, 2014). Les espèces réactives de l'oxygène sont capables d'induire la modification des macromolécules biologiquement fondamentales, y compris l'oxydation du GSH et des protéines du groupe SH. Une étude a montré que l'ajout de la diamine un oxydant potentiel des groupes thiols dans les cellules souches embryonnaires de souris où le G6PD a été supprimé, diminue le taux de NADPH pour maintenir la forme réduite de GSH. Cela conduit les cellules à une mort par apoptose. Il apparaît ainsi que G6PD joue un rôle essentiel lorsque la cellule doit répondre rapidement à une attaque exogène du stress oxydatif, en reconstituant le réservoir intracellulaire de GSH (Filosa *et al.*, 2003).

Vu son importance dans le bon fonctionnement de la cellule, la VPP peut être une cible intéressante pour le traitement du cancer (Riganti *et al.*, 2012). On sait que l'augmentation de son activité dans les cellules cancéreuses permet de produire des quantités importantes de NADPH pour diminuer la quantité des EROs. Cela génère simultanément des niveaux élevés de nucléotides pour la synthèse et de réparation de l'ADN. Ces activités de la VPP peuvent provoquer une résistance à certains traitements contre le cancer qui accroissent le stress oxydatif et les dommages de l'ADN. Entre autres la radiothérapie et chimiothérapie (Sharma *et al.*, 2010) qui provoquent des niveaux élevés des EROs et déclenchent une réponse adaptative en augmentant l'activité de la VPP. De nombreuses études sur les changements qualitatifs et quantitatifs des cellules tumorales, montrent que la VPP augmente la prolifération cellulaire et la progression tumorale, protège les cellules tumorales contre l'apoptose et compromet les thérapies anticancéreuses classiques, telles que la chimiothérapie et la radiothérapie (Riganti *et al.*, 2012).



**Figure 1.6 Représentation schématique de la branche oxydative et celle non oxydative de la VPP.** Dans la branche oxydative de la VPP (flèches rouges), le glucose 6-phosphate est oxydé et décarboxylé en ribulose 5-phosphate. Ce dernier est ensuite isomérisé en ribose 5-phosphate une composante essentielle des nucléotides. Deux molécules de NADPH par mole de glucose 6-phosphate entrant dans la VPP sont aussi produites et fournissent des équivalents réducteurs pour la régénération du GSH via le glutathion réductase, la synthèse des acides gras et des stérols, la détoxification des xénobiotiques et la synthèse de l'ADN. Dans la branche non oxydative (flèches bleues), les pentoses phosphates subissent un échange de deux carbones et trois carbones dans des réactions réversibles, pour donner finalement du fructose 6-phosphate et du glycéraldéhyde 3-phosphate, qui peut entrer dans la voie de la glycolyse, et être reconvertis en glucose 6-phosphate ou encore oxydé en réponse aux demandes de la cellule en ATP, en pentoses phosphates, en G6PD, en 6-phosphogluconate déshydrogénase, en GSH, trans-cétolase et en trans-aldolase (Riganti *et al.*, 2012).

## 1.5 Apoptose

### 1.5.1 Introduction

La mort cellulaire programmée fut clairement identifiée pour la première fois par John Kerr en 1972 même si elle a été observée bien plutôt par Fleming en 1885. Il nomma ce phénomène apoptose en référence à la chute des feuilles à l'automne. En effet ce nom découle des mots grecs *apo* qui signifie éloignement et *ptose* qui signifie chute (Kerr *et al.*, 1972). De 1976 à 1981, trois groupes de chercheurs examinent par électrophorèse la chromatine des tissus irradiés et constatent qu'elle se fragmente en produits ayant un modèle de type échelle suggérant que les fragments sont de multiples nucléosomes. Puis en 1984, Wyllie et ses collaborateurs ont lié ce modèle typique en échelle au phénomène de l'apoptose (Majno et Joris, 1995).

L'apoptose (suppression cellulaire ordonnée) est un mécanisme génétiquement contrôlé, un mode ubiquitaire de mort cellulaire qui joue un rôle opposé à celui de la mitose dans la régulation des populations cellulaires animales (Giansanti *et al.*, 2011; Haddad, 2004). Elle intervient dans les processus tels que le développement embryonnaire et fœtal, l'élaboration du système immunitaire et dans l'homéostasie des tissus hormono-dépendants permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire.

La mort cellulaire est le plus souvent conduite par trois mécanismes principaux que sont l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie. De façon brève, l'identification d'une cellule apoptotique repose sur des critères morphologiques stéréotypés dominé par le rétrécissement de la cellule, la condensation de la chromatine nucléaire, la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques et leurs phagocytoses par les cellules voisines (Kerr *et al.*, 1972). L'autophagie est un processus subcellulaire qui digère les organelles endommagées ou en surplus (Yang *et al.*, 2010). Le résultat de la nécrose quant à elle est le gonflement et éclatement de la cellule à cause du bris de

la membrane. Elle n'entraîne pas de floculation de la chromatine et de gonflement de la mitochondrie. De même la nécrose peut se produire s'il y a une inhibition pharmacologique ou une ablation génétique de la voie apoptotique suggérant que la nécrose est induite comme une voie alternative permettant d'assurer la mort cellulaire lorsque l'apoptose a échoué (Wu *et al.*, 2010).

### 1.5.2 Voies apoptotiques

Il existe différentes voies de signalisations pouvant aboutir à l'apoptose (voir revue : Pallepati et Averill-Bates, 2012). Entre autres, il y a la voie intrinsèque qui met en jeu la mitochondrie et occupe une place importante et centrale dans le phénomène de l'apoptose, la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort initiée à la surface des cellules par les récepteurs membranaires et la dernière voie est celle du réticulum endoplasmique (RE) (Giansanti *et al.*, 2011).

#### 1.5.2.1 Voie des récepteurs de mort

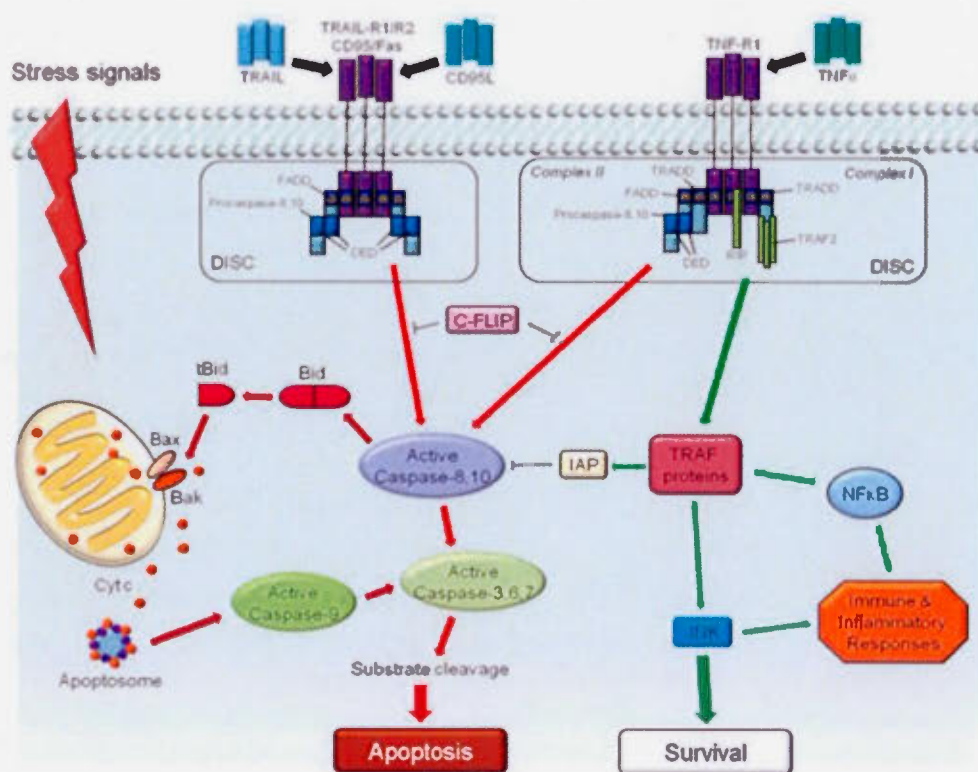
La voie extrinsèque de mort par apoptose implique des récepteurs de la membrane plasmique tels que le facteur de nécrose tumoral TNFR1 (p55/CD120a), Fas (APO1/CD95), p75NGFR (facteur de croissance nerveux), les deux récepteurs de TRAIL, DR4 (TRAIL-R1/APO-2) et DR5 (TRAIL-R2/KILLER/TRICK2), et les récepteurs DR3 et DR6 (Pallepati et Averill-Bates, 2012). Ces molécules possèdent, dans leur portion intracytoplasmique C-terminale, une région conservée appelé domaine de mort (DD) et formant six hélices alpha. Leur portion extracellulaire est composée d'un nombre variable de domaines riches en cystéine, et leurs ligands sont des molécules trans-membranaires ayant une forme soluble issue d'un épissage alternatif ou du clivage de la portion extracytoplasmique C-terminale par une protéase



(Russo *et al.*, 2010). Un domaine extracellulaire appelé PLAD («pre ligand-binding assembly domain») est utile pour l'interaction du ligand et de son récepteur et cela nécessite bien évidemment la trimérisation de chacun d'entre eux.

La signalisation de l'apoptose par Fas et TNFR1 requiert la participation du domaine de mort (DD) dans la portion cytoplasmique de chacun des récepteurs. Ce dernier recrute les protéines cytosoliques présentes dans le domaine homologue. Par exemple, les récepteurs Fas ou TNF- $\alpha$  oligomérisés recrutent et interagissent avec les protéines adaptatrices FADD («Fas Associated Death Domain») ou TRADD («Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-Associated Death Domain protein») qui vont se lier à eux via leurs propres DD. Une fois la trimérisation du récepteur Fas avec son ligand réalisée c'est la protéine cytoplasmique FADD possédant un motif amino-terminal appelé domaine effecteur de mort (DED) qui va recruter la procaspase 8 par sa prédominance sur ce dernier. Mais par contre, si le signal provient de TNFR1, alors c'est la molécule adaptatrice TRADD qui intervient (voir figure 1.7). Donc le signal activant la mort peut être transmis de la membrane plasmique à la caspase 8 par FADD ou par TRADD. Ainsi se forme le complexe DISC («Death Inducing Signaling Complex») au sein duquel le rapprochement des procaspases 8 conduit à leur activation (Baatout *et al.*, 2002). En fonction du type cellulaire on peut aussi avoir un recrutement de la procaspase 10 au lieu de la caspase 8.

Une importante activation des caspases 8 entraîne une activation directe des caspases effectrices 3, 6 et 7. Il en résulte un clivage de leurs substrats spécifiques tels que l'enzyme nucléaire PARP (poly-ADP-ribose-polymérase) et de l'inhibiteur des endonucléases ICAD («Caspase-activated DNase») menant à l'apoptose. Une faible activation des caspases 8 entraîne l'activation des caspases 3 par l'intermédiaire d'une boucle d'amplification faisant intervenir la mitochondrie (voir figure 1.7).



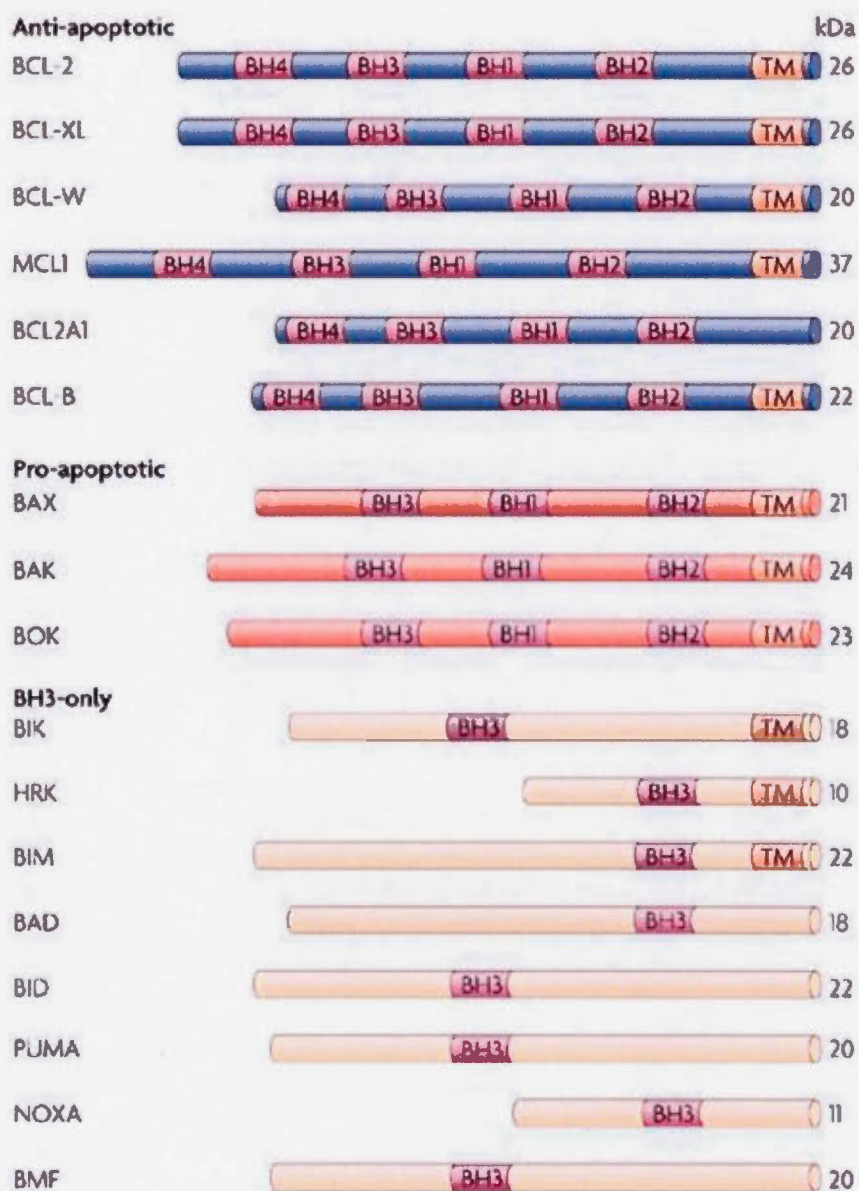
**Figure 1.7 Voie des récepteurs de mort :** Le recrutement des molécules adaptatrices cytoplasmiques (TRADD, FADD) est induit grâce à la trimérisation de TNF, des ligands Fas et TRAIL avec leurs récepteurs respectifs (TNFR1, Fas ou DR4 ou DR5). Ces molécules adaptatrices vont ensuite recruter les procaspases 8 et 10, deux molécules homodimères qui s'assemblent pour former la caspase mature. Cette dernière va se cliver et activer d'autres caspases telles que les caspases 3,6 et 7 qui vont cliver leurs substrats clés, orchestrant la mort par apoptose de la cellule (Pallepati et Averill-Bates, 2012).

### 1.5.2.2 Voie mitochondriale

La mitochondrie a une place considérable dans la description de la mort programmée et de ses mécanismes de régulation. Elle semble en effet impliquée dans la phase de contrôle et la phase effectrice de l'apoptose. Ainsi, en participant à l'activation des caspases comme à la libération dans le cytosol de facteurs « apoptogéniques »

indépendants des caspases tels que l'endonuclease EndoG et AIF («Apoptosis Inducing Factor»), la mitochondrie apparaît comme un acteur clé des processus apoptotiques (Circu et Aw, 2010; Ségal-Bendirdjian *et al.*, 2005).

La voie de la mort cellulaire intrinsèque est déclenchée par des signaux de morts cellulaires tels que les dommages à l'ADN, la privation en nutriments, des facteurs de croissances et le stress oxydatif (Wei *et al.*, 2001). Elle est étroitement règlementée par les protéines de la famille Bcl-2. Le membre fondateur de cette famille de protéines est le produit du proto-oncogène Bcl-2, identifié au point de cassure t(14; 18) dans un lymphome folliculaire humain B (Ségal-Bendirdjian *et al.*, 2005). La famille de protéines Bcl-2 est constituée de plus de 20 membres qui sont classés selon leurs domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1 à 4) dans la région de l'hélice alpha et selon leurs fonctions dans les processus apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 se situent principalement dans le cytoplasme et peuvent s'insérer dans la membrane mitochondriale externe (OMM) si nécessaire. Elles regroupent les protéines à domaine multiples BH1 à 3 (Bax, Bak, Bok) et les protéines à un seul domaine BH3 telles que Bad, Bik, Bim et d'autres (voir figure 1.8). Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-W, Bcl-xL et Bcl-2) se trouvent dans l'OMM et inhibent l'apoptose. Elles empêchent l'ouverture de VDAC («Voltage Dependant Anion Channel») et donc la libération du cytochrome c en se liant avec les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 ou par inhibition de l'assemblage supramoléculaire formé par les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Kannan et Jain, 2000). Ces protéines pro et anti-apoptotiques peuvent former des hétérodimères ainsi que des homo- et des oligomères en se liant à leurs domaines BH. Il a été démontré par Korsmeyer et ses collègues que tBid peut oligomériser Bax et Bak et ainsi former un complexe capable de libérer le cytochrome c dans le cytoplasme et induire l'apoptose (Wei *et al.*, 2001).

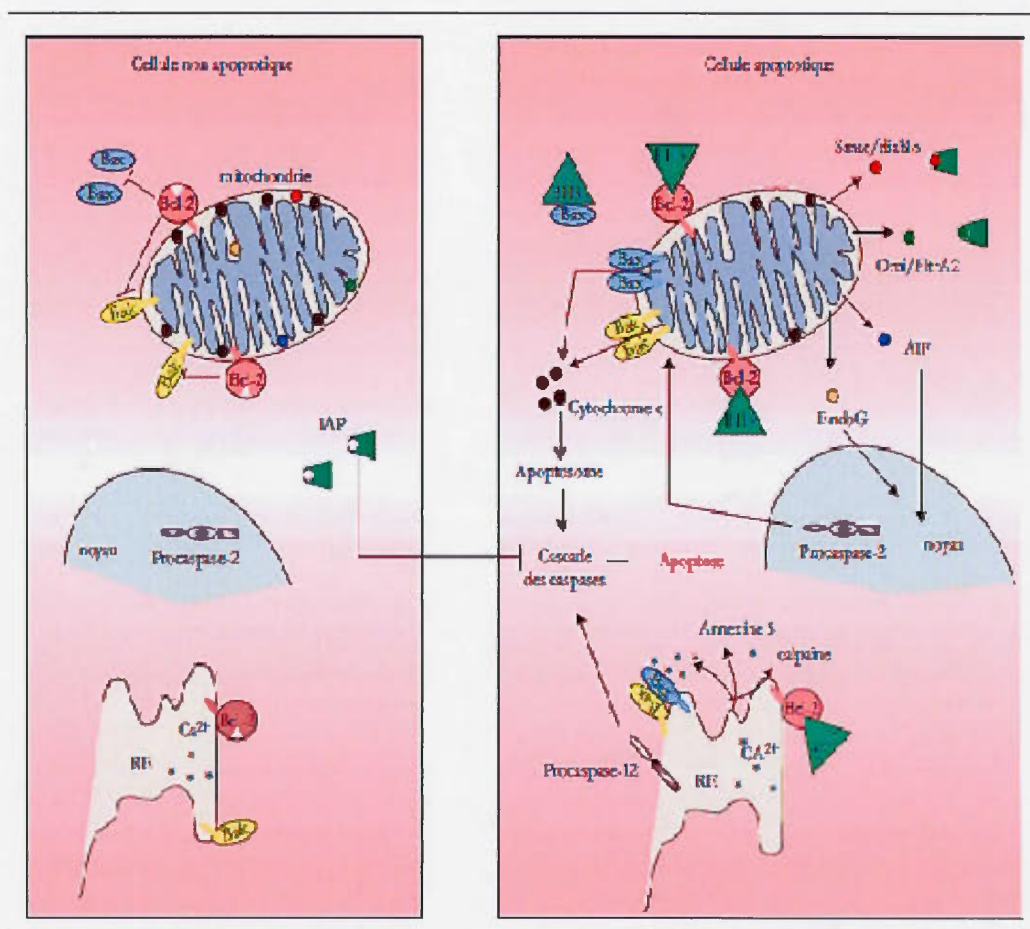


**Figure 1.8** Représentation des domaines structuraux des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Il y a les domaines conservé BH (1 à 4) chez la majorité des protéines. Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux groupes. Ceux possédant les domaines BH1, BH2 et BH3 et ceux ayant un seul domaine BH3. Certains possèdent un domaine transmembranaire (TM) à leurs extrémité C-terminal leur permettant de s'insérer dans les membranes (Taylor *et al.*, 2008).

La principale voie de libération du cytochrome c dans la mitochondrie est le pore de perméabilité transitoire mitochondriale (PTP). C'est un complexe multimérique composé du VDAC, d'une cyclophiline D, d'un récepteur périphérique des benzodiazépines et de la translocase de nucléotides adényliques (ANT). L'analyse des mitochondries de cellules engagées en apoptose met en évidence une diminution de leur potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ), caractérisée par un gonflement de la mitochondrie et expliquée par l'ouverture de mégapores, dits PTP (Mercié et Belloc, 2001). L'ouverture de ces pores semble finement réglée par Bcl-2 et ses partenaires (Susin *et al.*, 1997). Les protéines pro-apoptotiques (Bax et Bid) quant à elles peuvent induire l'ouverture du PTP en interagissant directement avec VDAC. De même, ils peuvent induire la mobilisation du calcium à partir du RE et entraîner un déclenchement de l'ouverture du PTP dont on rappelle l'ancrage dans la membrane externe des mitochondries, et la capacité de se comporter comme des canaux ioniques. Le PTP s'associe à la matrice mitochondriale et permet la libération des stocks de cytochrome c situé dans l'espace interstitiel (Voir figure 1.9).

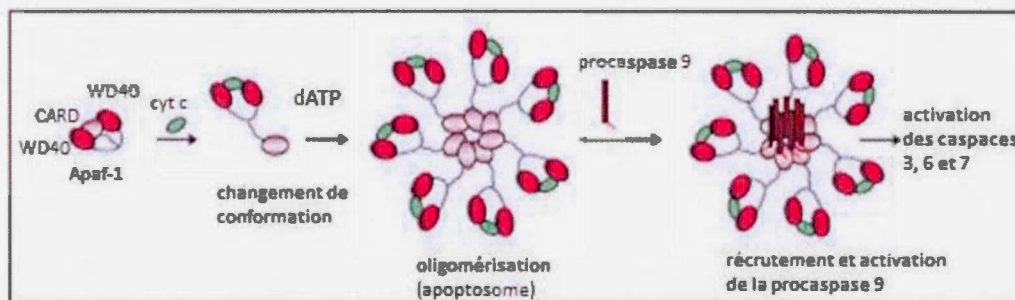
L'ouverture de pores PTP serait responsable de la libération dans le cytoplasme de facteurs qui vont déclencher l'activation des caspases ou leur clivage protéolytique. La protéase AIF « apoptosis-inducing factor » semble capable à elle seule d'induire la protéolyse et la fragmentation nucléaire caractéristique de l'apoptose (Golstein, 1997; Susin *et al.*, 1997). Dans le cytosol, le cytochrome c va s'associer au facteur de protéase apoptotique-1 (Apaf-1). Ce dernier va s'agrèger avec d'autres molécules d'Apaf-1, et cet ensemble va se lier finalement à la procaspase 9 pour former l'apoptosome (voir figure 1.10). Apaf-1 fixe aussi de l'ATP et du dATP, nécessaires à l'activation efficace de la caspase 9. On assistera ensuite à la transactivation des procaspases 9 complexées, en caspases 9 actives qui vont cliver et donc activer d'autres caspases en aval. S'ensuivra alors le clivage de substrats clés tels que PARP, ICAD, lamin B entraînant la mort par apoptose.





**Figure 1.9 Régulation de l'apoptose par les protéines Bcl-2.** Dans les cellules non apoptotiques, les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax, Bak) sont inhibés par les membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL). En réponse à un stimulus apoptotique, les protéines « BH3-seulement » sont activées (par régulation transcriptionnelle, relocalisation subcellulaire, déphosphorylation ou protéolyse). Elles peuvent alors soit inhiber l'action anti-apoptotique de Bcl-2, soit directement induire un changement de conformation des protéines Bax et Bak conduisant à leur oligomérisation et à leur insertion dans la membrane mitochondriale où elles vont former des pores permettant la libération des facteurs pro-apoptotiques dont le cytochrome c. Celui-ci contribue à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la cascade des caspases. Smac/Diablo et Omi/HtrA2 inhibent les IAP («Inhibitor of apoptosis») dans le cytosol, tandis que l'AIF («apoptosis inducing factor») et

l'endonucléase G (EndoG) entrent dans le noyau participant à la dégradation de l'ADN. La caspase 12 peut être activée après relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE. Par ailleurs, les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , l'annexine 5 et la calpaïne-1 peuvent relayer des signaux du RE à la mitochondrie (Ségal-Bendirdjian *et al.*, 2005).



**Figure 1.10 Apoptosome.** Au cours de l'apoptose, le cytochrome c (cyt c) relargué de la mitochondrie va se fixer sur la région carboxy-terminale d'Apaf1, riche en répétitions WD40. Cette fixation induit un changement de conformation de cette protéine qui, en présence de l'ATP, va s'oligomériser en une structure heptamérique (« en roue »), l'apoptosome. Cette structure va recruter et activer la procaspase 9. Celle-ci, à son tour, active la cascade des caspases dont les caspases 7 et 3 (Ségal-Bendirdjian *et al.*, 2005).

### 1.5.2.3 Voie du réticulum endoplasmique

Les protéines de conformation anormale constituent un grave danger pour les cellules vivantes. Le RE représente le siège de la synthèse et de maturation de la majorité des protéines membranaires et sécrétées. Au cours de leurs synthèses, ces protéines pénètrent dans la lumière du RE où elles sont repliées et assemblées en complexes multiprotéiques avant d'être transportées. Malgré tous les processus mis en jeu par le RE pour que le repliement des protéines soit une réussite, il y a toujours des protéines de conformations incorrectes qui sont produites. Celles-ci peuvent être prises en charge par les chaperonnes pour corriger leur conformation ou alors être transloquées

par l'ERAD («endoplasmique reticulum-associated degradation») et dégradées dans le cytoplasme par le protéasome. Parfois la quantité de protéines anormales est fortement élevée et cela met le RE dans un état de stress induisant ainsi la réponse UPR («unfolded protein response») ou encore réponse aux protéines mal repliées (Pallepati et Averill-Bates, 2012).

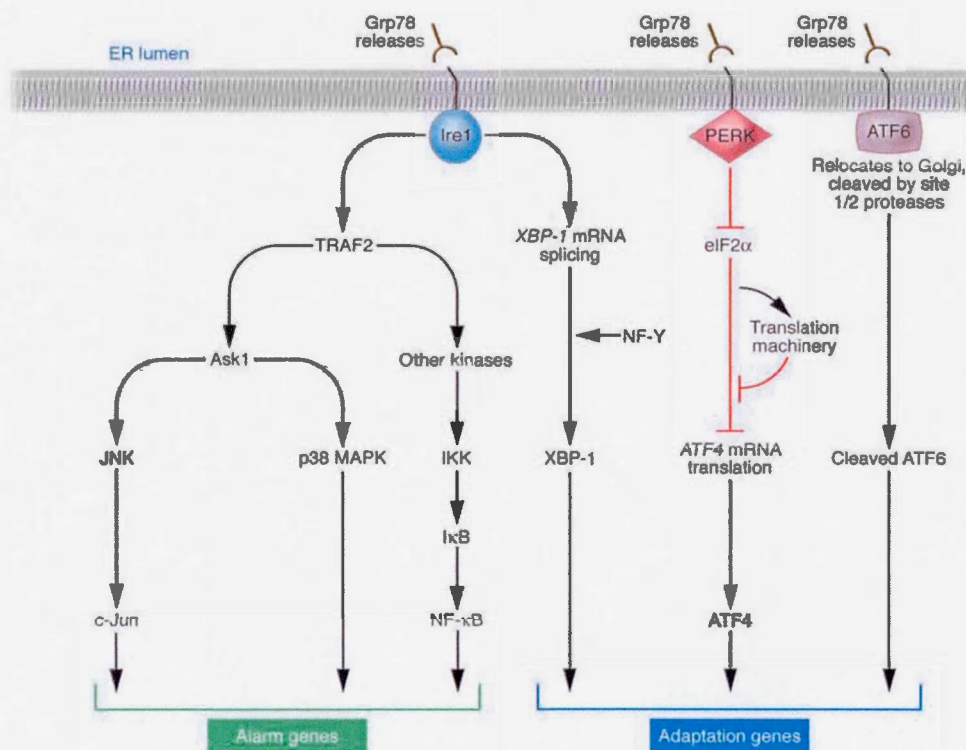
La réponse UPR peut soit augmenter les capacités cellulaires de repliement des protéines ou déclencher le processus d'apoptose en cas de stress intense ou de longue durée. Elle possède plusieurs composantes, la première consiste à activer la transcription des gènes codant pour les chaperonnes résidants dans le RE, des protéines de la voie de sécrétion et les protéines du système ERAD. Ceci permet de rendre la voie sécrétrice plus performante et amplifie l'activité de repliement des protéines. La seconde consiste à inhiber la traduction des ARNm ce qui réduit le flux de nouvelles protéines dans le RE pour éviter la surcharge de l'organite (Garlatti et Barouki, 2002).

La réponse transcriptionnelle à un stress du RE met en jeu trois voies de signalisations qui impliquent les protéines transmembranaires Ire1 («endonuclease inositol requis 1»), ATF6 («activating transcription factor») et PERK («PKR-like Kinase») (Schröder et Kaufman, 2005; Shen *et al.*, 2004). Ire1 est maintenu dans sa forme inactive par la chaperonne GRP 78/Bip en absence de protéines mal repliées. Ainsi, lorsque des protéines mal repliées sont formées dans le RE elles sont reconnues par la chaperonne GRP78/Bip qui se dissocie de Ire1 permettant à ce dernier de s'activer par un processus d'oligomérisation et d'autophosphorylation en trans. Les Ire1 grâce à leurs activités endoribonucléasiques, clivent l'ARNm de XBP-1 non épissé dont la transcription du gène est activée par les facteurs de transcription p50ATF-6 $\alpha$  et  $\beta$  provenant du clivage protéolytique de l'ATF6. Cela mène à l'activation des gènes cibles de l'UPR (chaperonnes et enzymes de dégradation ERAD) (Garlatti et Barouki, 2002).



Un autre mécanisme d'activation des protéines peut être déclenché par la libération de la Grp78 de l'extrémité N-terminal de l'ATF6. En effet, au lieu d'être oligomérisé, ATF6 va être libéré de la Grp78. Il sera ensuite transloqué dans l'appareil de Golgi où des protéases vont le prendre en charge pour le cliver à un site près de la membrane. Ce facteur de transcription libéré dans le cytosol va migrer vers le noyau pour réguler l'expression des gènes (voir figure 1.11) (Ye *et al.*, 2000).

L'inhibition de la traduction se fait par l'intermédiaire de PERK. Il a une homologie structurale avec les protéines Ire1 $\alpha$  et  $\beta$  et le mécanisme d'activation de son activité kinase est semblable à celui de Ire1 de mammifère (Harding *et al.*, 1999). Pendant le stress du RE, PERK est libéré du chaperon Bip et elle s'oligomérisse et s'autophosphoryle en trans. PERK ainsi activé entraîne la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  bloquant la formation du complexe de pré-initiation de la traduction aboutissant à une inhibition de la synthèse des protéines (figure 1.11) (Xu *et al.*, 2005).



**Figure 1.11 Événements de transductions des signaux associés au stress du RE.** La chaperone Grp78 lie les extrémités N-terminales de Ire1, PERK et ATF6, empêchant leur activation. La présence des protéines mal repliées dans le RE entraîne la libération de Ire1, PERK et ATF6 par la Grp78. Suite à cette libération Ire1 et PERK s'oligomérisent dans les membranes du RE. IRE1 oligomérisé se lie à TRAF2, ensuite en aval la signalisation des kinases activent NF- $\kappa$ B et c-Jun (AP-1), ce qui provoque l'expression de gènes associés à la défense de l'hôte (alarme). L'activité de ribonucléase intrinsèque de Ire1 conduit également à la production de XBP-1, un facteur de transcription qui induit l'expression de gènes impliqués dans la restauration, le repliement des protéines ou la dégradation des protéines dépliées. L'oligomérisation de PERK active son activité kinase intrinsèque, ce qui entraîne la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  et la suppression de la traduction de l'ARNm. Dans ces conditions, seuls les ARNm sélectionnés, y compris ATF4, sont traduits. ATF4 induit l'expression de gènes impliqués dans le rétablissement de l'homéostasie du RE. La libération de Grp78 de ATF6 permet à celle-ci de transloquer dans l'appareil de Golgi par un processus protéolytique pour libérer ATF6 actif, qui contrôle l'expression des gènes UPR (Xu *et al.*, 2005).

Un stress plus agressif causé par des agents toxiques ou métaboliques est susceptible de déclencher l'apoptose par le RE qui se traduit par une induction de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription CHOP («C/EBP homologous protein-10») connu aussi sur le nom de GADD153. Il appartient à la famille des facteurs de transcription «CCAAT/enhancer binding proteins» (C/EBP), et son expression est généralement régulée par la chaperonne Bip.

## 1.6 Présentation du projet

### 1.6.1 Introduction

Le traitement du cancer par chimiothérapie en clinique est limité car un grand nombre de tumeurs acquièrent une résistance à plusieurs médicaments différents (phénomène de résistance aux médicaments), raison pour laquelle il est nécessaire de continuer à développer des traitements alternatifs. C'est dans cette perspective que notre laboratoire étudie l'effet de l'hyperthermie sur les cellules cancéreuses (Bettaieb *et al.*, 2013). En effet, l'hyperthermie localisée (40-45°C) est d'un grand intérêt dans le traitement du cancer chez l'humain. Du fait des progrès dans le domaine des technologies ultrasons et ondes ultracourtes, on peut actuellement chauffer localement des tissus cancéreux. L'hyperthermie est utilisée en clinique en combinaison avec la radiothérapie et/ou la chimiothérapie afin d'améliorer leurs effets cytotoxiques envers les tumeurs et de rendre ces traitements plus ciblés vers la tumeur. L'utilisation combinée peut augmenter l'indice thérapeutique; l'apport localisé de chaleur pourrait augmenter la cytotoxicité du médicament dans la tumeur et en même temps diminuer les effets secondaires toxiques sur les tissus normaux. Des essais cliniques en Europe, au Japon et aux États-Unis ont démontré des progrès

prometteurs chez des patients atteints de tumeurs de la vessie, du col utérin, de la tête et du cou, du rectum, du sein, du poumon, du cerveau, et pour certains sarcomes et mélanomes (Palazzi *et al.*, 2010; Twombly, 2010).

### 1.6.2 Hypothèse

L'hyperthermie létale (42-43 °C) et l'hyperthermie douce (40 °C) augmente la production des EROs, qui pourrait causer des changements dans les niveaux d'expression des antioxydants et des molécules impliqués dans le métabolisme du glucose à l'intérieur des cellules cancéreuses.

### 1.6.3 Objectifs du projet

Quelques travaux antérieurs dans notre laboratoire ont permis de démontrer que l'hyperthermie (42-45 °C) cause la mort des cellules par apoptose qu'elles soient sensibles ou résistantes à la chimiothérapie (MDR) et pourrait être utile pour l'élimination des cellules résistantes aux traitements conventionnels (Wrzal *et al.*, 2008). L'hyperthermie augmente la génération des EROs (Pallepati et Averill-Bates, 2010), et induit l'apoptose par les voies des mitochondries (Bettaieb et Averill-Bates, 2005) et des récepteurs de mort (Bettaieb et Averill-Bates, 2008) dans les cellules HeLa. La catalase, une enzyme antioxydante, empêche l'activation du récepteur de mort Fas et l'activation de la caspase-8 en réponse à une hyperthermie létale (42-45°C). De plus, une tolérance thermique douce induite à 40 °C (température de fièvre) protège les cellules HeLa contre l'apoptose induite par la chaleur létale à 42-45 °C (Bettaieb et Averill-Bates, 2008). La tolérance thermique modérée atténue l'induction des EROs et du ligand de mort FasL, qui constitue les événements d'initiation de l'activation de l'apoptose par les récepteurs de mort cellulaire induite

par l'hyperthermie (42-45 °C). Des événements liés à l'apoptose et situés en aval tels que l'activation de la caspase 3, le clivage de PARP, ainsi que la condensation de la chromatine nucléaire, sont également diminués chez les cellules tolérantes à la chaleur.

#### 1.6.3.1 Objectif général

Dans le souci de continuer à apporter plus de lumière pour une utilisation plus efficace de l'hyperthermie, l'objectif général du projet est de comprendre les mécanismes impliqués dans la toxicité de l'hyperthermie chez les cellules cancéreuses et l'effet protectrice de la thermotolérance.

#### 1.6.3.2 Les objectifs spécifiques

1. Déterminer si la réponse de stress cellulaire induite par l'hyperthermie douce (40°C) et létale (42-43°C) inclut l'induction d'antioxydants tels que les peroxyrédoxines et le glutathion.

2. Déterminer le rôle des EROs dans l'induction des antioxydants par l'hyperthermie.

3. Évaluer si l'hyperthermie modifie le métabolisme du glucose et son transport dans les cellules HeLa pour en fournir du NADPH par la voie des pentoses phosphates pour le maintien du GSH.

#### 1.6.4 Choix du Modèle

Comme modèle cellulaire pour ce projet nous avons choisi les cellules HeLa provenant d'un carcinome du col de l'utérus. Cette lignée cellulaire fut isolée et mise en culture pour la première fois en 1951 par Georges Otto Gey et a été obtenue via l'American Type Culture Collection (ATCC no CCL-2). Elles sont couramment utilisées dans les laboratoires de recherche et ont été choisies comme modèle à cause leur caractère immortel, leurs ténacités et leur prolifération rapide. De plus, elles sont un bon modèle car l'hyperthermie fonctionne efficacement sur le cancer du col de l'utérus en clinique.

## CHAPITRE II

### RESULTATS EXPÉRIMENTAUX

#### 2.1 Préface

Ce chapitre est constitué d'un article qui décrit les résultats expérimentaux du projet mené durant ma maîtrise dans le laboratoire du Dr Diana Averill. Cet article sera soumis au journal «Archives of Biochemistry and Biophysics» et son titre est **Induction des mécanismes de défenses cellulaires par choc thermique : peroxirédoxine et glucose 6-phosphate déshydrogénase**. Les auteurs de cet article sont moi-même Marceline Tchouagué en premier acteur, Audrey Glory en second auteur et il a été révisé par le Dr Diana Averill. Marceline Tchouagué auteur principal a fait les expérimentations et la rédaction de l'article ainsi que la recherche bibliographique pour les figures 2, 3, 4 et 5. Audrey Glory second auteur a fait les expérimentations pour la figure 1 ainsi que la légende et la description de cette même figure, elle a aussi traduit l'introduction, les résultats et la discussion de l'article en anglais. Ce projet m'a permis d'étudier les mécanismes impliqués dans la toxicité de l'hyperthermie et l'effet protecteur de la thermotolérance chez les cellules cancéreuses.



## 2.2 Article

**HEAT SHOCK INDUCES CELLULAR DEFENSES: PEROXIREDOXIN AND  
GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE**

**Marceline Tchouagué<sup>a</sup>, Audrey Glory<sup>a</sup> and Diana A. Averill Bates<sup>a\*</sup> Ph.D**

<sup>a</sup>Département des sciences biologiques, TOXEN, Université du Québec à Montréal,  
Montréal, Québec.

\*Corresponding author

Dr Diana A. Averill-Bates

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal

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

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

**Running head:** Heat shock, peroxiredoxin, G6PD

**Keywords:**

- Hyperthermia
- Thermotolerance
- Peroxiredoxin
- Glucose 6-phosphate dehydrogenase
- Glutathione
- Apoptosis

Total number of text figures: 5

Total number of schemes: 1

Contact grant sponsor: NSERC Canada; 36725-2011

## ABSTRACT

Hyperthermia is a promising new anticancer treatment used in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. It uses heat (42-45°C) to kill cancer cells. Milder temperatures (39-41°C) can cause thermotolerance, a phenomenon that triggers cellular defense mechanisms to protect cells against subsequent exposures to hyperthermia. Although hyperthermia has proven effective in clinical trials, there are still many things to learn about its mechanisms at the cellular level. Mild (40°C) and lethal (42-43°C) hyperthermia increase the production of reactive oxygen species (ROS) in cells. This study focuses on the role of ROS and defense molecules such as antioxidants in the cellular stress response to mild and lethal hyperthermia, in order to better understand the mechanisms involved. Hyperthermia (42-43°C, 3 h) caused activation of caspases 9 and 3, as well as apoptosis in HeLa cells. The induction of apoptosis was decreased in mild thermotolerant (40°C) cells. Hyperthermia (42-43°C, 3h) and thermotolerance (40°C, 3 h) caused increased expression of the antioxidants peroxiredoxin-2 (Prx2) and Prx3, as well of the hyperoxidized form Prx-SO<sub>3</sub>. The heat (42°C)-induced increases in Prx3 and Prx-SO<sub>3</sub> were inhibited by the antioxidants PEG-catalase and MnTBAP, suggesting that ROS generated by hyperthermia were involved in their induction. Glucose, when metabolized by the pentose phosphate pathway, produces NADPH, which is needed to maintain the antioxidant glutathione in its reduced form, GSH. GSH levels increased after 1 h to 3 h at 40°C. The expression of the glucose transporter GLUT1 increased after 1h to 3h at 40, 42 and 43°C. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is the rate-limiting enzyme in the pentose cycle. Expression of G6PD increased after 3 h at 42-43°C, whereas its enzymatic activity increased after 1 h to 3 h at 40, 42 and 43°C. This study advances knowledge about the role of antioxidants in the cellular response induced by heat shock at both mild and lethal temperatures.

**Keywords:** Hyperthermia, thermotolerance, peroxiredoxin, glucose 6-phosphate dehydrogenase, glutathione, apoptosis

## INTRODUCTION

Hyperthermia is a cancer treatment where tissues can be targeted by exposure to high temperatures (42-45°C) that can damage and kill cancer cells (Horsman & Overgaard, 2007; Hurwitz & Stauffer, 2014; Issels, 2008; Lutgens et al., 2010; van der Zee, 2002; van der Zee et al., 2008). It is mainly used in combination with radiotherapy and chemotherapy, reducing their side effects to normal tissues and enhancing their therapeutic efficacy. Incidentally, hyperthermia is the best radio-sensitizer known to date (van der Zee, 2002). Its efficacy has been reported for the treatment of many types of cancer, such as head and neck, breast, cervix, bladder, lung, brain, rectum, prostate, liver and melanoma (Issels et al., 2006; van der Zee, 2002).

The mechanisms underlying cytotoxicity of hyperthermia ( $\geq 42^{\circ}\text{C}$ ) are not yet fully understood (Milleron & Bratton, 2007). However, hyperthermia can cause protein denaturation and aggregation, inhibition of DNA repair mechanisms, cell cycle arrest and cytoskeletal disruption (Wust et al., 2002). Furthermore, hyperthermia can cause cell death by apoptosis and/or necrosis in a variety of cell types (Bettaieb et al., 2013).

Thermotolerance is an adaptive survival response that can be acquired by preheating cells at elevated temperatures. It can be induced by short term exposure (e.g. 30 min) to high, lethal temperatures (42-45°C) or by longer exposures (3 to 24 h) to mild, non-lethal temperatures (39.5-41.5°C). Thermotolerant cells become resistant to subsequent stresses such as heat shock, oxidative stress, anticancer drugs, radiotherapy and environmental stressors (Gill et al., 1998; Holsapple & Wallace, 2008; Martindale & Holbrook, 2002; Palapati & Averill-Bates, 2011; Przybytkowski et al., 1986; Subjeck et al., 1982). Thermotolerance is transient and usually declines within a few days, therefore it does not interfere with hyperthermia treatments when

they are conducted outside of the thermotolerance window. Lower doses of heat stress such as 40°C can induce defense mechanisms in cells, such as heat shock proteins (HSPs) (Singh & Hasday, 2013; Subjeck et al., 1982; Przybytkowski et al., 1986) and antioxidants (Pallepati & Averill-Bates, 2010). However, little is known about the mechanisms involved in the response to lower doses of heat stress. This phenomenon could provide new perspectives for the treatment of pathologies such as ischemia-reperfusion and protection against drug toxicity and environmental toxins.

Reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense mechanisms are in equilibrium under normal physiological conditions (Halliwell & Gutteridge, 2007). A disruption of this redox equilibrium leads to a state of oxidative stress, which could be caused by a dysfunction in the mitochondrial respiratory chain or exposure to stress factors such as environmental toxins. When present at doses exceeding physiological levels, ROS can oxidize lipids, nucleic acids and proteins and can also decrease cellular levels of ATP and NADPH (Chandra et al., 2000). To counteract oxidative stress, cells possess non-enzymatic antioxidants such as reduced glutathione (GSH) and enzymatic antioxidants that can transform or eliminate ROS. The superoxide radicals produced in the mitochondrial respiratory chain are the substrate of the enzyme superoxide dismutase (SOD), producing another ROS, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Halliwell & Gutteridge, 2007). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is considered one of the most important ROS due its implication, at physiological concentrations, in normal cellular functions such as growth, proliferation and differentiation (Burdon, 1995; Groeger & al., 2009; Hancock et al., 2001; Pallepati & Averill-Bates, 2012; Sies, 2014). It is reduced to water for elimination by the enzymes glutathione peroxidase (GPx), catalase and the peroxiredoxins (Prxs) (Park et al., 2006).

Many of the properties and biological functions involving protein structure, enzymes and redox pathways are dependent on the properties of thiol groups (Bindoli et al., 2008; Sies, 2014). The peroxiredoxins are a family of thiol peroxidases (Poynton &

Hampton, 2014). There are 6 different peroxiredoxins: Prx 1, 2 and 6 located in the cytosol, Prx3 in mitochondria, Prx4 in the endoplasmic reticulum and Prx5 in both mitochondria and peroxisomes (Cox et al., 2009). They can all be classified as 2-cys typical or atypical proteins except for Prx6 which is classified as a 1-cys protein (Kang et al., 2005). Peroxiredoxins are antioxidant enzymes responsible for the reduction of  $H_2O_2$  to  $H_2O$  and for the reduction of hydroperoxides to alcohol using a catalytic system involving thioredoxin (Trx) and thioredoxin reductase (TrxR) (Kim et al., 2005). The electrons necessary for these reactions are provided by NADPH generated in the cytosol via the metabolism of glucose in the pentose phosphate pathway and in mitochondria via the substrates of the respiratory chain (Bindoli et al., 2008). Mitochondrial Prx3 is associated with Trx2 and TrxR2 whereas cytosolic Prx2 is associated with Trx1 and TrxR1; both require NADPH (Park et al., 2006). The sequestration of  $H_2O_2$  by Prx3 involves oxidation of the latter's 2 cysteine residues, which are then reduced to regenerate Prx3 by Trx2. This allows Prx3 to bind to a new  $H_2O_2$  molecule. Subsequently, Trx2 will be reduced by TrxR2 by an electron transfer from NADPH to Trx2 (Cox et al., 2009; Kang et al., 2005). Prx3 is more efficient than Prx5 and can react with 90% of the  $H_2O_2$  present in mitochondria (Cox et al., 2009).

GSH is a major low molecular weight thiol antioxidant involved in redox homeostasis in mammalian cells. It is synthesized in the cytosol in a two-step process catalyzed by glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase (Mailloux et al., 2013). It then travels to mitochondria where it is stored and represents about 15% of total GSH cellular content (Murphy, 2012). GSH, along with GPx, is required to trap  $H_2O_2$  and plays a crucial part in the elimination of hydroperoxides. Two GSH molecules are oxidized by  $H_2O_2$  to form glutathione disulfide (GSSG) using GPx. The GSSG produced can then be reduced by glutathione reductase (GR) and NADPH to regenerate GSH (Mailloux et al., 2013). GSH can also modulate protein functions by oxidation or by disulfide bond formation with cysteines (Murphy, 2012; Sies, 2014).

Glucose transport and metabolism are two major processes that can alter the mechanisms of cell death via apoptosis (Moley & Mueckler, 2000). A slight decrease in glucose levels can lead to a lack of ATP and then to activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. Glucose enters cells from the blood using the GLUT family of transporters. It is then metabolized either by glycolysis to produce ATP or by the pentose phosphate pathway to produce NADPH. The pentose phosphate pathway is one of the main pathways for metabolism of glucose. It plays a central part in the cellular redox state by maintaining antioxidants functional to counter oxidative stress. This pathway is the main cellular source of NADPH that is used to regenerate GSH from GSSG (Patra & Hay, 2014). Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is critical in the pentose phosphate pathway because it catalyzes the limiting step that produces the first NADPH molecule. Incidentally, the pentose phosphate pathway can be considered as an early marker of oxidative stress because it can react quickly to a growing need for NADPH to maintain the cellular redox state.

Our earlier studies showed that heat shock increases oxidative stress in HeLa cells at moderate (40°C) (Pallepati & Averill-Bates, 2010) and high (42-43°C) (Bettaieb & Averill-Bates, 2008) temperatures. To further improve our understanding of the heat shock response, this study investigates the role of oxidative stress in orchestrating changes in key redox molecules such as peroxiredoxins, glutathione and G6PD, during low and high doses of heat shock.



## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

HeLa cells (ATCC no. CCL-2) were grown in monolayer in tissue culture flasks (Sarstedt, St Laurent, QC, Canada) in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Canada), penicillin (50 units/ml) and streptomycin (50 ug/ml) (Flow Laboratories, Mississauga, ON) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in a water jacketed incubator (Bettaieb and Averill-Bates, 2005). Cell culture medium was replaced with fresh medium 24 h before experiments. Cells were grown to near confluence and then harvested using 0.5 mg/mL trypsin/0.2 mg/mL EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) and washed by centrifugation (1,000 x g, 3 min).

### Heat and inhibitor treatments

Confluent cells were heated for 1 h, 2 h and 3 h at 40 °C, 42 °C and 43 °C, relative to controls (37 °C), in temperature controlled precision waterbaths ( $\pm 0.02$  C) (Haake D8, Fisher Scientific, Montreal, QC) (Bettaieb and Averill-Bates, 2005). One mL of cell suspension reached a temperature within 0.1 °C of the waterbath temperature within 3 min. The antioxidants, manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP) (5  $\mu$ M) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and polyethylene glycol-catalase (PEG-catalase) (300 $\mu$ M) (Sigma Aldrich Co., Saint-Louis, MO, USA) were added to cells for 1 h and 3 h, respectively, prior to experiments (Glory et al., 2014). In HeLa cells, PEG-catalase increased intracellular catalase activity by 47%, from  $3.71 \pm 0.67$  to  $6.20 \pm 0.30$  mmol/min/ $10^6$  cells (n=3).



### **Morphological analysis of apoptosis**

Cells were labelled with Hoechst 33258 (5 µg/ml) (blue-green fluorescence) (Sigma-Aldrich Co.), which binds to condensed nuclear chromatin of apoptotic cells (Tanel and Averill-Bates, 2005). Observations were made by fluorescence microscopy (model IM, Carl Zeiss Canada Ltd, St. Laurent, QC) and photographs were taken by digital camera (camera 3CCD, Sony DXC-950P, Empix imaging Inc, Mississauga, ON). Images were analyzed using Northern Eclipse software (Empix Imaging). Fractions of apoptotic cells were calculated relative to total cells. For each condition, at least 200 cells were counted (n=6).

### **Caspase activity**

Caspase activity was measured as described previously (Tanel and Averill-Bates, 2005). Cells were lysed at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The kinetic reaction was followed for 30 min after addition of the appropriate caspase substrates at  $37^{\circ}\text{C}$  using a Quadruple Monochromator Microplate Reader (Infinite M1000, Tecan US, NC, USA). Caspase activities were measured by cleavage of the following fluorogenic peptide substrates: Ac-DEVD-AMC for caspase-3 and Ac-LEHD-AFC for caspase-9 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Activities of caspases are represented as relative cumulative fluorescence of the kinetic reaction and compared to untreated controls (n=7).

### **Preparation of whole cells lysates**

Cells were washed by centrifugation (1000 x g, 3 min) in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20mM MOPS, pH 7.4). The supernatant was discarded, and pelleted cells were resuspended in lysis buffer B (buffer A plus 5% Percoll, 0.01% digitonin, and a cocktail of protease inhibitors: 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM aprotinin, 10 mM pepstatin A, 10 mM leupeptin, 25 mM calpain inhibitor I, pH 7.4), and then incubated on ice for 1 h (Tanel and Averill-Bates, 2005). Whole

cell lysates were isolated in the supernatant by a 10 min centrifugation step at 2500 x g to remove nuclei and unbroken cells.

### **Subcellular fractionation**

Subcellular fractionation was performed as described previously (Bettaieb and Averill-Bates, 2005), with modifications. Cells were washed in buffer A, and then resuspended in buffer B containing 0.1 mM dithiothreitol (DTT). Membranes were broken using a dounce homogenizer (200 strokes/sample). After 30 min incubation on ice, debris and unbroken cells were removed by centrifugation (500 x g, 10 min) and then supernatants were centrifuged (2500 x g, 5 min) to separate nuclei (pellet). Supernatants were then centrifuged (15,000 x g, 15 min) to separate mitochondria. The pellet containing the mitochondrial fraction was then resuspended in buffer C (300 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, cocktail of protease inhibitors, pH 7.4) containing 0.1 mM DTT. Supernatants were centrifuged (100,000 x g, 1 h) further to separate the cytosolic fraction (supernatant). The purity of cytosolic and mitochondrial fractions was confirmed by Western blotting using glutathione S-transferase (GST-p1) (Calbiochem) and cytochrome oxidase (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), respectively. The average purity of mitochondrial and cytosolic fractions was at least 90% (n=4) (data not shown).

### **Western blot analysis**

Proteins (30 µg) were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10–15%) and detected by Western blotting using primary antibodies against Prx3 (1:2000), Prx2 (1:2000), GLUT1 (1:500), G6PD (1:500), (Santa Cruz Biotechnology) and Prx-SO3 (1:2000) (Cedarlane Canada, Burlington, ON, Canada) and appropriate secondary antibodies (Tanel and Averill-Bates, 2005). Protein expression was analysed relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for cytosolic fractions and voltage-dependent anion channel (VDAC,

1:500) for mitochondrial fractions, using a laser scanning densitometer (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) and Fluorchem and Quantity One software.

### **Dosage of NADPH**

NADPH was determined as described previously (Klingenberg, 1985; Lord-Fontaine and Averill-Bates, 2002). Cells ( $10^6$ /mL) in PBS-1% bovine serum albumin (BSA) were placed on ice and 1 M KOH was added. The extract was heated at 90°C for 5 min, kept on ice for 5 min and then triethanolamine phosphate (TEA, 0.5 M;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.4 M;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 M) was added until the pH reached 7.8. After 10 min, the extract was centrifuged at 4°C for 5 min at 30,000 x g. The clear supernatant and substrate mixture (0.1 M sodium oxoglutarate with 0.2 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) were mixed in a microplate well and glutamate dehydrogenase (240 U/mL) (Sigma Aldrich Co.) was added to start the reaction. The absorbance was read at 340 nm after 10 min using an Infinite M1000 multiwell plate reader (TECAN US). The NADPH concentration/ $10^6$  cells was calculated using molar extinction coefficient of NADPH  $\epsilon = 0.163 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **Dosage of glutathione**

Total glutathione and GSSG were determined as previously described (Anderson, 1985; Lord-Fontaine and Averill-Bates, 2002). Glutathione reductase catalyzed the conversion of 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) in the presence of NADPH in deproteinized cell supernatants (16,000 x g, 2 min) in 0.143 M sodium phosphate, containing 6.3 mM EDTA (pH 7.5). The rate of formation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, which is proportional to total glutathione concentration (GSH + GSSG), was followed at 412 nm during 2 min at 30°C in a spectrophotometer (TECAN Infinite M1000). Sample values were calculated using a standard curve of nmol glutathione versus rate and expressed as nmol/ $10^6$  cells. GSSG was determined using the same

method, but after preincubation for 60 min with 2-vinylpyridine to bind GSH. GSH was obtained by subtracting the amount of GSSG from total glutathione.

### **Dosage of G6PD**

G6PD activity was determined using an assay kit (#700300, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). The conversion of  $\text{NADP}^+$  to NADPH is catalyzed by two enzymes in the pentose phosphate pathway. G6PD catalyzes the conversion of glucose 6-phosphate to 6-phosphogluconolactone, which is hydrolyzed to 6-phosphogluconate, the substrate for the second enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD). G6PD activity is obtained by subtracting the activity of 6PGD from total activity for the two enzymes (G6PD + 6PGD). Cells ( $3 \times 10^6$ ) were collected using a rubber policeman and centrifuged at  $2000 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . One ml of cold PBS was added and cells were sonicated on ice. The suspension was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant (10  $\mu\text{l}$ ) was mixed in a microwell plate with 150  $\mu\text{l}$  of assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 10  $\mu\text{l}$  of  $\text{NADP}^+$  cofactor, 10  $\mu\text{l}$  of enzyme mixture and 10  $\mu\text{l}$  of fluorometric detector. The assay was initiated by addition of 10  $\mu\text{l}$  of glucose 6-phosphate substrate. The plate was incubated for 20 min at  $37^\circ\text{C}$  and the fluorescence was read using an excitation wavelength of 530-540 nm and an emission wavelength of 585-595 nm in a spectrofluorimeter (TECAN infinite M1000). Samples values were calculated from the standard curve for NADPH after subtraction of 6PGD activity. One unit is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 nmol of glucose 6-phosphate to 6-phospho-D-gluconate and generates 1 nmol of NADPH per min at  $37^\circ\text{C}$ .

### **Statistics**

Data represent means  $\pm$  SEM from at least three independent experiments performed in duplicate. When not shown, error bars lie within symbols. Comparisons among multiple groups were made by one-way ANOVA, which measures the linear contrast of means. The Bonferroni-Holmes adjustment was used to control for the family-wise error rate at a desired level ( $\alpha=5\%$ ). The software used was JMP Statistical Discovery 4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). For significant differences,  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### **Heat shock causes apoptosis in HeLa cells: protection by mild thermotolerance developed at 40 °C**

The exposure of HeLa cells to hyperthermia (42-43°C) for 3 h caused activation of caspases 3 and 9 (Figure 1A and 1B). Under these conditions, hyperthermia caused condensation of nuclear chromatin, an end stage point in the execution phase of apoptotic cell death (Figure 1C). However, in thermotolerant cells that were pre-heated at 40°C for 3h, there were significant decreases in hyperthermia-induced caspase activation and chromatin condensation (Figure 1A-1C). Therefore, mild thermotolerance (40°C) prevented against the pro-apoptotic changes caused by hyperthermia (42-43°C).

### **Role of antioxidants in the heat shock response**

Mild thermotolerance developed at 40°C induces antioxidants such as SOD and catalase (Pallepati et Averill-Bates, 2010). This study determines further whether hyperthermia and/or mild thermotolerance can induce the Prx/Trx system of antioxidants, which plays a critical role in the elimination of peroxides from cells. Hyperthermia (42-43°C) caused significant increases in protein expression of Prx2 (Figure 2A) and Prx 3 (Figure 2B) after 3 h. The increase for the mitochondrial form Prx3 was more pronounced than for the cytosolic form Prx2. In mild thermotolerant cells (40°C), there were small increases in expression of Prx2 and Prx3, compared to the higher temperatures (42-43°C). Levels of Prx2 and Prx3 did not change after shorter heating times of 1 h and 2 h (data not shown).

Prxs can undergo further oxidation to generate a hyperoxidised form Prx-SO<sub>3</sub> (Poynton and Hampton, 2014). The exposure of cells to hyperthermia (42-43°C) for 3



h led to increased expression of Prx-SO<sub>3</sub> in mitochondria (Figure 2C). Again, there was a very small increase in Prx-SO<sub>3</sub> levels in thermotolerant cells at 40°C, which suggests that thermotolerance could protect cells against oxidative changes caused by hyperthermia at higher temperatures (42-43°C).

#### **Do ROS generated by hyperthermia cause induction of Prxs?**

Hyperthermia (42-43°C) increases generation of ROS in HeLa cells (Bettaieb and Averill-Bates, 2008). To determine the role of ROS in the induction of Prxs by hyperthermia, cells were pretreated with the antioxidants PEG-catalase and MnTBAP, a SOD mimetic. The hyperthermia (42°C)-induced increases in the expression of Prx3 (Figure 3A), and its hyperoxidised form Prx-SO<sub>3</sub> (Figure 3B-3C), were completely inhibited by PEG-catalase and MnTBAP. The small increases in Prx3 and Prx-SO<sub>3</sub> at 40°C were not modified by these antioxidants (data not shown). This suggests that ROS are involved in the induction of Prx3 in mitochondria during heat stress (42-43°C).

#### **Hyperthermia increases levels of glucose-associated molecules that maintain the glutathione redox cycle**

In thermotolerant cells, levels of GSH increased after 1 h at 40°C resulting in a 3-fold increase after 3 h (Figure 4A). GSH levels did not change after shorter times of 15 and 30 min (data not shown). There was no increase in levels of the oxidized form GSSG at 40°C, but rather a decrease (~24%) occurred (Figure 4B). We next determined whether hyperthermia can affect glucose transport and metabolic activities, which produce NADPH through the pentose phosphate cycle. NADPH is essential for maintenance of the glutathione redox cycle. Glucose transporter 1 (GLUT1) is a uniporter protein that facilitates glucose transport across membranes of epithelial cells (Olson and Pessin, 1996). Hyperthermia (42-43°C) caused an increase in protein expression of the glucose transporter GLUT1 after 1 h to 3 h, which also

occurred in thermotolerant cells (Figure 5A). There was also an increase in protein expression of the key pentose phosphate cycle enzyme G6PD after 3 h at 42 and 43°C (Figure 5B), but not after shorter times of 1 h and 2 h (data not shown). However, hyperthermia (42-43°C) increased the enzymatic activity of G6PD after 1 h to 3 h, and this also occurred in thermotolerant cells (Figure 5C). The levels of NADPH did not change in heated cells (Figure 5D).

## DISCUSSION

This study shows for the first time that hyperthermia (42-43°C) induces protein expression of the antioxidants Prx2 and Prx3, along with the glucose-associated molecules GLUT1 and G6PD that maintain the glutathione redox cycle (Scheme 1, red arrows). Prx2 and Prx3 were induced in the cytosolic and mitochondrial fractions, respectively. The redox status of Prxs is extremely dependent on increases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cox & al., 2008). The induction of these antioxidant defenses probably arises as result of increased generation of ROS, which occurs during heat stress in HeLa cells. The increased accumulation of Prx-SO<sub>3</sub>, the hyperoxidised form of Prx in mitochondria suggested increased generation of ROS by hyperthermia in mitochondria. This was confirmed by complete inhibition of Prx3 induction in mitochondria at 42°C by the antioxidants PEG-catalase and MnTBAP.

MnTBAP is a MnSOD (the mitochondrial isoform of SOD) mimetic and it had be suggested to be located in mitochondria (Myers & al., 2011). MnTBAP scavenges superoxide but also peroxynitrites (Batinić-Haberle & al., 2009). Because superoxide is rapidly transformed into hydrogen peroxide by superoxide dismutases, the level of the superoxide anion in the mitochondria can have a direct impact on level of Prx3 and Prx-SO<sub>3</sub>. Moreover, peroxiredoxins are known to have a role in the detoxification of peroxynitrites (Trujillo & al., 2009), thus contributing to the modulation of Prx3 and Prx-SO<sub>3</sub> levels by MnTBAP. A conjugation of polyethylene glycol to catalase (PEG-catalase) prolongs the circulatory half-life of the native enzyme and enhances their intracellular access. Because PEG has surface active properties and can induce cell fusion, this assumes that PEG conjugation could enhance cell binding and association of normally membrane-impermeable enzymes (Beckman et al, 1988). However, even if it is known that PEG can bind the outer membrane of mitochondria (Chen & al., 2009), it has not yet been shown if it can enter them. We suggest that the fact that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can freely move through into the cytosol to the mitochondrial

membranes can explain the effect of PEG-catalase on Prx3 and Prx-SO<sub>3</sub> via the impact of the reduction of the cytosolic pool of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the mitochondrial pool of that particular ROS (Nohl & Jordan, 1980). Given that the outer mitochondrial membrane is permeable; it is probable that PEG can cross it, therefore bringing catalase to its endogenous location. Our results also show that stimulation of the pentose phosphate cycle, involving increased activity of the rate-limiting enzyme G6PD, is an early cellular response to low increases in levels of ROS.

The cellular defense molecules Prx2, Prx3, GLUT1, G6PD and GSH were also induced during mild thermotolerance developed at 40°C (Scheme 1, green arrows), although to a lesser extent than at the higher temperatures (42 and 43°C). This is likely explained by the lower dose of heat stress at the milder temperature compared to higher temperatures. Lower doses of heat stress at 40°C were shown to induce other defense mechanisms in HeLa cells, such as heat shock proteins (HSPs) (Bettaieb & Averill-Bates, 2008) and the antioxidants catalase and MnSOD (Pallepati & Averill-Bates, 2010). MnSOD is the mitochondrial isoform of SOD. The activities of GPx and the cytosolic form of SOD, CuZnSOD, did not change at 40°C. Mild thermotolerance (40°C) was shown to protect HeLa cells against hyperthermia (42-45°C)-induced apoptosis through the mitochondrial pathway (Bettaieb & Averill-Bates, 2005).

The induction of mitochondrial antioxidants such as Prx3 and MnSOD by hyperthermia suggests that mitochondria are the principal cellular source of ROS during heat shock. This would likely arise through superoxide generation from the electron transport chain. Superoxide is converted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> either spontaneously or by the action of SOD. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is able to diffuse out of mitochondria, which could explain the induction of antioxidants such as Prx2 and catalase in other subcellular compartments by hyperthermia. Other potential but minor sources of increased ROS

generation by hyperthermia would be increased activity of enzymes such as NADPH oxidase and xanthine oxidase that produce superoxide.

Levels of ROS were shown to increase during both mild (40°C) and lethal (42-45°C) heat shock in HeLa cells (Bettaieb & Averill-Bates, 2008; Palapati & Averill-Bates., 2010). Elevated temperatures can increase the rates of biochemical reactions, which would increase cell metabolism and cause oxidative stress (Bettaieb & al, 2013). A small increase in ROS generation can induce cellular defense molecules. However, if the oxidative stress insult is too severe, then damage occurs to cellular targets such as proteins, nucleic acids, lipids and cell membranes, and eventually cells die by apoptosis and/or necrosis. Prxs are among the most abundant cellular proteins, representing about 1% of total soluble proteins (Chae & al., 1999; Cox & al., 2009). These proteins are the most efficient cellular scavengers of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroperoxides, compared to GPx and catalase (Peskin & al., 2007; Poynton and Hampton, 2014). A kinetic study showed that 90% of peroxides in mitochondria react with Prx3 (Cox & al., 2009). Therefore, they play a key role in cellular detoxification of peroxides (Brown & al., 2008).

It was reported that Prx3 is involved in the regulation of apoptosis in mitochondria (Cox & al., 2008). Prx2 and Prx3 were reported to be upregulated in breast, cervix and lung cancer (Kim & al., 2005; Park & al., 2006). Moreover, Prx3 was shown to protect against oxidative stress and apoptosis in cells from cervical cancer (Li & al., 2013). Given that cancer cells grow exponentially and levels of oxygen are low, ROS production from mitochondria is increased. Given that Prx3 is a sensitive responder to increased ROS, its induction in cancer cells could serve to remove cellular ROS and inhibit apoptosis, which would provide a favorable microenvironment for tumor cell proliferation (Beevi & al., 2007). Therefore, the Prx family could render cells resistant to cancer treatments such as chemotherapy and radiotherapy that generate increased levels of ROS and kill cells by apoptosis.

The redox equilibrium between ROS generation and antioxidants needs to be well balanced to maintain cellular homeostasis. If there is increased ROS production and/or depletion of antioxidant defenses, then the cell becomes susceptible to oxidative damage to macromolecules and elimination by cell death processes. Increased generation of ROS during heat shock could cause an imbalance in the cellular redox equilibrium. Glucose is metabolized mainly through glycolysis to provide ATP and through the pentose phosphate cycle to generate NADPH. The intracellular glucose transporter GLUT1 was induced by hyperthermia along with G6PD, the rate-limiting enzyme of the pentose cycle. NADPH is important for regeneration of the reduced forms of glutathione (GSH) and Prxs, once they become oxidized. The cellular ratio of GSH:GSSG is usually high under physiological conditions (Halliwell & Gutteridge, 2007). Depletion of intracellular GSH along with oxidation of Prxs occurs during oxidative stress. Accordingly, levels of GSH and NADPH, which are important molecules for the detoxification of ROS such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroperoxides, were well maintained during hyperthermia. In addition, there was no increase in GSSG and the GSH:GSSG ratio did not decrease during mild heat stress at 40°C.

The redox status of GSH, particularly in mitochondria, appears to be a central actor in apoptosis (Adjeitey & al., 2013). A decrease in mitochondrial levels of GSH renders cells more susceptible to oxidative stress (Mailloux & al., 2013). Indeed, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causes a loss of mitochondrial membrane potential, which precedes the release of cytochrome c from mitochondria and activation of the mitochondrial pathway of apoptosis (Pallepati & Averill-Bates, 2010). An important mechanism for the detoxification of peroxides involves the GPx-catalysed oxidation of GSH to GSSG. The regeneration of GSH from GSSG involves glutathione reductase and the reducing power of NADPH generated by the activity of G6PD in the pentose phosphate cycle (Préville & al., 1999). Accordingly, the increased levels of GSH



during mild thermotolerance at 40°C could protect cells against the loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis via mitochondria.

The genes coding for GLUT1 and G6PD are upregulated in a variety of human cancers (Furuta & al., 2010). Overexpression of GLUT1 is characteristic of head and neck carcinomas. GLUT1 was shown to be overexpressed in oral squamous cell carcinoma and indicated a poor prognosis in patients (Kunkel & al., 2003). Glucose metabolism is high in tumors and occurs by glycolysis. The increased glucose uptake via GLUT1 led to increased glycolytic metabolism that favors tumor cell survival (Kunkel et al., 2003).

Relatively high levels of G6PD can be found in high metabolic tissues such as liver and adipose tissue (Cohen & Rosemeyer, 1969), as well as in cancer cells (Mailloux & al., 2013). The pentose phosphate pathway is regulated by many factors including ROS such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Palmer, 1999). Levels of NADPH can inhibit G6PD activity, whereas its activity is stimulated by NADP<sup>+</sup>. However, GSSG can regulate the pentose phosphate cycle by counteracting the NADPH inhibition of G6PD (Eggleston & Krebs., 1974). Under normal conditions, levels of NADPH exceed those of NADP<sup>+</sup> by at least 100-fold, which maintains pentose phosphate cycle activity at low levels. During an oxidant stress, activity of the pentose cycle can increase by about 200-fold above basal levels to maintain the reducing (NADPH) environment in the cell (Au & al., 2000; Tuttle & al., 2009). In cancer cells with high consumption of NADPH, G6PD activity is increased (Mailloux & al., 2013).

Hyperthermia (42-43°C) increased the activity of mitochondrial caspase 9 and execution phase events such as caspase 3 activation and nuclear damage after 3 h. These pro-apoptotic events were diminished in thermotolerant cells at 40°C. The induction of GLUT1 and G6PD by hyperthermia (42-43°C) could indicate a cellular survival response to increased stress. However, prolonged heat stress would eventually result in cell death, which occurred by apoptosis after 3 h. The induction

of Prx3 and its hyperoxidised form by hyperthermia (42-43°C) occurred during the same time frame (3 h) as caspase activation and apoptosis. The oxidized form of Prx3 could be considered as a marker of apoptosis (Cox & al., 2008). The role of Prx3 in apoptosis caused by stresses such as hyperthermia is not well understood and requires further investigation.

**Acknowledgements:** The authors wish to thank Dr Melanie Grondin for valuable technical assistance. This work was supported by grants from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (DAB).

## REFERENCES

- Adjeitey, C.N.-K., Mailloux, R.J. and Harper, M.-E. (2013). Mitochondrial uncoupling in skeletal muscle by UCP1 augments energy expenditure and glutathione content while mitigating ROS production. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(3), E405-E415.
- Anderson, M.E. (1985). Tissue glutathione. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. PP. 317-323.
- Au, S.W., Gover, S., Lam, V.M. and Adams, M.J. (2000). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP+ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 8(3), 293-303.
- Batinić-Haberle, I., Cuzzocrea, S., Rebouças, J. S., Ferrer-Sueta, G., Mazzon, E., Di Paola, R., ... & Salvemini, D. (2009). Pure MnTBAP selectively scavenges peroxynitrite over superoxide: comparison of pure and commercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two models of oxidative stress injury, an SOD-specific Escherichia coli model and carrageenan-induced pleurisy. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(2), 192-201.
- Beevi, S.S., Rasheed, M.H. and Geetha, A. (2007). Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 375(1), 119-123.
- Beckman, J. S., Minor, R. L., White, C. W., Repine, J. E., Rosen, G. M., & Freeman, B. A. (1988). Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 263(14), 6884-6892.

- Bettaieb, A. and Averill-Bates, D.A. (2008). Thermotolerance induced at a fever temperature of 40 C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signalling. *Biochemistry and Cell Biology*, 86(6), 521-538.
- Bettaieb, A. and Averill-Bates, D.A. (2005). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40° C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 205(1), 47-57.
- Bettaieb, A., Wrzal, P.K. and Averill-Bates, D.A. (2013). Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. Chapter 12. In: *Cancer Treatment – Conventional and Innovative Approaches / Book 2*. L. Rangel, Ed. InTech - Open Access Company. pp. 257-283.
- Bindoli, A., Fukuto, J.M. and Forman, H.J. (2008). Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1549-1564.
- Brown, K.K., Eriksson, S.E., Arnér, E.S. and Hampton, M.B. (2008). Mitochondrial peroxiredoxin 3 is rapidly oxidized in cells treated with isothiocyanates. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(4), 494-502.
- Burdon, R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(4), 775-794.
- Chae, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W. and Rhee, S.G. (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 45(2), 101-112.
- Chandra, J., Samali, A. and Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 323-333.
- Chen, H., Quick, E., Leung, G., Hamann, K., Fu, Y., Cheng, J. X., & Shi, R. (2009). Polyethylene glycol protects injured neuronal mitochondria. *Pathobiology*, 76(3), 117-128.

- Cohen, P. and Rosemeyer, M. (1969). Subunit interactions of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*, 8(1), 8-15.
- Cox, A., Winterbourn, C. and Hampton, M. (2010). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal*, 425, 313-325.
- Cox, A.G., Pullar, J.M., Hughes, G., Ledgerwood, E.C. and Hampton, M.B. (2008). Oxidation of mitochondrial peroxiredoxin 3 during the initiation of receptor-mediated apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(6), 1001-1009.
- Eggleston, L.V. and Krebs, H.A. (1974). Regulation of the pentose phosphate cycle. *Biochemical Journal*, 138, 425-435.
- Furuta, E., Okuda, H., Kobayashi, A. and Watabe, K. (2010). Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805(2), 141-152.
- Gill, R.R., Gbur Jr, C.J., Fisher, B.J., Hess, M.L., Fowler III, A.A., Kukreja, R.C. and Sholley, M.M. (1998). Heat shock provides delayed protection against oxidative injury in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(12), 2739-2749.
- Glory, A., Bettaieb, A. and Averill-Bates, D.A. (2014). Mild thermotolerance induced at 40° C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins. *International Journal of Hyperthermia*, 30(7), 502-512.
- Groeger, G., Quiney, C. and Cotter, T.G. (2009). Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2655-2671.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed Oxford, Univ. Press. Oxford.

- Hancock, J., Desikan, R. and Neill, S. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29(2), 345-349.
- Holsapple, M.P. and Wallace, K.B. (2008). Dose response considerations in risk assessment—an overview of recent ILSI activities. *Toxicology Letters*, 180(2), 85-92.
- Horsman, M.R. and Overgaard, J. (2007). Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy. *Clinical Oncology*, 19(6), 418-426.
- Issels, R.D. (2008). Hyperthermia adds to chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 44(17), 2546-2554.
- Issels, R.D., Schlemmer, M. and Lindner, L.H. (2006). The role of hyperthermia in combined treatment in the management of soft tissue sarcoma. *Current Oncology Reports*, 8(4), 305-309.
- Kang, S.W., Rhee, S.G., Chang, T.-S., Jeong, W. and Choi, M.H. (2005). 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine*, 11(12), 571-578.
- Kim, Y.S., Park, J.H., Lee, H.L., Shim, J.Y., Choi, Y.I., Oh, Y.J., Shin, S.S., Choi, Y.H., Park, K.J. and Park, R.W. (2005). Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 59(2), 142-150.
- Klingenberg, M. (1985). Nicotinamide-adenine dinucleotides and dinucleotide phosphates. *Methods of Enzymatic Analysis*, 7, 251-262.
- Kunkel, M., Reichert, T.E., Benz, P., Lehr, H.A., Jeong, J.H., Wieand, S., Bartenstein, P., Wagner, W. and Whiteside, T.L. (2003). Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 97(4), 1015-1024.



- Landry, J., Bernier, D., Chrétien, P., Nicole, L.M., Tanguay, R.M. and Marceau, N. (1982). Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Research*, 42(6), 2457-2461.
- Li, L., Zhang, Y.-G. and Chen, C.-L. (2013). Anti-apoptotic role of peroxiredoxin III in cervical cancer cells. *FEBS Open Bio*, 3, 51-54.
- Liu, T. H., Beckman, J. S., Freeman, B. A., Hogan, E. L., & Hsu, C. Y. (1989). Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 256(2), 589-593.
- Lord-Fontaine, S. and Averill-Bates, D.A. (2002). Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(8), 752-765.
- Lutgens, L., van der Zee, J., Pijls-Johannesma, M., De Haas-Kock, D.F., Buijsen, J., van Mastrigt, G.A., Lammering, G., De Ruyscher, D.K. and Lambin, P. (2010). Combined use of hyperthermia and radiation therapy for treating locally advanced cervix carcinoma. *The Cochrane Library*. 20(1), 63-77.
- Mailloux, R.J., McBride, S.L. and Harper, M.-E. (2013). Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(12), 592-602.
- Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 1-15.
- Milleron, R. and Bratton, S. (2007). 'Heated' debates in apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(18), 2329-2333.
- Moley, K. and Mueckler, M. (2000). Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis*, 5(2), 99-105.

- Murphy, M.P. (2012). Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(6), 476-495.
- Myers, J. M., Antholine, W. E., & Myers, C. R. (2011). The intracellular redox stress caused by hexavalent chromium is selective for proteins that have key roles in cell survival and thiol redox control. *Toxicology*, 281(1), 37-47.
- NOHL, H., & JORDAN, W. (1980). The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *European Journal of Biochemistry*, 111(1), 203-210.
- Olson, AL., Pessin, JE (1996) . Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annual Review Nutrition*. 235-256.
- Pallepati, P. and Averill-Bates, D. (2010). Mild thermotolerance induced at 40° C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495(2), 97-111.
- Pallepati, P. and Averill-Bates, D. (2012). Reactive Oxygen Species, Cell Death Signaling and Apoptosis In: *Principles of Free Radical Biomedicine Vol. II. K Pantopoulos and H Schipper, Eds, Nova Sciences Publishers, Hauppauga, New York*, pp 513.
- Pallepati, P. and Averill-Bates, D.A. (2011). Mild thermotolerance induced at 40 C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(6), 667-679.
- Palmer, A. (1999). The activity of the pentose phosphate pathway is increased in response to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 106(3-4), 317-328.
- Park, J.H., Kim, Y.S., Lee, H.L., Shim, J.Y., Lee, K.S., Oh, Y.J., Shin, S.S., Choi, Y.H., Park, K.J. and Park, R.W. (2006). Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung. *Respirology*, 11(3), 269-275.

- Patra, K.C. and Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(8), 347-354.
- Peskin, A.V., Low, F.M., Paton, L.N., Maghzal, G.J., Hampton, M.B. and Winterbourn, C.C. (2007). The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 11885-11892.
- Poynton, R.A. and Hampton, M.B. (2014). Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 906-912.
- Préville, X., Salvemini, F., Giraud, S., Chaufour, S., Paul, C., Stepien, G., Ursini, M.V. and Arrigo, A.-P. (1999). Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Experimental Cell Research*, 247(1), 61-78.
- Przybytkowski, E., Bates, J.H., Bates, D.A. and MacKillop, W.J. (1986). Thermal adaptation in CHO cells at 40 C: the influence of growth conditions and the role of heat shock proteins. *Radiation Research*, 107(3), 317-331.
- Sies, H. (2014). Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), 8735-8741.
- Singh, I.S. and Hasday, J.D. (2013). Fever, hyperthermia and the heat shock response. *International Journal of Hyperthermia*, 29(5), 423-435.
- Subject, J., Sciandra, J. and Johnson, R. (1982). Heat shock proteins and thermotolerance; a comparison of induction kinetics. *The British Journal of Radiology*, 55(656), 579-584.
- Tanel, A. and Averill-Bates, D.A. (2005). The aldehyde acrolein induces apoptosis via activation of the mitochondrial pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1743(3), 255-267.

- Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Thomson, L., Flohé, L., & Radi, R. (2007). Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. In *Peroxiredoxin Systems* (pp. 83-113). Springer Netherlands.
- Tuttle, S., Stamato, T., Perez, M.L. and Biaglow, J. (2009). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and the oxidative pentose phosphate cycle protect cells against apoptosis induced by low doses of ionizing radiation, *153*(6), 781-787
- van der Zee, J. (2002). Heating the patient: a promising approach? *Annals of Oncology*, *13*(8), 1173-1184.
- van der Zee, J., Vujaskovic, Z., Kondo, M. and Sugahara, T. (2008). The Kadota Fund International Forum 2004-Clinical group consensus. *International Journal of Hyperthermia*, *24*(2), 111-122.
- Wrzal, P.K., Bettaieb, A. and Averill-Bates, D.A. (2008). Molecular mechanisms of apoptosis activation by heat shock in multidrug-resistant Chinese hamster cells. *Radiation Research*, *170*(4), 498-511.
- Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R. and Schlag, P. (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology*, *3*(8), 487-497.

### Figure legends

#### **Figure 1. Heat shock induces apoptosis: protective effect of thermotolerance (40 °C)**

Activities of caspase-9 (1A) and caspase-3 (1B), and levels of apoptosis (1C) in thermotolerant (3 h at 40 °C) compared to non-thermotolerant (3 h at 37 °C) cells. Means  $\pm$  SEM are from at least three independent experiments. For significant differences between heated (42–43 °C) cells and the non-thermotolerant control (37 °C),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*). For significant differences between thermotolerant and non-thermotolerant cells at each temperature,  $p < 0.05$  (#),  $p < 0.01$  (##),  $p < 0.001$  (###).

#### **Figure 2. Heat shock increases expression of peroxiredoxin antioxidant enzymes.**

Protein expression of Prx2 (2A) in the cytosolic fraction, and Prx3 (2B) and Prx-SO<sub>3</sub> (2C) in mitochondrial fractions following 3 h of heat shock (40–43 °C). Western blots are representative of at least five independent experiments. Means and SEM are shown for densitometric analysis of protein expression, which was normalised to loading controls and is relative to controls at 37 °C (1.0). For significant differences between hyperthermia-treated (40–43 °C) cells and controls (37 °C),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*).

#### **Figure 3. Inhibition of heat shock-induced increases in expression of peroxiredoxins by PEG-catalase and MnTBAP.**

Cells were pretreated with PEG-catalase or MnTBAP and then heated (42 °C) for 3 h. Western blots for protein expression in mitochondrial fractions are representative of at least three independent experiments. Means and SEM are shown for densitometric analysis of proteins Prx<sub>3</sub> (3A) and Prx-SO<sub>3</sub> (3B, 3C). Protein expression was normalised to VDAC loading controls and is relative to non-treated controls at 37 °C

(1.0). For significant differences between heated (42°C) cells and controls (37 °C),  $p < 0.01$  (\*\*). For significant differences between antioxidant treated and non-treated cells at each specific temperature,  $p < 0.001$  (###).

**Figure 4. Mild thermotolerance at 40°C increases intracellular levels of the antioxidant GSH.**

HeLa cells were incubated for 1 h to 3 h at 37 or 40°C and analysed for levels of GSH and GSSG. Data represent means and SEM from at least three independent experiments. For significant differences between thermotolerant (40 °C) cells and controls (37 °C),  $p < 0.05$  (\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*)

**Figure 5. Increases in levels of GLUT1 and G6PD in heated cells.**

Cells were heated for 1 h to 3 h at 40-43 °C. Protein expression of GLUT1 (5A) and G6PD (5B) was normalised to loading controls and is relative to controls at 37 °C (1.0). Western blots are representative of at least three independent experiments. Means and SEM for G6PD (5C) activity and NADPH (5D) levels are from at least 3 independent experiments. For significant differences between hyperthermia-treated cells and controls (37 °C),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*)

**Scheme 1.** Summary of changes to intracellular levels of antioxidant molecules and enzymes caused by 42-43°C hyperthermia (red arrows) and mild thermotolerance induced at 40°C (green arrows) in the cytosol and mitochondria.



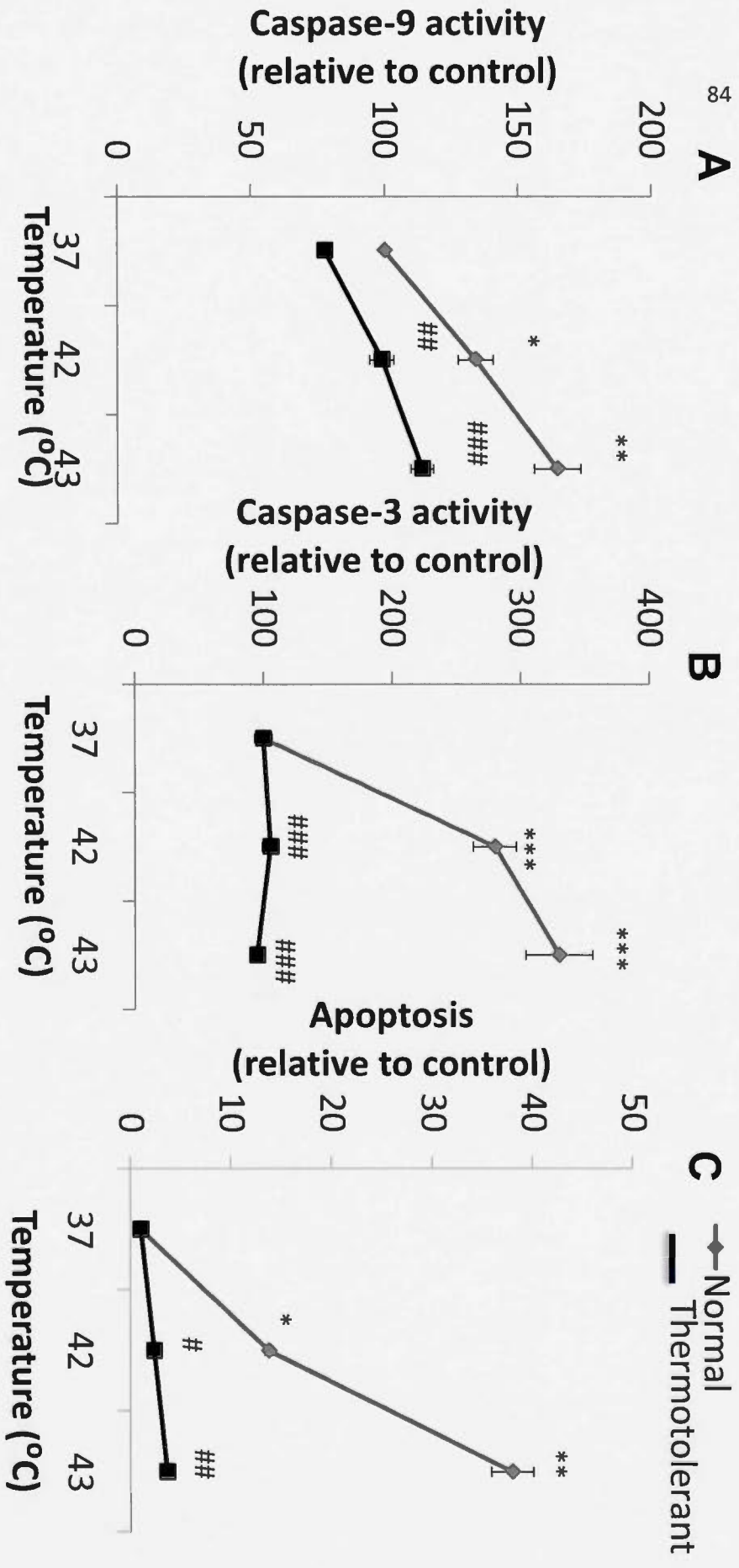
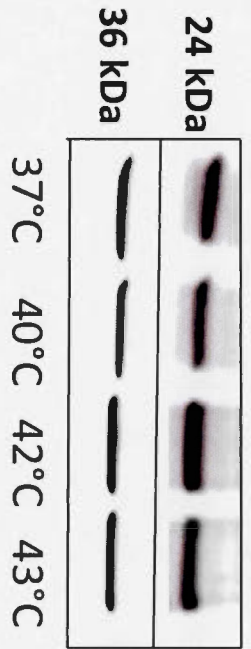
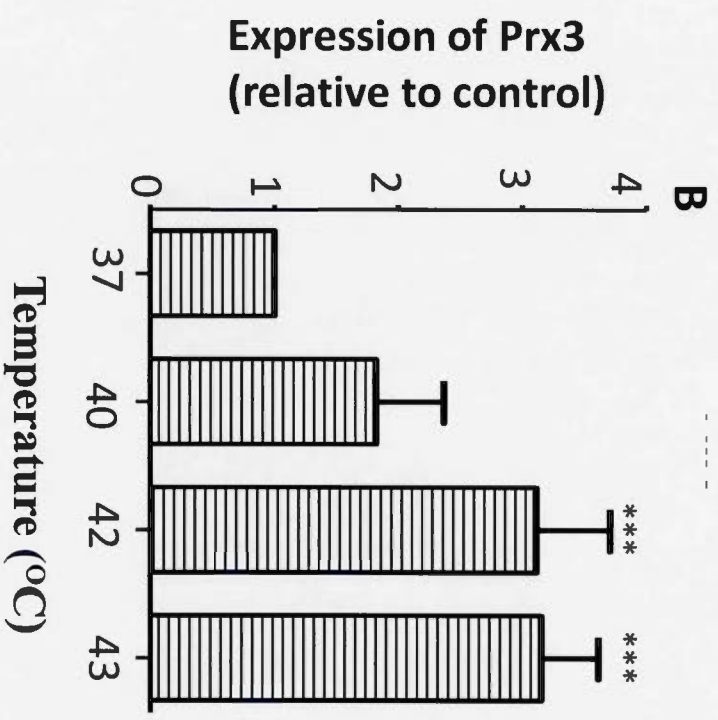
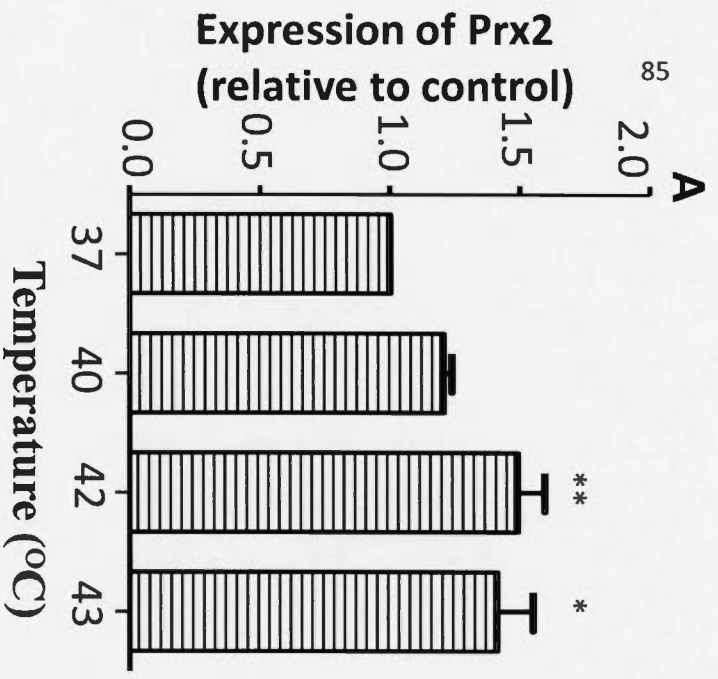
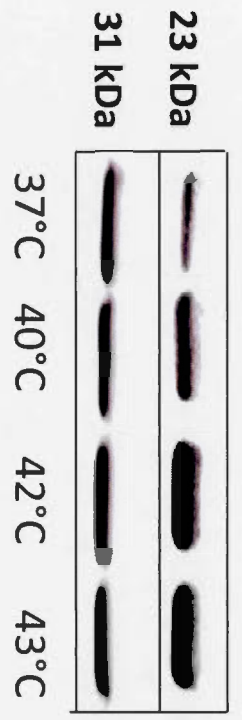


Figure 1. Heat shock induces apoptosis: protective effect of thermotolerance (40 °C)



Prx2  
GAPDH



Prx3  
VDAC

Figure 2. Heat shock increases expression of peroxidoxin antioxidant enzymes

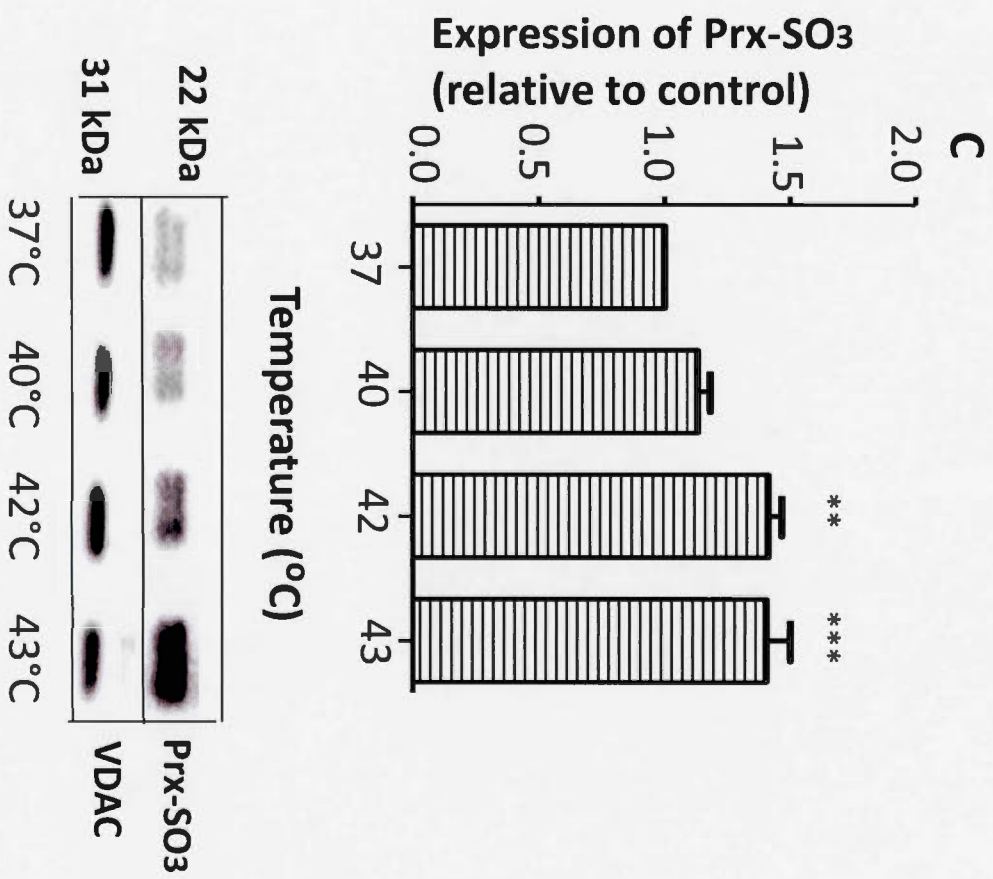


Figure 2. Heat shock increases expression of peroxidoxin antioxidant enzymes

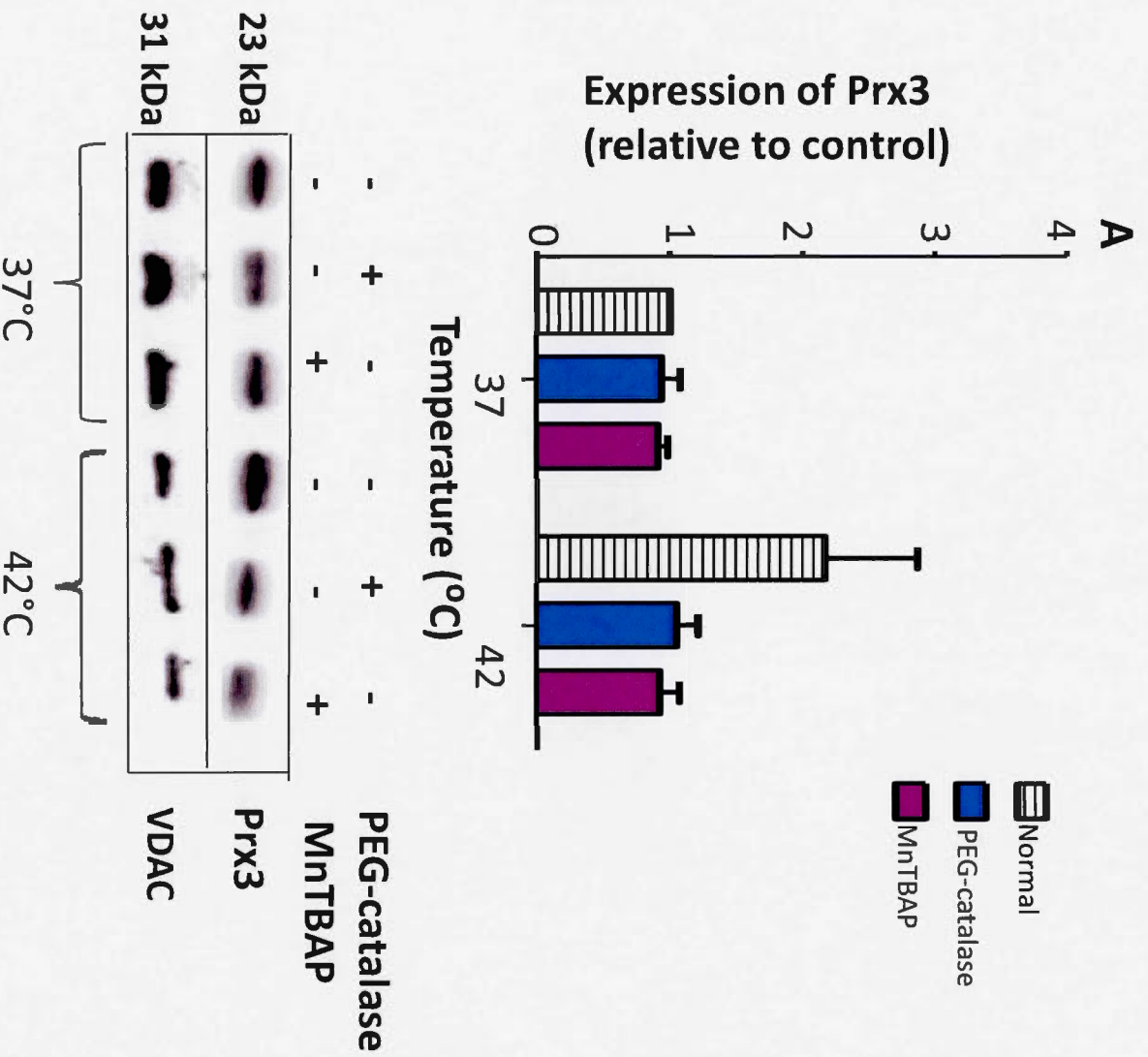


Figure 3. Inhibition of heat shock-induced increases in expression of peroxiredoxins by PEG-catalase and MnTBAP

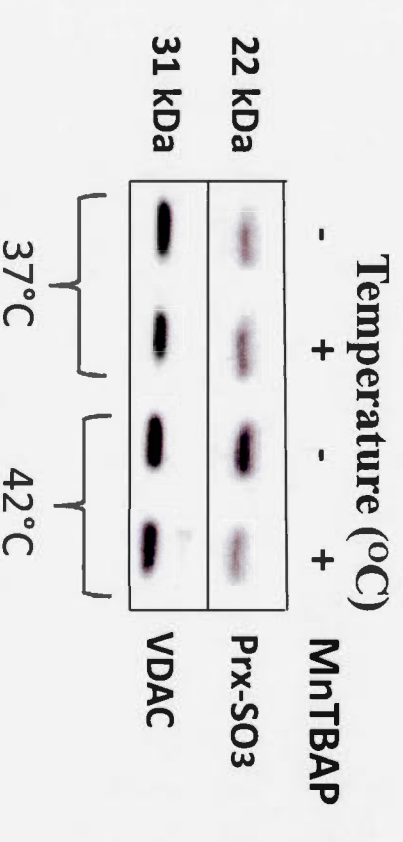
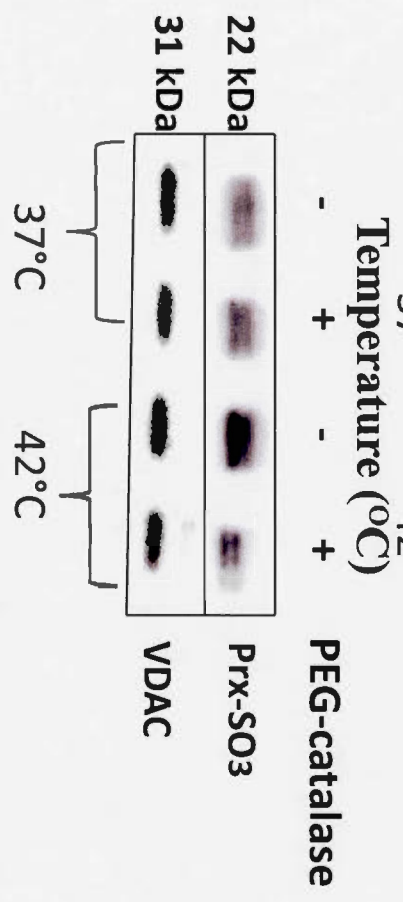
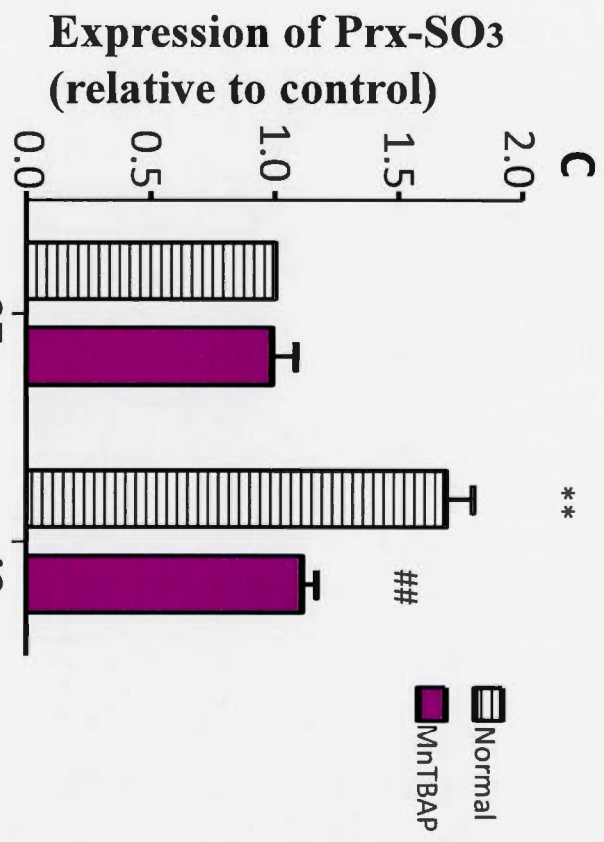
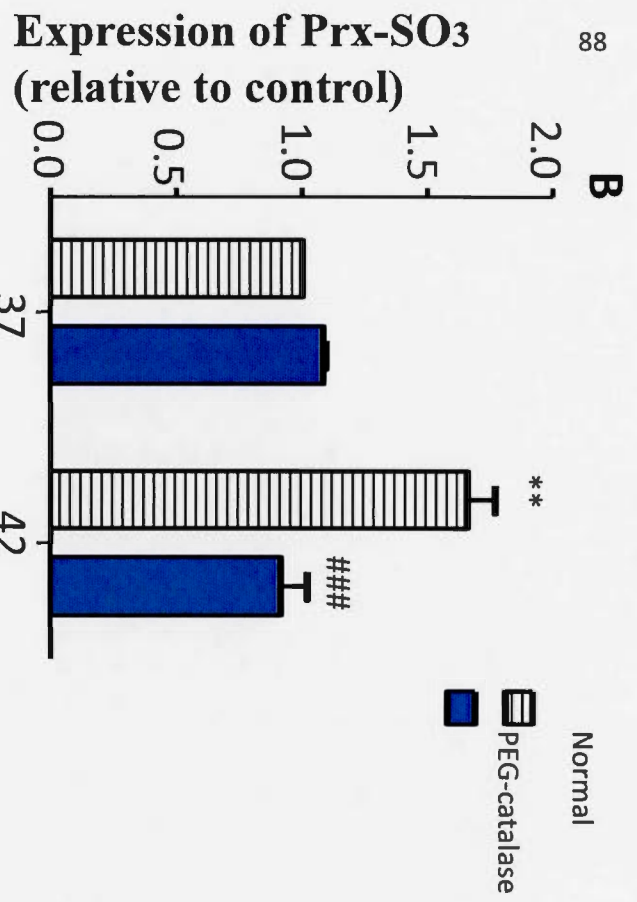


Figure 3. Inhibition of heat shock-induced increases in expression of peroxiredoxins by PEG-catalase and MnTBAP





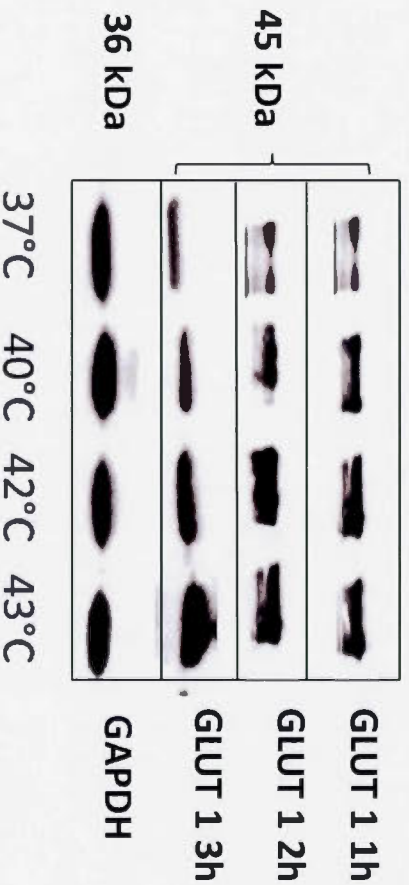
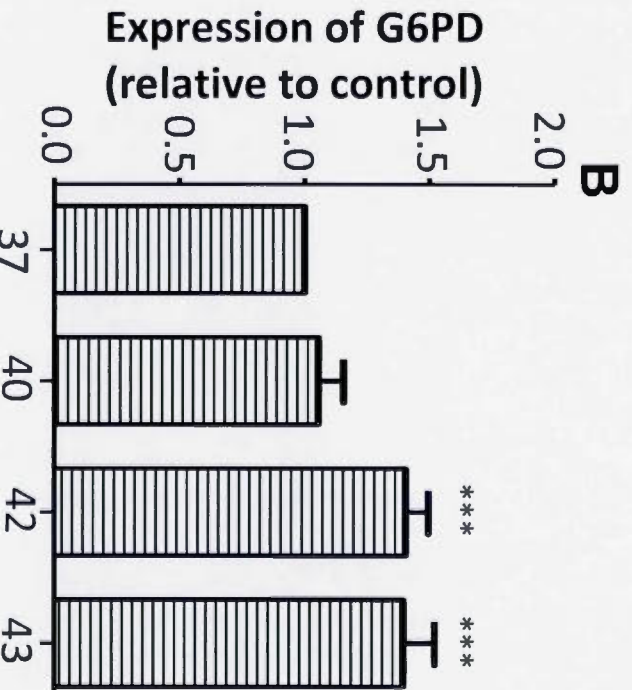
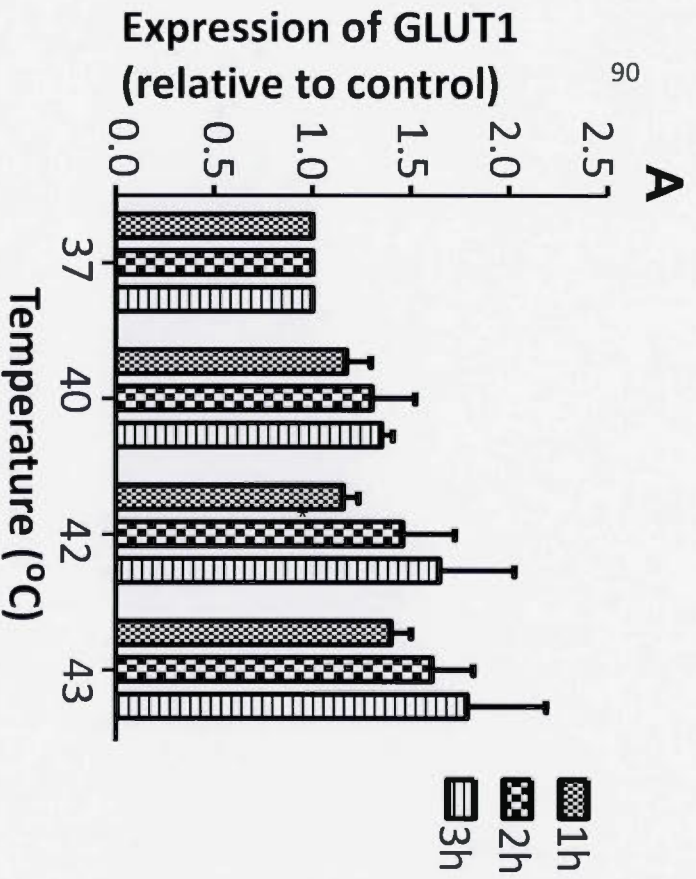


Figure 5. Increases in levels of GLUT1 and G6PD in heated cells

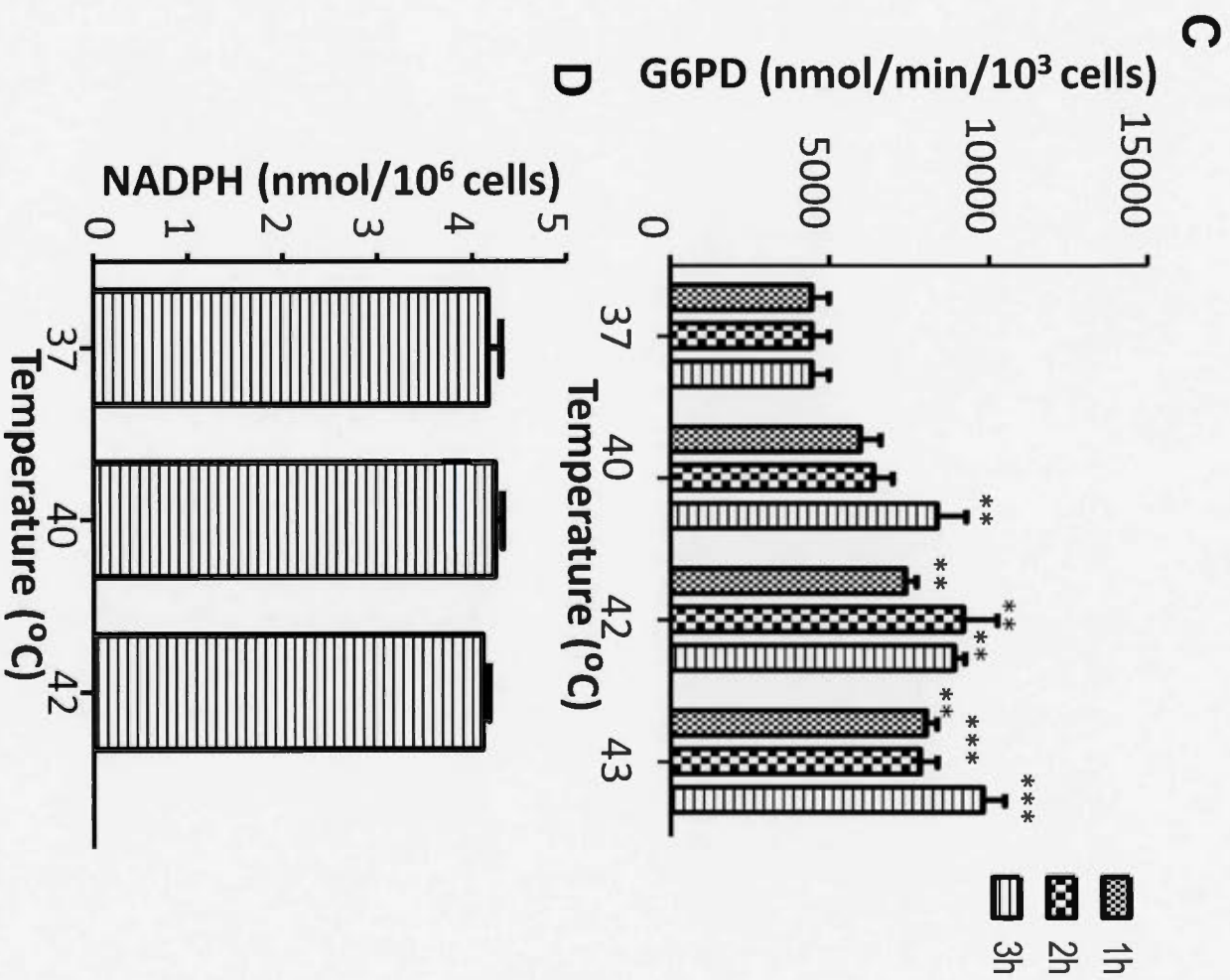
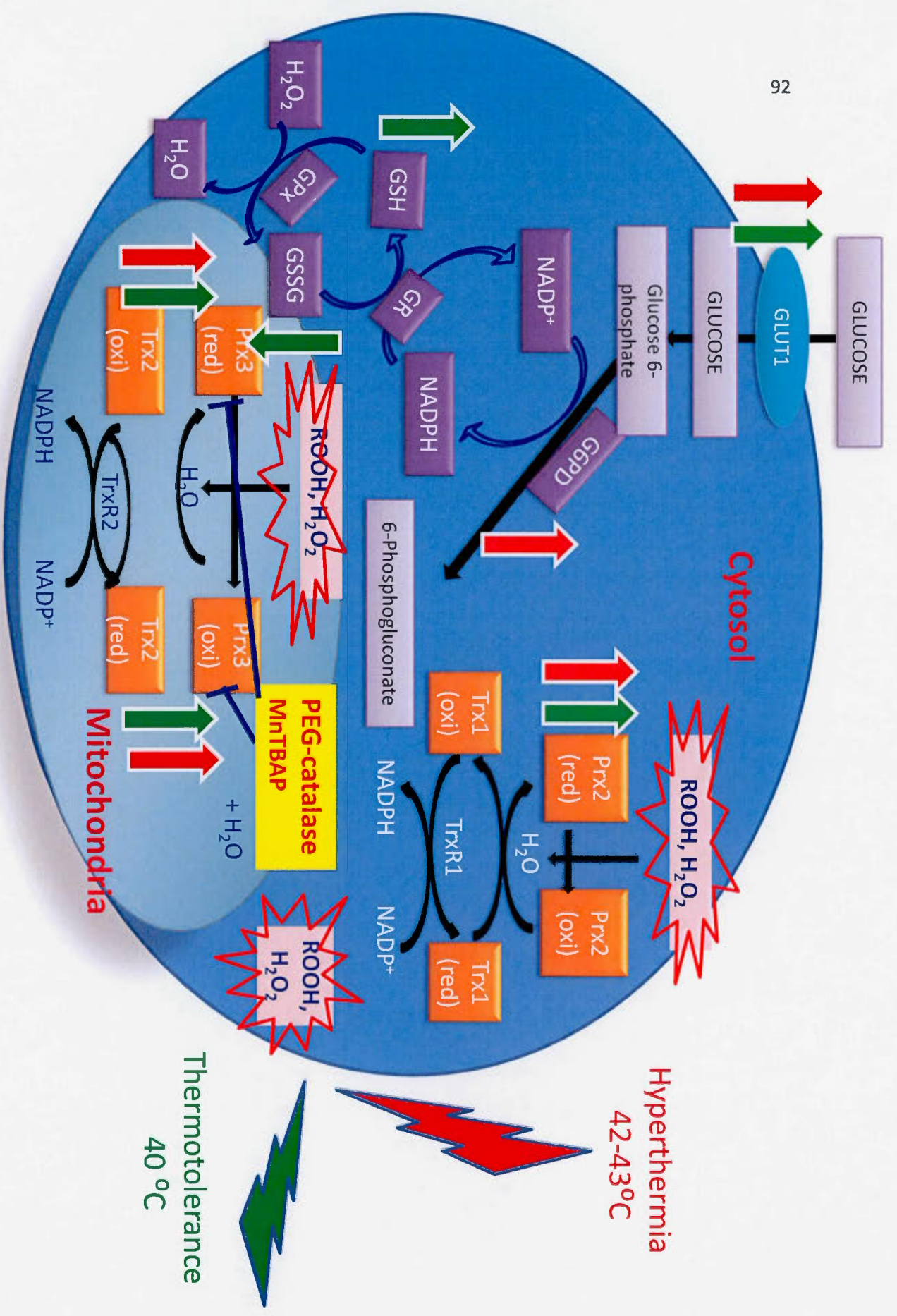


Figure 5. Increases in levels of GLUT1 and G6PD in heated cells



Scheme 1.



## CHAPITRE III

### CONCLUSIONS

Les thérapies anticancéreuses les plus couramment utilisées actuellement sont la chimiothérapie et la radiothérapie. Deux traitements qui sont le plus souvent limités pour le premier par le phénomène de résistance multi-drogues et pour le deuxième par le fait que son action reste localisée dans la zone irradiée. Ensuite nous avons la chirurgie et plus récemment l'immunothérapie. Cette dernière cible le système immunitaire donc, de façon spécifique l'organe qui est en cause. Ceci permet de diminuer les effets secondaires qui pourraient apparaître dues aux complications auto-immunes causées par les médicaments utilisés. Un résultat semblable est obtenu en cas d'utilisation de l'hyperthermie, ce qui en fait un traitement localisé et efficace, à combiner aux traitements classiques déjà existants pour améliorer ces derniers et surtout diminuer les effets secondaires. C'est pourquoi l'hyperthermie est l'un des traitements alternatifs du cancer les plus utilisée en clinique de nos jours (Baronzio *et al.*, 2014; Chicheł *et al.*, 2007; Palazzi *et al.*, 2010). Néanmoins, très peu d'études ont investigué en détail les mécanismes biochimiques et moléculaires de la toxicité du choc thermique et certaines incompréhensions et zones d'ombres dans son fonctionnement sont encore un grand obstacle pour rendre plus efficace son utilisation. Le traitement de plusieurs cancers n'étant pas efficace avec la radiothérapie et la chimiothérapie, l'hyperthermie apparaît comme étant un bon adjuvant qui améliore ces thérapies classiques (Franckena, 2012; Heijkoop *et al.*,

2012; Westermann *et al.*, 2005). Le nombre important de revue et d'article publié cette dernière décennie sur les recherches *in vitro* et *in vivo* sur l'hyperthermie nous pousse à croire que l'hyperthermie fait partie des traitements futur du cancer les plus prometteurs (Twombly, 2010). L'étude de la thermotolérance est aussi très importante car c'est un état de résistance transitoire qui apparait lors du traitement du cancer par les températures douces (39.5- 41.5 °C). Cet état peut être d'un grand handicap dans le traitement du cancer car elle permet l'induction des défenses cellulaire tels que les HSPs et la résistance à un choc thermique subséquent plus fort tels que 42-45 °C. Les régimes de traitement avec l'hyperthermie sont administrés aux intervalles pour éviter la thermotolérance parce que c'est un état transitoire. Ce qui permet d'éliminer cet handicap en clinique lors du traitement par l'hyperthermie. (Bettaieb et Averill-Bates, 2005).

Des études précédentes ont démontrés que l'hyperthermie augmente la génération des EROs dans les cellules HeLa (Bettaieb et Averill-Bates, 2008; Pallepati et Averill-Bates, 2010). Une augmentation des EROs, jusqu'à une certaine dose, peut induire une augmentation des défenses antioxydants dans les cellules. Si la dose des EROs est trop élevée, il y aura plutôt des dommages aux macromolécules et la mort cellulaire. La présente étude montre qu'en état de stress causé par la chaleur à 40 °C et également à 42-43 °C, la cellule répond en augmentant la production d'antioxydants Prx2 et Prx3 pour éliminer ces EROs. Les Prxs sont des protéines très abondantes dans les cellules, et représentent environ 1% des protéines solubles (Cox et al, 2009). Ces protéines sont les plus efficaces parmi les antioxydantes qui éliminent les peroxydes (Poynton et Hampton, 2014). Il a été démontré auparavant que lors d'un choc thermique doux à 40 °C la production des antioxydants tels que la MnSOD, la catalase et le glutathion était augmentée dans les cellules HeLa (Pallepati et Averill-Bates, 2010). Les systèmes de défenses contre les stress oxydatif agissent à presque tous les niveaux dans la cellule, mais les systèmes de défenses antioxydants

mitochondriales semblent jouer un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose (Pallepati et Averill-Bates, 2011).

Les sites de production des EROs causés par le choc thermique n'étant pas connu, la mitochondrie apparaît comme étant le meilleur candidat probable vue qu'elle loge la chaîne respiratoire (Bettaieb *et al.*, 2013). Il a été démontré que la génération des EROs peut être le résultat d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, ou d'activité enzymatique touchant les NADPH oxydases, les lipoxgénases ou les NO synthétases (Rutkowski *et al.*, 2007). L'augmentation de la production d'un antioxydant tel que la Prx3 qui fait partie des antioxydants agissant en première ligne de défense contre le stress oxydatif dans la mitochondrie suite à un choc thermique suggère que la chaleur pourrait augmenter la production des EROs au niveau la mitochondrie. De plus, une inhibition de la production des EROs par la PEG-catalase et le MnTBAP entraîne une diminution de l'expression de Prx3 et de Prx-SO3 déclenché par le choc thermique. Cela confirme le rôle des EROs dans l'induction de Prx3 au niveau de la mitochondrie. Les EROs comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent diffuser de la mitochondrie dans le cytosol, ce qui pourrait expliquer l'induction de Prx2 dans le cytosol par le choc thermique.

D'autre part, le glucose est un facteur très important dans la survie de la cellule. En cas de stress induit par un choc thermique, la cellule a besoin du glucose pour lui fournir de l'énergie et aussi pour maintenir les antioxydants tels que GSH/GSSGet Prxs qui lutte contre les EROs (Moley et Mueckler, 2000). Cette étude rapporte qu'en cas de stress, l'expression du transporteur de glucose GLUT1 augmente pour permettre plus de transport du glucose du sang dans la cellule où il sera métabolisé. La réponse cellulaire au choc thermique dépend de l'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants. Il a été montré qu'une privation en glucose pouvait perturber cet équilibre et induire la mort cellulaire médiée par le stress oxydatif (Lord-Fontaine et Averill-Bates, 2002). Cet effet pourrait être attribuée à deux mécanismes combinés



que sont : l'augmentation de la production de EROs endogènes tels que  $H_2O_2$  et la diminution de la capacité à détoxifier ces espèces toxiques par l'action concertée du cycle glutathion-redox et la voie des pentoses phosphates. Par conséquent, le glucose, par l'activité de la voie des pentoses phosphates et de la régulation indirecte du ratio GSH / GSSG, est important dans le maintien de défenses antioxydantes cellulaires adéquates (Lord-Fontaine et Averill-Bates, 2002).

Notre étude montre aussi qu'on a une augmentation de l'expression et de l'activité du G6PD. Le G6PD est une enzyme qui intervient dans la voie des pentoses phosphates et permet, entre autre, la production du NADPH. Lors du choc thermique, les niveaux de NADPH ont été bien maintenus dans les cellules, ce qui indique que le niveau de métabolisme de glucose par la voie des pentoses phosphate a été suffisant. Le NADPH permet de régénérer le GSH lorsqu'oxydé en GSSG pendant le stress oxydatif (Patra et Hay, 2014). De plus, le NADPH permet de régénérer les formes réduites de Prx3 dans la mitochondrie lorsqu'oxydées, ainsi que le Prx2 dans le cytosol (Kang *et al.*, 2005). L'induction de l'expression de G6PD par le choc thermique pourrait expliquer l'augmentation du niveau de GSH au cours de la thermotolérance douce à 40 °C. Cette augmentation de GSH pourrait contribuer à protéger la cellule contre la perte du potentiel membranaire de la mitochondrie au cours de l'apoptose induit par le stress thermique à 42-45 °C (Ahmed et Averill-Bates, 2005). Nos résultats montrent que la régulation à la hausse des antioxydants à des températures douces comme 40 °C (Pallepati et Averill-Bates, 2010) pourrait constituer un piège pour les EROs mitochondriaux et jouer un rôle important dans la régulation de l'apoptose par le choc thermique (42-43 °C). Ces niveaux plus élevés des antioxydants tels que les Prxs et le GSH pourraient jouer un rôle complémentaire aux HSPs dans l'effet protecteur de la thermotolérance douce à 40 °C contre la cytotoxicité de l'hyperthermie (42-43 °C). De plus, le métabolisme du glutathion peut être modulé par les HSPs (Baerk et al., 2000; Calebrese et al., 2004). Ces derniers à l'instar de la HSP 27, favorisent l'activité des enzymes impliquées dans le

métabolisme du glutathion (Arrigo et al., 2005); entre autres; la glutathion réductase, la glutathion peroxydase et la glutathion transférase, ce qui augmente le rapport GSH/GSSG et réduit le stress oxydatif dans les cellules thermotolérantes (Bettaieb et Averill-Bates, 2005).

Les cellules sont capables de réguler une variété de mécanismes d'adaptation dans une tentative de faire face au stress oxydatif. Les mécanismes de défense cellulaire contre les EROs comprennent des systèmes tampons redox et diverses enzymes antioxydantes. Le système de glutathion (GSSG /GSH) est l'un des couples redox les plus importants dans l'équilibre redox cellulaire (Schafer et Buettner, 2001). Le système de thiorédoxine et les peroxyrédoxines constituent un autre mécanisme puissant par lequel les cellules détoxifient l'effet de certains EROs (Holmgren et Lu, 2010). La mobilisation des systèmes redox-tampon peut être considérée comme la première ligne de l'adaptation cellulaire au stress contre les EROs. La régulation positive de l'expression des enzymes antioxydantes telles que la SOD, la catalase, les peroxydases est un autre mécanisme d'adaptation important, ce qui fournit une protection plus durable contre l'augmentation du stress dû aux EROs. Cependant, ces processus d'adaptations semblent avoir une capacité limitée dans les cellules cancéreuses, qui subissent une forte exposition aux EROs car ces derniers ont tendance à utiliser largement des mécanismes d'adaptations et peuvent épuiser la capacité des antioxydants (Pelicano et al., 2004).

En conclusion cette étude fournit une preuve supplémentaire que le choc thermique augmente le stress oxydatif dans les cellules et permet d'apporter plus de connaissances sur les mécanismes mis en jeu dans l'élimination des EROs en cas de choc thermique par les antioxydants tels que les Prxs, et le glutathion.

### Perspectives futures

On sait que les enzymes de la famille des Prxs agissent grâce à l'action des Trxs qui sont leurs cofacteurs. Il sera donc bénéfique d'étudier de plus près dans le futur les mécanismes complets mis en jeu par cette collaboration pour éliminer les EROs. On sait que, après un certain temps d'exposition à la chaleur (par exemple 3 h pour les Prx2 et Prx3), on a une augmentation de leurs expressions mais qu'en est-il de celle des thiorédoxine 1 et thiorédoxine 2 ainsi que de la thiorédoxine réductase 1 et thiorédoxine réductase 2 leurs cofacteurs respectifs? Est-ce que leurs expressions augmentent avant ou après ou encore en même temps que les Prxs? Cette étude pourra permettre de cerner de façon définitive le rôle de chacun des acteurs et son niveau d'implication dans l'élimination du  $H_2O_2$  aussi bien dans la mitochondrie que dans le cytosol. Aussi afin de compléter nos expériences, on pourrait étudier l'effet de la PEG-catalase et du MnTBAP dans les conditions d'hyperthermie douce et létale sur le GSH et le GSSG. Cela permettrait de vérifier si ces derniers sont aussi bien inhibés que le Prx3 et le Prx-SO<sub>3</sub>. Ainsi on pourra confirmer ou pas le rôle des EROs sur leurs augmentations. Vu que la certitude sur l'origine des EROs produits lors du stress thermique n'est pas encore bien établie, il serait tout à fait judicieux d'étudier leur source de génération intracellulaire afin de déterminer leur implication dans les mécanismes de toxicité du choc thermique.

## REFERENCES

- Arnér, E.S. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(6), 495-526.
- Arrigo, A. P., Viot, S., Chaufour, S., Firdaus, W., Kretz-Remy, C., & Diaz-Latoud, C. (2005). Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(3-4), 414-422.
- Aslan, M. et Özben, T. (2003). Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(6), 781-788.
- Aznavoorian, S., Murphy, A.N., Stetler-Stevenson, W.G. et Liotta, L.A. (1993). Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*, 71(4), 1368-1383.
- Azria, D., Aillères, N., Moscardo, C.L., Hay, M.-H., Dubois, J.-B. et Fenoglio, P. (2009). Radiothérapie de conformation avec modulation d'intensité dans le cancer de prostate: vers un nouveau standard. *Cancer/Radiothérapie*, 13(5), 409-415.
- Baatout, S., Derradji, H., Petitfour, O., Suchodoletz, H.V. et Mergeay, M. (2002). Mécanismes de l'apoptose radio-induite. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(7), 629-637.
- Babincová, M., Kontrišová, K., Durdík, Š., Bergemann, C. et Sourivong, P. (2014). Radiation enhanced efficiency of combined electromagnetic hyperthermia and

chemotherapy of lung carcinoma using cisplatin functionalized magnetic nanoparticles. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(2), 128-131.

Baek, S. H., Min, J. N., Park, E. M., Han, M. Y., Lee, Y. S., Lee, Y. J., & Park, Y. M. (2000). Role of small heat shock protein HSP25 in radioresistance and glutathione-redox cycle. *Journal of Cellular Physiology*, 183(1), 100-107.

Barillot, I. (2009). Les cancers du col utérin: place de la radiothérapie avec modulation d'intensité. *Cancer/Radiothérapie*, 13(6), 507-510.

Baronzio, G., Parmar, G., Ballerini, M., Szasz, A. et Baronzio, M. (2014). A brief overview of hyperthermia in cancer treatment. *Journal of Integrative Oncology*, 3(1), 1-10.

Baronzio, G.F., Gramaglia, A., Baronzio, A. et Freitas, I. (2006). Influence of tumor microenvironment on thermoresponse. In *Hyperthermia in Cancer Treatment: a Primer. Springer Science*. pp. 67-91

Bates, D.A., Le Grimellec, C., Bates, J.H., Loutfi, A. et Mackillop, W.J. (1985). Effects of thermal adaptation at 40 C on membrane viscosity and the sodium-potassium pump in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Research*, 45(10), 4895-4899.

Baurain, J.F., Van der Bruggen, P., Van den Eynde, B.J., Coulie, P.G. et Van Baren, N. (2008). [General principles and first clinical trials of therapeutic vaccines against cancer]. *Bulletin du Cancer*, 95(3), 327-335.

Bergman, P.J. (2009). Cancer immunotherapy. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24(3), 130-136.

Bettaieb, A. (2009). Mécanismes d'induction de l'apoptose par le choc thermique et effet protecteur de la thermotolérance induite à 40° C. Thèse de doctorat Archipel UQAM.

- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2008). Thermotolerance induced at a fever temperature of 40 C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signalling. *Biochemistry and Cell Biology*, 86(6), 521-538.
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2005). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40° C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 205(1), 47-57.
- Bettaieb, A., Wrzal, P.K. et Averill-Bates, D.A. (2013). Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. Chapter 12. In: *Cancer Treatment – Conventional and Innovative Approaches / Book 2*. L. Rangel, Ed. InTech - Open Access Company. pp. 257-283.
- Beutler, E., Kuhl, W. et Gelbart, T. (1985). 6-Phosphogluconolactonase deficiency, a hereditary erythrocyte enzyme deficiency: possible interaction with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(11), 3876-3878.
- Boyle, J.M., Tandberg, D.J., Chino, J.P., D'Amico, T.A., Ready, N.E. et Kelsey, C.R. (2014). Smoking history predicts for increased risk of second primary lung cancer: A comprehensive analysis. *Cancer*. 121(4), 598-604
- Brannon-Peppas, L. et Blanchette, J.O. (2012). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 206-212.
- Cairns, R.A., Harris, I.S. et Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(2), 85-95.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Ravagna, A., Colombrita, C., Spadaro, F., Butterfield, D. A., & Stella, A. G. (2004). Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(4), 325-335.



- Canadian Cancer Society (2014). PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA  
Canadian cancer statistics 2014 *Canadian Cancer Publications*.  
[www.cancer.ca/fr-ca/?region=qc](http://www.cancer.ca/fr-ca/?region=qc).
- Carmody, R.J. et Cotter, T.G. (2001). Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Report*, 6(2), 77-90.
- Castiglioni, A. (1931). Histoire de la Médecine depuis l'antiquité jusqu'à nos jours (trad. J. Bertrand et F. Gidon). 1 vol. *Payot, Paris*.
- Causey, M.W., Steele, S.R., Maykel, J., Champagne, B. et Johnson, E.K. (2012). Surgical therapy for epidermoid carcinoma of the anal canal: an NSQIP assessment of short-term outcomes. *Journal of Surgical Research*, 177(2), 235-240.
- Chae, S.Y., Kim, Y.-s., Park, M.J., Yang, J., Park, H., Namgung, M.-S., Rhim, H. et Lim, H.K. (2014). high-intensity focused ultrasound-induced, localized mild hyperthermia to enhance anti-cancer efficacy of systemic doxorubicin: an experimental study. *ultrasound in medicine & biology*, 40(7), 1554-1563.
- Chicheł, A., Skowronek, J., Kubaszewska, M. et Kanikowski, M. (2007). Hyperthermia—description of a method and a review of clinical applications. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 12(5), 267-275.
- Circu, M.L. et Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6), 749-762.
- Copeland, W.C., Wachsman, J.T., Johnson, F. et Penta, J.S. (2002). Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Investigation*, 20(4), 557-569.
- Copier, J., Dalglish, A., Britten, C., Finke, L., Gaudernack, G., Gnjatic, S., Kallen, K., Kiessling, R., Schuessler-Lenz, M. et Singh, H. (2009). Improving the efficacy of cancer immunotherapy. *European Journal of Cancer*, 45(8), 1424-1431.

- Cox, A., Winterbourn, C. et Hampton, M. (2009). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal*, 425, 313-325.
- DeVita Jr, V.T. et Rosenberg, S.A. (2012). Two hundred years of cancer research. *New England Journal of Medicine*, 366(23), 2207-2214.
- Doll, R., Peto, R., Wheatley, K., Gray, R. et Sutherland, I. (1994). Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *British Medical Journal*, 309(6959), 901-911.
- Earhart, R.H. (1999). Docetaxel (Taxotere): preclinical and general clinical information. *Seminal in Oncology*, 26(5 Suppl 17), 8-13.
- Feng, S.-S. et Chien, S. (2003). Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science*, 58(18), 4087-4114.
- Filosa, S., Fico, A., Paglialunga, F., Balestrieri, M., Crooke, A., Verde, P., Abrescia, P., Bautista, J. et Martini, G. (2003). Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 370, 935-943.
- Fourquet, S., Huang, M.-E., D'Autreaux, B. et Toledano, M.B. (2008). The dual functions of thiol-based peroxidases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1565-1576.
- Franckena, M. (2012). Review of radiotherapy and hyperthermia in primary cervical cancer. *International Journal of Hyperthermia*, 28(6), 543-548.
- Garlatti, M. et Barouki, R. (2002). Le stress du réticulum endoplasmique: adaptation et toxicité. *Le Magazine: Articles de Synthèse*, 18(5), 585-594

- Giansanti, V., Torriglia, A. et Scovassi, A.I. (2011). Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?". *Apoptosis*, 16(4), 321-333.
- Glory, A., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2014). Mild thermotolerance induced at 40° C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins. *International Journal of Hyperthermia*, 30(7), 502-512.
- Golstein, P. (1997). Controlling cell death. *Science*, 275(5303), 1081-1082.
- Gopalakrishna, R. et Jaken, S. (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9), 1349-1361.
- Haddad, J.J. (2004). Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *International Immunopharmacology*, 4(4), 475-493.
- Hajdu, S.I. (2004). Greco-Roman thought about cancer. *Cancer*, 100(10), 2048-2051.
- Hajdu, S.I. (2011). A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117(5), 1097-1102.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G. et Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 319(5868), 1352-1355.
- Halliwell, B. (2002). Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine*, 32(10), 968-974.
- Halliwell, B. et Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed Oxford, Univ. Press. Oxford.
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.-J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W. et Weber, J.S. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *New England Journal of Medicine*, 369(2), 134-144.

- Harding, H.P., Zhang, Y. et Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271-274.
- Heijkoop, S.T., Franckena, M., Thomeer, M.G., Boere, I.A., Van Montfort, C. et Van Doorn, H.C. (2012). Neoadjuvant chemotherapy followed by radiotherapy and concurrent hyperthermia in patients with advanced-stage cervical cancer: A retrospective study. *International Journal of Hyperthermia*, 28(6), 554-561.
- Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R. et Riess, H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 43(1), 33-56.
- Hilf, R., Ickowicz, R., Bartley, J. et Abraham, S. (1975). Multiple molecular forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal, preneoplastic, and neoplastic mammary tissues of mice. *Cancer Research*, 35(8), 2109-2116.
- Holmgren, A. et Lu, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 120-124.
- Horecker, B.L. (2002). The pentose phosphate pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 47965-47971.
- Ismail-zade, R.S., Zhavrid, E.A. et Potapnev, M.P. (2005). Whole body hyperthermia in adjuvant therapy of children with renal cell carcinoma. *Pediatric Blood & Cancer*, 44(7), 679-681.
- Issels, R.D. (2008). Hyperthermia adds to chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 44(17), 2546-2554.
- Jackson, A.L. et Loeb, L.A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477(1), 7-21.

- Kang, S.W., Baines, I.C. et Rhee, S.G. (1998). Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6303-6311.
- Kang, S.W., Rhee, S.G., Chang, T.-S., Jeong, W. et Choi, M.H. (2005). 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine*, 11(12), 571-578.
- Kannan, K. et Jain, S.K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3), 153-163.
- Kapiteijn, E., Marijnen, C.A., Nagtegaal, I.D., Putter, H., Steup, W.H., Wiggers, T., Rutten, H.J., Pahlman, L., Glimelius, B. et van Krieken, J.H.J. (2001). Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 345(9), 638-646.
- Kaur, P., Hurwitz, M.D., Krishnan, S. et Asea, A. (2011). Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer. *Cancers (Basel)*, 3(4), 3799-3823.
- Kehrer, J.P. (2000). Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology*, 62(4), 235-236.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. et Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kim, P.K., Zamora, R., Petrosko, P. et Billiar, T.R. (2001). The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *International Immunopharmacology*, 1(8), 1421-1441.
- Kup, P.G., Nieder, C., Geinitz, H., Henkenberens, C., Besserer, A., Oechsner, M., Schill, S., Mücke, R., Scherer, V. et Combs, S.E. (2015). The prognostic value of irradiated lung volumes on the prediction of intra-/post-operative mortality

in patients after neoadjuvant radiochemotherapy for esophageal cancer. a retrospective multicenter study. *Journal of Cancer*, 6(3), 254-260.

La Vecchia, C., Giordano, S.H., Hortobagyi, G.N. et Chabner, B. (2011). Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *Oncologist*, 16(6), 726-729.

Lartigau, E., Dewas, S. et Gras, L. (2008). L'effet Oxygène, une cible ancienne toujours d'actualité? *Cancer/Radiothérapie*, 12(1), 42-49.

Laurent, T.C., Moore, E.C. et Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, 239(10), 3436-3444.

Liao, Z., Cox, J.D. et Komaki, R. (2007). Radiochemotherapy of esophageal cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2(6), 553-568.

Lillig, C.H. et Holmgren, A. (2007). Thioredoxin and related molecules-from biology to health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(1), 25-47.

Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 75-87.

Lubos, E., Handy, D.E. et Loscalzo, J. (2008). Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Frontiers in bioscience: a Journal and Virtual Library*, 13(1), 5323-5344.

Ludewig, B. et Hoffmann, M.W. (2005). *Adoptive immunotherapy: methods and protocols*. (Vol. 109) : Springer Science & Business Media.

Majno, G. et Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 3-15.



- Maluta, S., Schaffer, M., Pioli, F., Dall'Oglio, S., Pasetto, S., Schaffer, P.M., Weber, B. et Giri, M.G. (2011). Regional hyperthermia combined with chemoradiotherapy in primary or recurrent locally advanced pancreatic cancer. *Strahlentherapie and Oncology*, 187(10), 619-625.
- Man, J., Shoemaker, J.D., Ma, T., Rizzo, A.E., Godley, A.R., Wu, Q., Mohammadi, A.M., Bao, S., Rich, J.N. et Jennifer, S.Y. (2015). Hyperthermia sensitizes glioma stem-like cells to radiation by inhibiting akt signaling. *cancer research*, 75(8), 1760-1769.
- Martindale, J.L. et Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 1-15.
- Mercié, P. et Belloc, F. (2001). Mécanismes physiopathologiques et méthodes d'analyse de l'apoptose cellulaire. *La Revue de Médecine Interne*, 22(1), 90-96.
- Moley, K. et Mueckler, M. (2000). Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis*, 5(2), 99-105.
- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W. et Issels, R.D. (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *International Journal of Cancer*, 61(2), 272-279.
- Onuigbo, W.I. (1962). Historical trends in cancer surgery. *Medical History*, 6(2), 154-161.
- Organisation mondiale de la santé (2012). Statistiques sanitaires mondiale 2012. *OMS, Genève*. [www.who.int/fr/](http://www.who.int/fr/).
- Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(9), 2181-2196.

- Palazzi, M., Maluta, S., Dall'Oglio, S. et Romano, M. (2010). The role of hypothermia in the battle against cancer. *Tumori*, 96(6), 902-10.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D. (2010). Mild thermotolerance induced at 40° C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495(2), 97-111.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D. (2012). Reactive Oxygen Species, Cell Death Signaling and Apoptosis *In: Principles of Free Radical Biomedicine Vol. II. K Pantopoulos and H Schipper, Eds, Nova Sciences Publishers, Hauppauga, New York*, pp 513.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D.A. (2011). Mild thermotolerance induced at 40 C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(6), 667-679.
- Parsonage, D., Youngblood, D.S., Sarma, G.N., Wood, Z.A., Karplus, P.A. et Poole, L.B. (2005). Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry*, 44(31), 10583-10592.
- Pathak, S., Dash, I., Taylor, M. et Poston, G. (2013). The surgical management of neuroendocrine tumour hepatic metastases. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 39(3), 224-228.
- Patra, K.C. et Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(8), 347-354.
- Pelicano, H., Carney, D. et Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2), 97-110.
- Perera, Y., Toro, N.D., Gorovaya, L., Fernandez, D.E.C.J., Farina, H.G. et Perea, S.E. (2014). Synergistic interactions of the anti-casein kinase 2 CIGB-300 peptide and chemotherapeutic agents in lung and cervical preclinical cancer models. *Molecular and Clinical Oncology*, 2(6), 935-944.

- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K. et Defraigne, J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233-239.
- Piton, N. (2014). Place du stress du réticulum endoplasmique et de la réponse aux protéines non repliées dans la carcinogénèse colique. Bibliothèque Universitaire Rouen. [thesemedecine@univ-rouen.fr](mailto:thesemedecine@univ-rouen.fr)
- Poynton, R.A. et Hampton, M.B. (2014). Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 906-912.
- Przybytkowski, E., Bates, J.H., Bates, D.A. et MacKillop, W.J. (1986). Thermal adaptation in CHO cells at 40 C: the influence of growth conditions and the role of heat shock proteins. *Radiation Research*, 107(3), 317-331.
- Ren, Y., Zhang, H., Chen, B., Cheng, J., Cai, X., Liu, R., Xia, G., Wu, W., Wang, S. et Ding, J. (2012). Multifunctional magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles combined with chemotherapy and hyperthermia to overcome multidrug resistance. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2261-2269.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.S., Jeong, W. et Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB life*, 52(1), 35-41.
- Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Aldieri, E. et Ghigo, D. (2012). The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(3), 421-436.
- Rudack, D., Chisholm, E.M. et Holten, D. (1971). Rat liver glucose 6-phosphate dehydrogenase regulation by carbohydrate diet and insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 246(5), 1249-1254.
- Russo, M., Mupo, A., Spagnuolo, C. et Russo, G.L. (2010). Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 80(5), 674-682.

- Rutkowski, M.R., McNamee, L.A. et Harmsen, A.G. (2007). Neutrophils and inducible nitric-oxide synthase are critical for early resistance to the establishment of *Tritrichomonas foetus* infection. *Journal of Parasitology*, 93(3), 562-574.
- Sadat, F., Wienke, A., Dunst, J. et Kuhnt, T. (2012). Survival of patients with head and neck cancer. *Strahlentherapie and Oncology*, 188(1), 62-70.
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1191-1212.
- Schröder, M. et Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1), 29-63.
- Scott, R.S., Johnson, R.J., Story, K.V. et Clay, L. (1984). Local hyperthermia in combination with definitive radiotherapy: Increased tumor clearance, reduced recurrence rate in extended follow-up. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 10(11), 2119-2123.
- Ségal-Bendirdjian, E., Dudognon, C., Mathieu, J., Hillion, J. et Besançon, F. (2005). Les multiples voies de signalisation de la mort cellulaire: avancées récentes et exploitation thérapeutique. *Bulletin du Cancer*, 92(1), 23-35.
- Shaib, Y.H., El-Serag, H.B., Davila, J.A., Morgan, R. et McGlynn, K.A. (2005). Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. *Gastroenterology*, 128(3), 620-626.
- Sharma, P.K., Bhardwaj, R., Dwarakanath, B.S. et Varshney, R. (2010). Metabolic oxidative stress induced by a combination of 2-DG and 6-AN enhances radiation damage selectively in malignant cells via non-coordinated expression of antioxidant enzymes. *Cancer Letters*, 295(2), 154-166.

- Shen, X., Zhang, K. et Kaufman, R.J. (2004). The unfolded protein response—a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28(1), 79-92.
- Shi, H., Sui, Y., Wang, X., Luo, Y. et Ji, L. (2005). Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140(1), 115-121.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.
- Souslova, T. et Averill-Bates, D.A. (2004). Multidrug-resistant HeLa cells overexpressing MRP1 exhibit sensitivity to cell killing by hyperthermia: interactions with etoposide. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 60(5), 1538-1551.
- Stevenson, M.A., Minton, K.W. et Hahn, G.M. (1981). Survival and concanavalin-A-induced capping in CHO fibroblasts after exposure to hyperthermia, ethanol, and X irradiation. *Radiation Research*, 86(3), 467-478.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.-G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C. et Kroemer, G. (1997). The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(1), 25-37.
- Takemoto, M., Kuroda, M., Urano, M., Nishimura, Y., Kawasaki, S., Kato, H., Okumura, Y., Akaki, S., Kanazawa, S. et Asaumi, J. (2003). The effect of various chemotherapeutic agents given with mild hyperthermia on different types of tumours. *International Journal of Hyperthermia*, 19(2), 193-203.
- Tattersall, M.H. (2002). Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. Commentary. *Lancet*, 360(9332), 505-515.

- Taylor, R.C., Cullen, S.P. et Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231-241.
- Thannickal, V.J. et Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.
- Tilly, W., Gellermann, J., Graf, R., Hildebrandt, B., Weissbach, L., Budach, V., Felix, R. et Wust, P. (2005). Regional hyperthermia in conjunction with definitive radiotherapy against recurrent or locally advanced prostate cancer T3 pN0 M0. *Strahlenther Oncology*, 181(1), 35-41.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A. et Atkins, M.B. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2443-2454.
- Turner-Warwick, R. (1959). The lymphatics of the breast. *British Journal of Surgery*, 46(200), 574-582.
- Twombly, R. (2010). International study of hyperthermia spurs hope in U.S. advocates. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(2), 79-81.
- Urano, M. (1999). Invited review: for the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *International Journal of Hyperthermia*, 15(2), 79-107.
- van der Zee, J. (2002). Heating the patient: a promising approach? *Annals of Oncology*, 13(8), 1173-1184.
- Vanneman, M. et Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 237-251.



- Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J.-P., Chartier, Y. et Meyer, Y. (1999). In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19714-19722.
- Vergati, M., Intrivici, C., Huen, N.-Y., Schlom, J. et Tsang, K.Y. (2010). Strategies for cancer vaccine development. *BioMed Research International*, 2010, 1-13.
- Ward, C., Wong, T.H., Murray, J., Rahman, I., Haslett, C., Chilvers, E.R. et Rossi, A.G. (2000). Induction of human neutrophil apoptosis by nitric oxide donors: evidence for a caspase-dependent, cyclic-GMP-independent, mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 59(3), 305-314.
- Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. et Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292(5517), 727-730.
- Weiner, L.M., Dhodapkar, M.V. et Ferrone, S. (2009). Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *The Lancet*, 373(9668), 1033-1040.
- Westermann, A.M., Jones, E.L., Schem, B.C., van der Steen-Banasik, E.M., Koper, P., Mella, O., Uitterhoeve, A.L., de Wit, R., van der Velden, J. et Burger, C. (2005). First results of triple-modality treatment combining radiotherapy, chemotherapy, and hyperthermia for the treatment of patients with Stage IIB, III, and IVA cervical carcinoma. *Cancer*, 104(4), 763-770.
- Wogan, G.N., Hecht, S.S., Felton, J.S., Conney, A.H. et Loeb, L.A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 473-486.
- Wrzal, P.K., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2008). Molecular mechanisms of apoptosis activation by heat shock in multidrug-resistant Chinese hamster cells. *Radiation Research*, 170(4), 498-511

- Wu, Y., Tan, H., Huang, Q., Sun, X., Zhu, X. et Shen, H. (2010). zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNF $\alpha$  mediated by the PKC–MAPKs–AP-1 pathway. *Cell Death & Differentiation*, 18(1), 26-37.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B. et Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2656-2664.
- Yang, K.-S., Kang, S.W., Woo, H.A., Hwang, S.C., Chae, H.Z., Kim, K. et Rhee, S.G. (2002). Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38029-38036.
- Yang, Y., Xing, D., Zhou, F. et Chen, Q. (2010). Mitochondrial autophagy protects against heat shock-induced apoptosis through reducing cytosolic cytochrome c release and downstream caspase-3 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395(2), 190-195.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S. et Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular Cell*, 6(6), 1355-1364.
- Zagar, T.M., Vujaskovic, Z., Formenti, S., Rugo, H., Muggia, F., O'Connor, B., Myerson, R., Stauffer, P., Hsu, I.-C. et Diederich, C. (2014). Two phase I dose-escalation/pharmacokinetics studies of low temperature liposomal doxorubicin (LTLTD) and mild local hyperthermia in heavily pretreated patients with local regionally recurrent breast cancer. *International Journal of Hyperthermia*, 30(5), 285-294.
- Zhang, B et Yue, H. (2012). Thoughts about the origin of cancer. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 11(10), 572-574.
- Zhang, B., Wang, Y. et Su, Y. (2009). Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Letters*, 286(2), 154-160.