



HAL
open science

L'autophagie dépendante du facteur de transcription $\text{NF}\kappa\text{B}$: un mécanisme de réponse à l'hyperthermie et à l'agrégation protéique

Mathieu Nivon

► **To cite this version:**

Mathieu Nivon. L'autophagie dépendante du facteur de transcription $\text{NF}\kappa\text{B}$: un mécanisme de réponse à l'hyperthermie et à l'agrégation protéique. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10166 . tel-00926473

HAL Id: tel-00926473

<https://theses.hal.science/tel-00926473>

Submitted on 9 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 166-2011

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 5 octobre 2011

par M. NIVON Mathieu

**L'autophagie dépendante du facteur de
transcription NFκB : un mécanisme de réponse à
l'hyperthermie et à l'agrégation protéique**

JURY :

M. BOYAULT Cyril
M. CODOGNO Patrice
Mme GIESELER Kathrin
Mme KRETZ Carole
Mme BAUD Véronique
M. IOVANNA Juan

Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Rapporteur
Rapporteur

N° d'ordre : 166-2011

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 5 octobre 2011

par M. NIVON Mathieu

**L'autophagie dépendante du facteur de
transcription NFκB : un mécanisme de réponse à
l'hyperthermie et à l'agrégation protéique**

JURY :

M. BOYAULT Cyril
M. CODOGNO Patrice
Mme GIESELER Kathrin
Mme KRETZ Carole
Mme BAUD Véronique
M. IOVANNA Juan

Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Rapporteur
Rapporteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. A. Bonmartin

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Véronique Baud et Juan Iovanna, rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que Kathrin Gieseler, Cyril Boyault et Patrice Codogno, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

L'ensemble de ce projet découle de l'aide initiale de Patrice Codogno. Merci Patrice de nous avoir ouvert les portes du monde de l'autophagie et de continuer à nous accompagner dans ce monde merveilleux. Je tiens également à remercier Mathias Faure et Cécile Caron qui, chaque année, ont donné leur avis sur l'évolution de mon travail de thèse et ont ainsi contribué à son, évolution de part leurs conseils.

Mes principaux remerciements sont adressés à ma très chère directrice de thèse, Carole.

Que de chemin parcouru, ensemble, depuis mon stage de première année de master... Pourquoi m'as-tu choisi, moi ? Ah oui, car apparemment, j'ai le physique de l'emploi (eh oui, si tu te rappelles bien, tu avais besoin de quelqu'un pour porter les choses lourdes).

Au cours de ces 5 années, côte-à-côte nous avons voyagé, de l'hyperthermie à l'autophagie, de Budapest à Québec...mais également de la déception à la joie. Toujours, tu as été attentive et prévenante. Et pourtant, je t'en ai donné du fil à retordre... des rapports écrits beaucoup trop lentement et trop détaillés, mon infatigable envie de prospecter en dehors de mon fil conducteur ou encore ma réticence aux oraux et mon aversion pour l'anglais... mais tu as toujours été là, souriante, la joie de vivre vissée au corps, en train de me prodiguer corrections, conseils et astuces. Je te remercie aussi de m'avoir laissé m'ouvrir au monde professionnel et associatif.

Je te félicite de réussir à gérer de manière si formidable tes vies professionnelle et personnelle. Sache que pour moi, tu as été la plus formidable directrice de thèse possible.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué au travail présenté dans ce manuscrit : Emma et Michel, nos chers M2 ainsi que Estelle, Maëlynn et enfin Loïc, passés chez nous en M1. Merci Emma pour ton enthousiasme et ta joie de vivre, j'ai adoré travailler en ta compagnie. Merci aussi Michel, ton arrivée a apporté un vent de testostérone nouveau dans le bureau.

Ce travail n'aurait pas été le même sans l'aide plus qu'indispensable de Domi. Merci pour tout. Spécialisée dans la technique de luxe, tu es également extraordinairement gentille

et prévenante. Nos discussions quasi-quotidiennes autour d'un bon café resteront des moments marquants de ma thèse. Profite intensément de ta retraite bien méritée.

Je remercie aussi Patrick pour nos discussions scientifiques et les théories imaginaires élaborées à ces occasions. Je remercie aussi les filles du bureau du chef : Fany, Morgane et Valériya. Je tiens aussi à remercier les membres du bureau 316 dit « bureau d'à côté », Chantal, Benjamin, Lise, Bénédicte, Lydie, Anja, Céline et Maryline, pour l'ambiance animée de ces 5 années passées dans l'équipe. Je remercie aussi l'ensemble des membres du CGphiMC pour toutes ces formidables années passées en leur compagnie.

Merci à l'ensemble de mes amis pour leur compréhension et leur soutien pendant ma thèse. Malgré mes retards accumulés (je finis une manip et j'arrive...) et ma faible disponibilité, ils ont toujours été de précieux soutiens. Merci à Claudine, Géraldine, Florian, Laurent, Lilian et Nicolas qui me suivent depuis le lycée, époque où j'ai trouvé ma voie. Merci aussi à celles et ceux que j'ai rencontrés au long de ma route : Anne, Emilie, Julie, Nadège, Pauline, Jérémy, Fabien et Yongoua. Ils ont tous une part dans la réussite de cette thèse et dans mon évolution personnelle. Un remerciement tout spécial à Anne et Yongoua, mes deux coloc' historiques qui ont plus vécu avec mon fantôme qu'avec moi.

Enfin, je remercie mes parents, mon frère, ma sœur et toute ma famille pour leurs encouragements et leur patience. Malgré quelques incompréhensions, vous êtes restés mes plus fidèles alliés dans cette épreuve.

Mes dernières pensées sont tournées vers celle qui partage ma vie. Laura, je te remercie de tout mon cœur pour ton indéfectible soutien et ton aide précieuse dans la dernière ligne droite...

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
SOMMAIRE.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS	12
RESUME.....	15
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	17
Chapitre 1 : Les facteurs de transcription Rel/NFκB.....	18
I. La famille Rel/NFκB :	19
A. Structure des différents membres :	19
B. Formation des dimères de protéines Rel/NFκB :	20
C. Liaison à l'ADN :	20
II. La famille IκB :	21
A. Les différents membres et leur structure :	21
B. L'inhibition des dimères de protéines Rel/NFκB :	22
1) Rétention cytoplasmique et navette des complexes NFκB/IκB entre cytoplasme et noyau : 23	
2) Inhibition de la liaison à l'ADN de NFκB :	23
III. Les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'activité de NFκB :	24
A. Les voies d'activation :	24
1) Voie « classique » d'activation de NFκB :	24
a) Phosphorylation d'IκB par la kinase IKK :	24
b) Ubiquitination d'IκB :	26
c) Dégradation d'IκB :	26
2) Voies alternatives d'activation de NFκB :	27
B. Les niveaux de régulation de l'activité NFκB :	28
1) Régulation de l'activité IKK :	28
2) Régulation de l'activité transcriptionnelle :	29
IV. Inducteurs, gènes cibles et fonctions des complexes NFκB :	31
A. Inducteurs de NFκB :	31
B. Gènes cibles de NFκB :	31
C. Fonctions de NFκB :	31
1) Inflammation et immunité innée :	31
2) Immunité acquise :	32
3) Apoptose et cancer :	32
4) Régulateur de la réponse au stress :	34
Chapitre 2 : Choc thermique et agrégation protéique.....	35
I. Le choc thermique :	36
A. Le choc thermique affecte l'architecture de la cellule :	36
1) Augmentation de la fluidité membranaire :	36
2) Désorganisation du cytosquelette :	36
3) Déstabilisation de l'architecture nucléaire :	37
4) Dénaturation des protéines :	37
B. Le choc thermique affecte le fonctionnement de la cellule :	38
1) Activation de la réponse au choc thermique :	38
a) La famille HSF :	38
b) Les protéines de choc thermique :	39
(i) Famille Hsp90 :	40
(ii) Famille Hsp70 :	40
(iii) Les chaperonines :	41
(iv) Famille des sHsp :	42

2) Le choc thermique bloque le cycle cellulaire :	42
3) Le choc thermique inhibe l'expression des gènes :	43
4) Voies de transduction du signal mobilisées par le choc thermique :	44
5) Le choc thermique modifie le potentiel d'oxydo-réduction intra-cellulaire :	45
II. L'agrégation protéique :	46
A. Biosynthèse et repliements des protéines :	46
B. L'agrégation protéique : mécanisme général :	46
1) Etape 1 : Conversion de la conformation :	46
a) Conversion naturelle des protéines :	46
b) Conversion liée à la sur-expression de la protéine :	47
c) Conversion suite à des mutations :	47
d) Conversion d'origine post-traductionnelle :	47
e) Conversion suite à l'exposition à des agents mutagènes :	47
2) Etape 2 : Nucléation :	48
3) Etape 3 : Formation de protofibrilles :	48
4) Etape 4 : Condensation :	48
C. L'agrégation des protéines : quelques exemples :	49
1) Agrégations physiologiques voulues :	49
2) Agrégations physiologiques non voulues :	49
a) Oligomères d' α -Synucléine :	50
b) Oligomères d'Huntingtine :	50
c) Oligomères d' α B-Cristalline :	51
III. Réponse cellulaire à l'agrégation protéique, le Contrôle Qualité des Protéines :	52
A. Les chaperons moléculaires :	52
B. Le protéasome :	52
1) La sous-unité catalytique 20S :	53
2) La sous-unité régulatrice 19S :	53
3) L'adressage au protéasome 26S :	54
a) L'ubiquitine :	54
b) Voie classique d'ubiquitination des protéines :	55
C. L'agrésome :	55
1) Formation :	55
2) Composition :	56
Chapitre 3 : L'autophagie	58
I. La microautophagie :	59
II. L'autophagie médiée par les chaperons :	59
III. La macroautophagie :	60
A. Les mécanismes moléculaires de la formation des autophagosomes :	61
1) Le complexe d'initiation :	61
2) Le Pré-autophagosome :	61
a) Le <i>Core Complex</i> :	62
b) Les systèmes de conjugaison Atg12 et LC3 :	63
3) L'expansion des membranes de la vésicule :	64
4) La fermeture des vésicules et le recyclage de la machinerie autophagique :	64
5) Le trafic des vésicules autophagiques au sein de la cellule :	65
6) La fusion aux lysosomes :	65
B. Les autophagies sélectives :	67
1) La mitophagie :	67
2) L'agréphagie :	68
C. La régulation de l'autophagie :	70
1) mTOR :	70
2) Becline-1 :	72
IV. Les rôles physiologiques de l'autophagie :	73
A. L'autophagie basale :	73
B. La carence nutritive :	73
C. L'immunité et l'inflammation :	74
1) L'immunité innée :	74
2) L'immunité adaptative :	74
3) L'inflammation :	75

D. Le développement :	75
E. Le vieillissement :	77
F. Le cancer :	77
G. L'homéostasie cardiaque :	79
H. L'homéostasie du muscle squelettique :	79
I. Les maladies neurodégénératives :	80
RESULTATS	82
Partie 1 : NFκB active l'autophagie après choc thermique	83
Partie 2 : NFκB régule le contrôle qualité des protéines après choc thermique	109
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	151
I. Le traitement hyperthermique active NFκB	152
A. Voies d'activation de NFκB :	152
B. Arrêt de l'activation de NFκB :	153
II. Le traitement hyperthermique induit la mort des cellules déficientes pour NFκB.....	154
III. L'autophagie dépendante de NFκB est impliquée dans la survie des cellules soumises à l'hyperthermie :	155
IV. NFκB intervient dans le contrôle qualité des protéines :	156
A. NFκB intervient-il dans le système de repliement des protéines ?	157
B. NFκB module-t-il les activités du protéasome ?.....	158
C. A quel(s) niveau(x) NFκB régule-t-il l'autophagie ?	159
1) Quelle est l'implication de NFκB dans le contrôle de l'autophagie basale ?	160
2) Quel est le ou les rôle(s) de NFκB dans l'induction de l'autophagie par le stress thermique ?	161
a) Quelle est l'influence de NFκB sur le réseau de microtubules et sur leur centre organisateur ?.....	162
(i) Quelle est l'influence de NFκB sur les microtubules labiles ?.....	162
(ii) Quelle est l'influence de NFκB sur les modifications post-traductionnelles des tubulines ?	163
(iii) Quelle est l'influence de NFκB sur le centre organisateur des microtubules ?	164
b) Quelle est l'influence de NFκB sur les voies de signalisation activant le mécanisme autophagique ?.....	165
V. Que se passe-t-il pour les protéines membranaires ou secrétées qui transitent au niveau du réticulum endoplasmique ? NFκB est-il impliqué dans ce mécanisme ?.....	167
CONCLUSION GENERALE	169
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171
ANNEXE : HspB1 et HspB5 comme cibles thérapeutiques	199

LISTE DES ABREVIATIONS

4E-BP1	: Eukaryotic translation initiation factor <u>4E-binding protein 1</u>
ADN	: <u>A</u> cide <u>D</u> ésoxyribo <u>N</u> ucléique
ADP	: <u>A</u> dénosine <u>D</u> i <u>P</u> hosphate
Alfy	: <u>PI3P-binding</u> <u>A</u> utophagy-like <u>FYVE</u> domain protein
AMP	: <u>A</u> désonine <u>M</u> ono <u>P</u> hosphate
ARN	: <u>A</u> cide <u>R</u> ibo <u>N</u> ucléique
ARNm	: ARN messenger
ATP	: <u>A</u> désonine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate
BAG	: <u>Bcl2-associated</u> <u>A</u> thano <u>G</u> ene
BAR	: <u>Bin-Amphiphysin-Rvs</u> domain
Barkor	: <u>Beclin 1-associated</u> <u>autophagy-related</u> <u>key regulator</u>
BH3	: <u>Bcl-2</u> <u>Homology</u> <u>Domain</u>
CBP	: <u>CREB</u> <u>Binding</u> <u>Proteins</u>
CFTR	: <u>Cystic</u> <u>Fibrosis</u> <u>Transmembrane</u> <u>conductance</u> <u>Regulator</u>
CHIP	: <u>Carboxyl</u> <u>terminus</u> <u>of</u> <u>Hsc70</u> <u>Interacting</u> <u>Protein</u>
CMA	: <u>Chaperone</u> <u>Mediated</u> <u>Autophagy</u>
CMH-I/II	: <u>Complexes</u> <u>Majeurs</u> <u>d'</u> <u>Histocompatibilité</u> <u>de</u> <u>classe</u> <u>I/II</u>
DIF-1	: <u>Differentiation-Inducing</u> <u>Factor 1</u>
DTT	: <u>Di</u> <u>Thio</u> <u>Thréitol</u>
eIF2 α	: <u>eukaryotic</u> <u>Initiation</u> <u>Factor 2α</u>
ERAA	: <u>ER-Associated</u> <u>Autophagy</u>
ERAD	: <u>ER-Associated</u> <u>Degradation</u>
GTP	: <u>Guanosine</u> <u>Tri</u> <u>P</u> hosphate
HDAC	: <u>Histone</u> <u>Déacétylase</u>
HLH	: <u>Helix-Loop-Helix</u>
HSE	: <u>Heat</u> <u>Shock</u> <u>Element</u>
HSF	: <u>Heat</u> <u>Shock</u> <u>Factor</u>
Hsp	: <u>Heat</u> <u>Shock</u> <u>Proteins</u>
HVS	: <u>Herpes</u> <u>Virus</u> <u>Saimiri</u>
IFN γ	: <u>Interféron</u> <u>g</u>
IKK	: <u>IκB</u> <u>kinase</u>
IL	: <u>Inter</u> <u>leukine</u>
I κ B	: <u>Inhibitor</u> <u>of</u> <u>NFκB</u>
KD	: <u>Kinase</u> <u>Domain</u>
KO	: <i>knock out</i>
KSHV	: <u>Kaposi's</u> <u>Sarcoma-associated</u> <u>Herpes</u> <u>Virus</u>
LIR	: <u>LC3-Interacting</u> <u>Region</u>
LMP	: <u>Lysosomal</u> <u>Membrane</u> <u>Protein</u>
LZ	: <u>Leucine</u> <u>Zipper</u>
MAP1LC3	: <u>Microtubule-Associated</u> <u>Protein 1</u> <u>Light</u> <u>Chain 3</u>

MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MTOC	: <i>MicroTubules Organizing Center</i>
mTOR	: <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
mTORC1/2	: <i>mTOR Complex 1/2</i>
NBR1	: <i>Neighbor of BRCA1 gene 1</i>
NES	: <i>Nuclear Export Signal</i>
NFκB	: <i>Nuclear Factor κB</i>
NLS	: <i>Nuclear Localization Signal</i>
p38IP	: <i>p38-Interacting Protein</i>
p70S6Kinase	: <i>70-kDa ribosomal protein S6 kinase</i>
PAS	: <i>Pre-Autophagosome Structure</i>
PB1	: <i>Phox and Bem1p domain</i>
PE	: <i>PhosphatidylEthanolamine</i>
PH-BEACH	: <i>Pleckstrin Homology-Beige and Chediak-Higashi syndrome</i>
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol-(3)-kinase</i>
PIKK	: <i>Phosphatidylinositol Kinase related Kinase</i>
PMN	: <i>Piecemeal Microautophagy of the Nucleus</i>
PQC	: <i>Protein Quality Control</i>
PRR	: <i>Pathogen Recognition Receptors</i>
RE	: <i>Réticulum Endoplasmique</i>
RHD	: <i>Rel Homology Domain</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
Rubicon	: <i>RUN domain Becline-1 interacting and Cystein rich containing protein</i>
SCF	: <i>Skp1/Cullin/Fbox</i>
shARN	: <i>small hairpin ARN</i>
SHP2	: <i>Src-Homology-2 domain containing Phosphatase 2</i>
sHsp	: <i>small Hsp</i>
SOD1	: <i>Superoxyde Dismutase 1</i>
SQSTM1	: <i>p62/Séquestosome-1</i>
TAD	: <i>TransActivation Domain</i>
TBP	: <i>TATA-Binding Protein</i>
TCR	: <i>T Cell Receptor</i>
TFIIB	: <i>Transcription Factor IIB</i>
TLR	: <i>Toll-Like Receptor</i>
TNFRS8	: <i>TNF Receptor Superfamily Member 8</i>
TOR	: <i>Target Of Rapamycin</i>
UBA	: <i>Ubiquitin-Associated domain</i>
UPR	: <i>Unfolded Protein Response</i>
UVRAG	: <i>UV irradiation Resistance-Associated Gene</i>
VDAC1	: <i>Voltage-Dependent Anion Channel 1</i>

RESUME

La réponse au choc thermique est un mécanisme de défense largement décrit au cours duquel l'expression préférentielle des protéines de choc thermique Hsp aide la cellule à récupérer des dommages causés par l'hyperthermie, comme la dénaturation/agrégation des protéines. Une des conséquences du choc thermique mise en évidence au laboratoire, est l'activation du facteur de transcription NFκB. Cette activation a lieu pendant la période de récupération suivant ce stress.

Par comparaison de la réponse au choc thermique de cellules témoins ou déficientes en NFκB, nous avons cherché à étudier les conséquences de l'activation de NFκB par le choc thermique.

Nous avons montré que NFκB active un mécanisme augmentant la survie des cellules soumises à une hyperthermie : l'autophagie. L'absence d'induction de ce mécanisme conduit à la mort par nécrose des cellules déplétées en NFκB. Dans ces cellules, l'induction artificielle de l'autophagie restaure une survie normale au stress thermique. Nous avons montré que les principaux régulateurs de l'autophagie (complexes mTOR et PI3Kinase de Classe III) ne sont pas des cibles modulées par NFκB, en réponse à une hyperthermie. En revanche, l'accumulation de protéines dénaturées voire agrégées est un élément primordial pour l'activation de l'autophagie dépendante de NFκB. En effet dans les cellules déficientes pour NFκB, contrairement aux cellules témoins, l'accumulation de protéines agrégées induite par le traitement hyperthermique, mais aussi par l'expression de formes mutées d'HspB5, n'est pas résorbée ; ceci indique que le contrôle qualité des protéines est altéré dans ces cellules.

Cette altération pourrait provenir d'un défaut de formation du complexe BAG3-HspB8 en absence de NFκB. En effet, nous avons montré que la forte expression des gènes *bag3* et *hspb8*, induite suite au stress thermique, est dépendante de NFκB et que l'accumulation du complexe BAG3-HspB8, observé dans les cellules témoins soumises au choc thermique, est inhibée dans les cellules déficientes pour NFκB.

Nos résultats démontrent que NFκB induit un processus autophagique en réponse à l'agrégation protéique induite par l'hyperthermie. Ce mécanisme, nécessitant la formation du complexe BAG3-HspB8, augmente la survie des cellules probablement par l'élimination des protéines agrégées générées au cours du stress thermique.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les facteurs de transcription Rel/NFκB

Les facteurs de transcription inductibles régulent les réponses cellulaires, ce qui permet une adaptation des organismes à leur environnement. Un des facteurs de transcription considéré comme l'un des éléments clés dans la réponse aux changements environnementaux est NFκB (*Nuclear Factor κB*), un facteur conservé au cours de l'évolution et qui joue un rôle critique dans de nombreux processus biologiques.

Le facteur NFκB a été pour la première fois décrit comme un facteur nucléaire liant l'*enhancer* des immunoglobulines de type kappa des cellules B (Sen & Baltimore 1986). Il a par la suite été démontré que NFκB est un facteur de transcription présent dans la majorité des cellules et induit en réponse à des stimuli très variés.

I. La famille Rel/NFκB :

A. Structure des différents membres :

Chez les mammifères, cette famille comporte cinq gènes différents : *NFκB1*, *NFκB2*, *relA*, *c-rel* et *relB* (Ghosh et al. 1998) qui codent pour sept protéines différentes : p105/p50, p100/p52, RelA (aussi appelé p65, ce qui sera le cas dans ce manuscrit), cRel et RelB ; p50 et p52 correspondent respectivement aux parties N-terminales des protéines p105 et p100 (Figure 1).

Tous les membres de cette famille possèdent un domaine N-terminal extrêmement conservé appelé RHD pour *Rel Homology Domain*. Ce domaine, d'environ 300 acides aminés, est responsable de la liaison à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) des protéines Rel/NFκB, de leur dimérisation, de leur translocation nucléaire ainsi que de leur liaison à une famille de protéines inhibitrices, la famille IκB (Hayden & Ghosh 2004). Ce domaine RHD est composé de deux séries de feuillets β arrangés en domaines de type immunoglobuline (Chen & Ghosh 1999).

Trois membres de la famille (p65, RelB et c-Rel) possèdent également un domaine d'activation transcriptionnelle TAD (*TransActivation Domain*) dans leur partie C-terminale. Ce domaine interagit avec différents composants de la machinerie transcriptionnelle tels que les TBP (*TATA-Binding Proteins*) (Schmitz et al. 1995), le facteur TFIIB (*Transcription Factor IIB*) (Blair et al. 1994) ou encore avec des co-activateurs transcriptionnels tels que p300 ou les CBP (*CREB Binding Proteins*) (Perkins et al. 1997).

Les deux derniers membres de la famille, p50 et p52, sont synthétisés sous la forme de précurseurs (respectivement p105 et p100) contenant un domaine RHD et une extrémité C-terminale à répétitions ankyrine. Seules les formes matures p50 et p52 font strictement partie de la famille Rel/NFκB, leur précurseur respectif, p105 et p100, appartiennent à la famille IκB (Xiao et al. 2001; Hayden & Ghosh 2004).

La détermination du rôle des différents membres a été approchée par des études d'inactivation des gènes concernés. Il en ressort que l'absence de la sous-unité p65 est létale à l'état embryonnaire et induit une dégénérescence massive du foie (Beg et al. 1995). En revanche, les souris déficientes pour l'un des quatre autres membres (p50, p52, c-Rel ou RelB) ne montrent pas de défauts développementaux mais une immunodéficience (Li & Verma 2002). On observe cependant des phénotypes plus sévères lorsque sont cumulées plusieurs inactivations de ces quatre membres, ce qui suggère une redondance fonctionnelle entre les sous-unités de la famille.

B. Formation des dimères de protéines Rel/NFκB :

Tous les membres de la famille Rel/NFκB peuvent former des homo- ou hétérodimères grâce à leur domaine RHD (Saccani et al. 2003). Cette dimérisation est nécessaire pour leur capacité de liaison à l'ADN. Cependant, il existe des spécificités de liaison entre certains membres. Ainsi, RelB ne peut s'associer qu'aux facteurs p50 et p52 alors que p50 peut s'associer à tous les membres de la famille à l'exception de p52 (Israel 1995) ; l'hétérodimère p50-p65 est l'association la plus fréquente dans de nombreux types cellulaires et est le plus souvent désigné sous le terme générique de NFκB.

C. Liaison à l'ADN :

Les protéines Rel/NFκB se lient à l'ADN au niveau de séquences consensus appelées « sites κB » de la forme 5'-GGGRNYYYCC-3' où R est une purine, Y une pyrimidine et N une base quelconque (Chen & Ghosh 1999). Tous les modèles de liaison d'un dimère Rel/NFκB à l'ADN montrent une structure tertiaire en forme de papillon, très différente de celle observée pour d'autres facteurs de transcription. Le domaine RHD contient deux repliements de type immunoglobuline reliés l'un à l'autre par une région flexible. Ces deux structures sont en contact avec l'ADN : les boucles présentes dans le repliement N-terminal

sont responsables principalement de la reconnaissance spécifique de la séquence cible tandis que le repliement C-terminal contient l'interface de dimérisation (Chen & Ghosh 1999).

La liaison à l'ADN induit la transcription des gènes régulés par des *enhancers* κB en facilitant le recrutement de co-activateurs ou en déplaçant des répresseurs. Cependant, cette activation transcriptionnelle ne se produit pas selon le principe du « tout ou rien » mais est finement régulée. Plusieurs niveaux de régulation sont utilisés (Li et al. 1994) : d'une part, la phosphorylation des protéines Rel/NFκB influence leur activité transcriptionnelle, d'autre part, l'activité transcriptionnelle peut être modulée en fonction de la constitution du facteur de transcription. En effet, il existe différents sites κB (variations nucléotidiques) et différents dimères Rel/NFκB qui vont avoir chacun une affinité différente pour les différents sites κB (Chen & Greene 2004). Enfin, des variations dans la séquence des sites κB peuvent provoquer des changements subtils de conformation au niveau des *enhancers* qui auront des répercussions sur le type de dimères pouvant se lier et sur leur affinité de liaison (Chen & Ghosh 1999).

Les capacités transcriptionnelles des membres de la famille Rel/NFκB sont aussi régulées par leur interaction avec les protéines de la famille IκB.

II. La famille IκB :

A. Les différents membres et leur structure :

Dans les cellules au repos, les protéines de la famille Rel/NFκB sont localisées de façon prédominante dans le cytoplasme où elles sont associées à une famille de protéines inhibitrices appelées IκB (*Inhibitor of NFκB*). Cette famille de protéines comporte, chez les mammifères, sept membres (Figure 1) : IκBα, IκBβ, BCL-3, IκBε, IκBγ et les protéines précurseurs p100 et p105 codées par les gènes *NFκB1* et *NFκB2* (Ghosh et al. 1998).

Tous les membres de la famille contiennent 5 à 7 répétitions ankyrine. Le domaine central des protéines IκB est résistant aux protéases et hautement conservé. L'extrémité N-terminale est sensible à la protéolyse ; on y retrouve deux résidus sérines phosphorylables dans un environnement quasi-identique chez IκBα et IκBβ (Thompson et al. 1995). Enfin, le domaine C-terminal est compact, hautement acide et relié au domaine central de la protéine par une région charnière flexible (Jaffray et al. 1995). Ce domaine possède des séquences de type PEST qui permettent d'expliquer la courte demi-vie de la protéine (de 30 min à 1 heure).

Seuls IκBα, IκBβ et IκBε possèdent une région régulatrice N-terminale, indispensable à l'induction de leur dégradation. De plus, IκBβ est le seul membre dont l'expression n'est pas régulée par p50/p65.

Les précurseurs p105 et p100 sont des membres particuliers de la famille puisqu'ils génèrent, par dégradation de leurs domaines contenant des répétitions ankyrine, les membres p50 et p52 de la famille Rel/NFκB. La protéine p105 semble subir une protéolyse constitutive et co-translationnelle, exercée par le protéasome, pour générer la protéine p50 (Lin et al. 1998). Cette protéolyse limitée est dépendante de la présence d'une région riche en glycines entre les acides aminés 376 et 404 et qui sert de signal d'arrêt pour la protéolyse (Orian et al. 1999). A la différence de p105, l'édiction de p100 est inductible et très finement régulé par des étapes de phosphorylation et d'ubiquitination aboutissant à une dégradation par le protéasome. Ces étapes font l'objet d'une voie récemment décrite comme « voie alternative » d'activation de la famille Rel/NFκB (Sun 2011).

B. L'inhibition des dimères de protéines Rel/NFκB :

Des études génétiques ont permis de montrer que la partie N-terminale d'IκB n'était pas indispensable pour sa liaison aux protéines Rel/NFκB ; en revanche, les répétitions ankyrine ainsi que le domaine acide C-terminal le sont. Des études cristallographiques du complexe IκBα/NFκB ont montré que les répétitions ankyrine des membres IκB forment un empilement d'hélices α qui se lie au repliement de type immunoglobuline en C-terminal du domaine RHD (Huxford et al. 1998; Jacobs & Harrison 1998). Il semblerait cependant qu'il existe des différences dans la nature des interactions existant entre IκBα ou IκBβ et les complexes Rel/NFκB, qui permettraient d'expliquer des différences observées dans la régulation de l'activité du facteur de transcription (Ghosh & Karin 2002). Les interactions des membres IκB avec les dimères Rel/NFκB sont à l'origine de deux phénomènes : d'une part la rétention cytoplasmique des membres de la famille Rel/NFκB et d'autre part l'inhibition de leur liaison à l'ADN dans le noyau.

1) *Rétention cytoplasmique et navette des complexes NFκB/IκB entre cytoplasme et noyau :*

Des études cristallographiques ont montré qu'IκBα masque le signal de localisation nucléaire (NLS pour *Nuclear Localization Signal*) de p65 mais que celui de p50 reste accessible (Huxford et al. 1998; Jacobs & Harrison 1998). De plus, un traitement de cellules au repos par la Leptomycine B (inhibiteur du récepteur d'export nucléaire Crmp1) induit une redistribution complète des complexes IκBα/NFκB dans le noyau (Huang et al. 2000). Ces deux expériences suggèrent que les complexes NFκB/IκBα font des allers-retours entre le cytoplasme et le noyau. Cette navette dépend à la fois du NLS accessible de p50 et des séquences d'export nucléaire (NES pour *Nuclear Export Signal*) de p65 et IκBα (Huang et al. 2000; Harhaj & Sun 1999). La localisation cytoplasmique prédominante des complexes NFκB/IκBα ne reflèterait alors que l'équilibre de ce processus dynamique de navette.

Une étude récente montre que dans des cellules cultivées en conditions normales, la déplétion des trois membres IκBα, β et γ ne modifie pas la localisation de NFκB, qui reste en majorité cytoplasmique (Tergaonkar et al. 2005). Ceci suggère que les membres de la famille IκB pourraient ne pas être essentiels pour la rétention cytoplasmique de NFκB, leur rôle primordial étant situé au niveau de l'inhibition de la liaison de NFκB sur l'ADN. D'autres protéines seraient alors impliquées dans cette rétention telles que la Nucling (Liu et al. 2009), PARP1 (Zerfaoui et al. 2010) ou la Gankyrine (Chen et al. 2007).

Bien que la fonction première des membres IκB soit de maintenir les facteurs Rel/NFκB dans le cytoplasme, IκBα semble aussi avoir une fonction dans le noyau.

2) *Inhibition de la liaison à l'ADN de NFκB :*

Différentes études ont montré que, suite à une activation de NFκB, la protéine IκBα nouvellement synthétisée se retrouve dans le noyau et s'associe aux complexes Rel/NFκB liés à l'ADN (Arenzana-Seisdedos et al. 1995). Ceci crée une perturbation de la liaison du complexe à l'ADN et une inhibition de la transcription dépendante de NFκB. De plus, à la suite de cette inhibition de la liaison à l'ADN de NFκB, le complexe NFκB/IκBα est exporté dans le cytoplasme grâce aux séquences NES d'IκBα et de p65 (Arenzana-Seisdedos et al. 1997).

III. Les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'activité de NFκB :

A. Les voies d'activation :

1) *Voie « classique » d'activation de NFκB :*

Pour la plupart des stimuli répertoriés, les voies de transduction du signal, spécifiques de chaque stimulus, débouchent en un point commun central qui est l'activation de la kinase IKK (*IκB kinase*).

a) Phosphorylation d'IκB par la kinase IKK :

La kinase IKK est un complexe hétérogène de haut poids moléculaire (de 100 à 900 kDa) comprenant au moins deux sous-unités catalytiques, IKKα et IKKβ, et une sous-unité régulatrice NEMO aussi appelée IKKγ (Connelly & Marcu 1995; Ghosh & Karin 2002; Rothwarf & Karin 1999).

La kinase IKKα est une kinase à sérine/thréonine de 85 kDa et possédant 52 % d'homologie avec la kinase IKKβ (87 kDa) (Mercurio et al. 1997). Les deux sous-unités possèdent un domaine kinase N-terminal (KD pour *Kinase Domain*), une région *leucine zipper* (LZ) et un motif hélice-boucle-hélice (HLH pour *Helix-Loop-Helix*). La formation d'une kinase IKK active nécessite l'homo- ou l'hétérodimérisation des sous-unités catalytiques par l'intermédiaire de leur motif LZ (Karin & Delhase 2000) ; en effet, des mutations dans ce domaine empêchent la dimérisation des sous-unités catalytiques et abolissent l'activité kinase (Zandi et al. 1997). Cependant, même si les fonctions biochimiques *in vitro* des deux sous-unités semblent similaires, les expériences de génétique indiquent que les kinases IKKα et IKKβ ont des fonctions distinctes *in vivo*. Ainsi, l'inactivation par *knock out* (KO) d'IKKβ induit, de façon identique au KO de p65, une létalité embryonnaire due à une apoptose massive au niveau du foie (Tanaka et al. 1999). Le KO d'IKKα donne des souris où la différenciation kératinocytaire est déficiente mais où l'activation de NFκB en réponse à un certain nombre de stimuli n'est pas altérée (Takeda et al. 1999). La kinase IKKβ semble donc nécessaire au fonctionnement de la voie classique d'activation, tandis que la kinase IKKα intervient majoritairement dans une autre voie de signalisation (voie alternative) que nous détaillerons ultérieurement.

La sous-unité régulatrice NEMO est un membre important du complexe IKK. En effet, des souris KO pour NEMO possèdent un phénotype similaire à celui obtenu pour le KO

d'IKKβ ou de p65 (Rudolph et al. 2000) et des cellules murines dépourvues de NEMO ne montrent pas d'activation de NFκB en réponse à un très grand nombre de stimuli (Yamaoka et al. 1998).

In vitro, NEMO interagit préférentiellement avec IKKβ (Rothwarf et al. 1998). Cependant, *in vivo*, il a été montré que NEMO peut aussi interagir avec IKKα (Li et al. 1999). Différentes études rapportent que NEMO est retrouvé sous la forme de dimères ou de trimères dans le complexe IKK, grâce à son domaine super-enroulé (coiled-coil). La liaison de NEMO à IKKβ est médiée par le domaine N-terminal de la protéine (à l'exception des 100 premiers acides aminés) (Rothwarf et al. 1998). Cependant, l'activation d'IKK par divers stimuli requiert la présence d'une région C-terminale intacte. Comme cette région n'est pas nécessaire à l'association de NEMO à IKKα et IKKβ, la fonction de cette région est sans doute d'attirer des activateurs localisés en amont d'IKK ; les motifs LZ et doigts de zinc localisés dans cette région pourraient être impliqués dans la formation d'une surface d'interaction reconnue par ces activateurs en amont (Karin & Delhase 2000).

D'autres protéines ont été retrouvées dans le complexe IKK. Ainsi, la protéine chaperon Hsp90 est présente constitutivement dans le complexe (Chen et al. 2002a). Elle interagit avec les domaines kinases d'IKKα et β via son co-chaperon Cdc37 et est impliquée dans la gestion de la conformation du complexe IKK (Hinz et al. 2007). L'inhibition de Hsp90 conduit à la dégradation spécifique du complexe IKK par autophagie et à l'inhibition de NFκB (Qing et al. 2006).

La protéine chaperon Hsp70 intervient aussi dans la régulation du complexe IKK. Hsp70 se lie à NEMO au niveau de son domaine « *coiled-coil* » et ainsi bloque sa trimérisation et sa liaison au complexe IKK, ce qui inhibe l'activation de NFκB en réponse au TNFα (Ran et al. 2004). La liaison d'Hsp70 à NEMO est régulée par BAG3, un co-chaperon de la famille BAG dont l'expression est augmentée dans des cellules tumorales humaines d'ostéosarcome et de mélanome. BAG3 prend la place de Hsp70 et permet la formation d'un complexe IKK actif (Ammirante et al. 2010).

Lors de l'activation d'IKK, les deux sous-unités catalytiques sont exclusivement phosphorylées sur des résidus sérine. Le modèle d'activation d'IKK est constitué de 4 étapes (Karin & Delhase 2000) :

(1) Dans les cellules au repos, les sous-unités catalytiques d'IKK (IKKα et IKKβ) sont associées en hétérodimères. La boucle d'activation du domaine kinase KD n'est pas phosphorylée, le motif HLH (activateur intrinsèque de la kinase) interagit avec KD, et les sérines de l'extrémité C-terminale ne sont pas phosphorylées.

(2) Après stimulation, les résidus sérine S177 et S181 présents au niveau du KD de l'une des sous-unités catalytiques sont phosphorylés, ce qui induit la phosphorylation des sites identiques dans la seconde sous-unité par trans-autophosphorylation. La kinase activée phosphoryle alors les sérines S32 et S36 d'IκBα ou S19 et S23 d'IκBβ.

(3) Puis, IKK subit une autophosphorylation progressive de nombreux résidus sérine localisés en position C-terminale du motif HLH. Lorsqu'un nombre suffisant de charges négatives a été accumulé au niveau de la région C-terminale, des répulsions électrostatiques altèrent les interactions entre le domaine HLH et le domaine kinase, conduisant à un état de faible activité.

(4) Ce changement de conformation faciliterait le recrutement d'une phosphatase qui éteindrait l'activité d'IKK en déphosphorylant le domaine kinase.

b) Ubiquitination d'IκB :

L'ubiquitine ligase intervenant dans la reconnaissance d'IκB phosphorylé fait partie de la classe d'enzymes E3 Skp1/Cullin/Fbox (SCF) où la protéine Fbox est la sous-unité variable responsable de la spécificité de substrat (Karin & Ben-Neriah 2000). Par exemple, la protéine Fbox βTrCP (rebaptisée E3RS^{IκB}) se lie directement à la séquence phosphorylée présente sur IκBα (Yaron et al. 1998). Cette reconnaissance conduit à la polyubiquitination des résidus lysine 21 et 22 d'IκBα (Figure 2).

c) Dégradation d'IκB :

IκB polyubiquitiné est ensuite dégradé par le protéasome 26S (Traenckner et al. 1995). Le complexe Rel/NFκB peut alors lier l'ADN au niveau des *enhancers* κB dans le noyau.

Il semble toutefois qu'il existe des différences dans le contrôle temporel de l'activation de NFκB en fonction des sous-unités IκB. Ainsi, IκBα est très rapidement dégradé après stimulation et est responsable, après sa néosynthèse induite par NFκB, d'une

forte régulation négative de l'activation de NFκB ; ceci permet une réponse NFκB courte et oscillante. En revanche, IκBβ et IκBε sont dégradés plus tardivement ; ils diminuent l'oscillation de la réponse et la stabilisent, lors de stimulations plus longues (Hoffmann et al. 2002).

2) *Voies alternatives d'activation de NFκB :*

Une seconde voie d'activation de NFκB a été décrite. Cette voie est strictement dépendante de la kinase IKKα et non d'IKKβ ou de NEMO. Cette voie « alternative » régule la maturation du précurseur p100 et est très importante pour la modulation du taux et de l'activité de l'hétérodimère RelB-p52. A la différence de p65 et/ou de p50, l'hétérodimère RelB-p52 ne s'associe que très faiblement avec les protéines IκB ; il est retenu dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur RelB-p100 (Solan et al. 2002). La maturation du précurseur p100 est inductible et est très étroitement contrôlée par des étapes de phosphorylation et d'ubiquitination. L'étape de phosphorylation fait intervenir la kinase NIK (*NFκB Inducing Kinase*) (Xiao et al. 2001). Cette kinase recrute IKKα au niveau de p100 et l'active par phosphorylation. IKKα induit alors la phosphorylation de p100 au niveau des résidus sérine 99, 108, 115, 123 et 872 (Xiao et al. 2004). Comme pour la voie classique, cette étape de phosphorylation conduit au recrutement de l'ubiquitine ligase E3 SCF et à la polyubiquitination de p100 au niveau du résidu lysine 855. Ceci conduit au clivage de la partie C-terminale du précurseur p100 par le protéasome pour générer la protéine p52 (Cohen et al. 2004). p100 étant majoritairement associé à RelB, l'activation de cette voie alternative conduit à la translocation nucléaire d'hétérodimères RelB-p52.

De plus, il a été montré que d'autres stimuli de NFκB ne suivent pas les voies décrites ici. Ainsi, les radiations par les rayons ultra-violet (Li & Karin 1998) ou des traitements par des analogues d'acides aminés (Kretz-Remy et al. 1998) induisent une dégradation d'IκBα sans étape de phosphorylation préalable, tandis qu'un traitement par le peroxyde d'hydrogène (Takada et al. 2003), le pervanadate (Imbert et al. 1996) ou des conditions d'anoxie (Koong et al. 1994) conduisent à une phosphorylation d'IκB sur des résidus tyrosine, induisant une dissociation du complexe NFκB/IκB. Enfin, l'hyperthermie active NFκB par dissociation du complexe NFκB/IκB sans que la protéine inhibitrice ne soit ubiquitinylée et dégradée (Kretz-Remy et al. 2001).

B. Les niveaux de régulation de l'activité NFκB :

1) *Régulation de l'activité IKK :*

La plupart des stimuli induisant l'activation de NFκB convergent vers l'activation de la kinase IKK. De très nombreuses études ont suggéré l'existence de kinases en amont d'IKK capables de réguler sa phosphorylation et son activité, comme NIK (dans la voie alternative d'activation de NFκB). Par exemple, l'activation de NFκB suite à la fixation d'IL1 ou de TNFα sur leurs récepteurs respectifs est dépendante du complexe TAK1-MEKK3, lequel phosphoryle IKKβ (Di et al. 2008). L'activation des deux kinases requiert deux modifications post-traductionnelles : une polyubiquitination par TRAF6 et Ubc13/Uvel1a de TAK1 qui lui permet de lier le complexe IKK via NEMO (Fan et al. 2010) et une série de phosphorylations entre les deux protéines afin d'induire leur activité kinase (Di et al. 2008). MEKK3 peut toutefois activer IKK de manière indépendante de TAK1. En effet, l'activation de NFκB via le récepteur TLR8 ou via une exposition prolongée à de l'IL1 est médiée par MEKK3 mais ne nécessite pas TAK1 (Yamazaki et al. 2009; Qin et al. 2006). De même, de nombreuses autres kinases (PKCλ, PKCξ, PKCθ, PKR, Cot/Tpl-2 et d'autres) semblent capables d'induire l'activation d'IKK dans certaines conditions particulières (Hayden & Ghosh 2004).

Des études récentes suggèrent que les kinases IKK pourraient également être régulées par l'ubiquitination. NEMO possède un domaine de liaison aux chaînes de polyubiquitines liées par leur lysine 63 permettant son interaction avec d'autres protéines impliquées dans l'activation d'IKK, comme TAK1. La liaison de protéines K63-polyubiquitinées à NEMO ainsi que sa propre ubiquitination sont deux événements requis pour l'activation d'IKK (Tang et al. 2003; Ea et al. 2006; Wu et al. 2006).

La déubiquitination de NEMO est importante pour l'arrêt de l'activation de NFκB. Une absence de déubiquitination induit une activation constitutive de NFκB et conduit à diverses maladies inflammatoires plus ou moins sévères (Smahi et al. 2000; Lee et al. 2000; Zhang et al. 2006) voire une létalité embryonnaire (Oshima et al. 2009). Trois protéines ont été décrites dans la déubiquitination de NEMO : A20 (Mauro et al. 2006), CYLD (Kovalenko et al. 2003) et ABIN-1 (Mauro et al. 2006). De plus, *a20* et *cylid* ont été décrits comme des gènes cibles de NFκB en réponse à un traitement par le TNFα (He et al. 2008; Jono et al. 2004). Cela permet un rétrocontrôle négatif sur l'activation de NFκB.

Enfin, une SUMOylation de NEMO a été rapportée dans le cas d'une activation de NFκB par un stress génotoxique (Mabb et al. 2006). NEMO est SUMOylé dans le noyau ; cette modification entraîne l'activation de NFκB par la phosphorylation de p65 qui induit en retour la survie des cellules grâce à sa fonction anti-apoptotique (Renner et al. 2010).

2) Régulation de l'activité transcriptionnelle :

L'activité des complexes NFκB peut être régulée par des modifications covalentes qui modulent la liaison des dimères à l'ADN, le recrutement de co-activateurs dans la région *enhancer* ou encore l'interaction avec IκB. La cible principale de ces modifications est la protéine RelA qui peut subir des modifications post-traductionnelles de plusieurs types dont phosphorylations et acétylations.

Différentes études rapportent une phosphorylation de p65 ; ainsi la PKA de même que les kinases MSK1/2 induisent la phosphorylation du résidu sérine 276 localisé dans le domaine RHD de p65 (Vermeulen et al. 2003; Mosialos & Gilmore 1993). Lorsque p65 n'est pas phosphorylé, la région C-terminale de la protéine interagit avec le domaine RHD, ce qui empêche la liaison de p65 à l'ADN et son interaction avec le co-activateur p300/CBP et promeut la liaison du co-répresseur HDAC3 (*Histone Déacétylase*) (Zhong et al. 1998; Dong et al. 2008). La phosphorylation de la sérine 276 empêche cette association intramoléculaire entre les domaines N- et C-terminaux de p65 et facilite donc la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle (Zhong et al. 1998). Cette phosphorylation sur la sérine 276 permet aussi le recrutement de la kinase Cdk9 qui induit la transcription des gènes cibles de NFκB en phosphorylant l'ARN-polymérase II (Nowak et al. 2008; Huang et al. 2009).

p65 est aussi l'objet de phosphorylations au niveau de plusieurs résidus sérine dans le domaine TAD. Ainsi, la sérine 529 est phosphorylée par la caséine kinase II (Bird et al. 1997) tandis que la sérine 536 est phosphorylée par IKK, RSK1 ou TBK1 (Chen et al. 2005; Buss et al. 2004; Bohuslav et al. 2004). Ces phosphorylations augmentent l'activité transcriptionnelle de p65 et diminuent l'affinité de p65 pour IκBα, limitant ainsi l'export nucléaire de NFκB par IκBα.

A l'inverse la phosphorylation de certaines sérines est un événement inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de NFκB. Par exemple, en condition normale, GSK3β phosphoryle la sérine 468 de p65 et bloque ainsi l'induction de la transcription des gènes cibles de NFκB (Buss et al. 2004).

Outre la phosphorylation, p65 est aussi modifié *in vivo* par des acétylations. Sept lysines sont susceptibles d'être acétylées, principalement par p300/CBP mais aussi par PCAF pour deux d'entre elles (K122 et K123) (Chen et al. 2001; Chen et al. 2002b; Kiernan et al. 2003). L'acétylation sur la lysine 221 augmente la liaison de p65 à l'ADN et, en combinaison avec l'acétylation du résidu 218, diminue son affinité pour IκBα (Chen et al. 2002b). A l'inverse, l'acétylation de la lysine 310 est nécessaire pour une activité transcriptionnelle complète de p65 car elle permet le recrutement de Cdk9 qui active l'ARN-polymérase II par phosphorylation (Huang et al. 2009).

Ces acétylations sont contrebalancées par des déacétylases telles que HDAC3, qui est la mieux décrite. Sa fixation sur p65 augmente fortement sa liaison à IκBα et donc son expulsion du noyau et la terminaison de la réponse transcriptionnelle (Chen et al. 2001). Deux autres déacétylases, HDAC1 et SIRT1, ont aussi été décrites pour leur déacétylation spécifique du résidu 310 de p65, réduisant ainsi le recrutement de Cdk9 et inhibant la transcription des gènes cibles (Liu et al. 2006; Yeung et al. 2004). Ce mécanisme d'acétylation/déacétylation peut servir de régulateur moléculaire intranucléaire de l'intensité et de la durée de la réponse des complexes NFκB.

D'autres modifications post-traductionnelles (ubiquitination, méthylation) sont susceptibles de moduler l'activité de NFκB (Huang et al. 2010). L'ensemble de ces modifications activatrices ou inhibitrices ajoute un niveau supplémentaire de complexité à la régulation de la famille Rel/NFκB.

Enfin, il a été mis en évidence une régulation de la transcription des gènes possédant des *enhancers* κB qui ne fait pas intervenir NFκB lui-même. Cette régulation est dépendante de la kinase IKKα. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont montré une accumulation d'IKKα au niveau des promoteurs des gènes cibles de NFκB (Anest et al. 2003; Yamamoto et al. 2003). IKKα s'associe alors à p65 ou CBP et induit la phosphorylation des histones H3 qui sont ensuite acétylés par CBP. Il s'en suit des changements de la structure chromatinienne qui facilitent l'accès de la machinerie de transcription à l'ADN.

IV. Inducteurs, gènes cibles et fonctions des complexes NFκB :

A. Inducteurs de NFκB :

Parmi les inducteurs de NFκB sont retrouvés un très grand nombre de bactéries, produits bactériens, virus ou parasites (Table 1). NFκB est aussi activé par de nombreuses cytokines inflammatoires, des médiateurs apoptotiques ou des situations de stress (physiologique, physique, environnemental ou chimique). L'ensemble de ces stimuli indique que NFκB est au cœur des réponses immunitaires et inflammatoires mais également impliqué dans les réponses au stress (Pahl 1999). Il est à noter qu'un grand nombre d'inducteurs de NFκB sont capables de modifier l'état d'oxydo-réduction de la cellule, notamment en augmentant le taux intracellulaire de radicaux libres oxygénés ; ceci suggère aussi une régulation possible de la voie NFκB par le potentiel redox de la cellule.

B. Gènes cibles de NFκB :

Le facteur de transcription NFκB permet de réguler l'expression d'un très grand nombre de gènes (plus de 150) codant pour des cytokines, des récepteurs immuns, des molécules d'adhésion cellulaire, des protéines de phase aiguë, des récepteurs de surface, des régulateurs d'apoptose ou des gènes de réponse au stress (Pahl 1999) (Table 2).

C. Fonctions de NFκB :

1) Inflammation et immunité innée :

NFκB est l'un des plus importants régulateurs de l'expression des gènes codant pour des molécules pro-inflammatoires : cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL1β, IL6, IL8), molécules d'adhésion, métalloprotéinases de la matrice, cyclooxygénase 2 et oxyde nitrique synthase inductible (Baeuerle & Baichwal 1997). De plus, NFκB est très fortement activé dans les sites d'inflammation de nombreuses maladies (Tak & Firestein 2001a). Ainsi, dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, NFκB est sur-exprimé dans la synovie inflammée. On note aussi une très forte activation de NFκB dans les biopsies bronchiques de patients souffrant d'asthme (Baeuerle & Baichwal 1997). Enfin, différents médicaments utilisés pour traiter l'inflammation (tels que l'aspirine ou les corticoïdes) ont pour effet d'inhiber l'activation de NFκB (Karin et al. 2004).

La voie classique d'activation de NFκB est essentielle pour l'immunité innée (Karin et al. 2004; Li & Verma 2002). En effet, une déficience en sous-unité p65 ou IKKβ résulte en une augmentation de la sensibilité aux infections si l'on empêche la létalité embryonnaire associée à cette déficience (Alcamo et al. 2001; Senftleben et al. 2001). L'activation de NFκB est générée par des cytokines pro-inflammatoires (par exemple TNFα, IL1) ou des pathogènes. Les pathogènes font intervenir la voie des récepteurs PRR (*Pathogen Recognition Receptors*), dont les plus connus sont les récepteurs TLR (*Toll-Like Receptor*) (Hayden & Ghosh 2004). Il s'en suit une transcription accrue de gènes codant pour des chémokines, cytokines, molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) ou inhibiteurs d'apoptose qui favorisent le recrutement des cellules immunitaires (macrophages, granulocytes, cellules dendritiques et lymphocytes) sur le lieu de l'infection (Bonizzi & Karin 2004).

2) *Immunité acquise :*

Une fois que les cellules immunitaires combattent l'infection, il y a mise en place d'une réponse immune acquise envers les constituants des pathogènes. Cette réponse nécessite la présentation des antigènes aux cellules T et B au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Or, le maintien et le développement de ces organes est sous la dépendance de la voie alternative d'activation de NFκB (Bonizzi & Karin 2004). Cette voie dépendante de la kinase IKKα, est stimulée par la lymphotoxine β, le ligand CD40 et par le facteur d'activation des cellules B (Bonizzi & Karin 2004; Li & Verma 2002). De plus, cette voie est importante pour la maturation des cellules B ainsi que pour la production d'anticorps de haute affinité.

3) *Apoptose et cancer :*

De nombreuses observations indiquent que NFκB joue également un fort rôle anti-apoptotique ; ainsi, la survie des lymphocytes B périphériques en réponse aux antigènes dépend d'une activation de NFκB médiée par les récepteurs des cellules B (Wu et al. 1996). De même, la létalité embryonnaire de souris KO pour p65 due à une apoptose massive du foie semble indiquer un rôle de NFκB dans la suppression de l'apoptose hépatique (Beg et al. 1995). Des souris exprimant un super-répresseur de NFκB montrent un développement altéré de leurs glandes exocrines dû à une augmentation de l'apoptose (Schmidt-Ullrich et al. 2001).

NFκB inhibe principalement l'apoptose en induisant l'activation transcriptionnelle de gènes anti-apoptotiques tels que *Bcl-2*, *BclXL*, *NR13*, *XIAP*, *CIAP1,2*... (Burstein & Duckett 2003). Cependant, différentes études indiquent d'autres moyens utilisés par NFκB pour augmenter la survie cellulaire. Ainsi il a été montré une augmentation de Mdm2 et une déstabilisation de p53 accompagnée d'une résistance à l'apoptose, après activation de NFκB par un traitement à la doxorubicine (Tergaonkar et al. 2002). Une autre étude a montré la suppression par p65, de l'expression des récepteurs Trail R1 et R2 (Chen et al. 2003).

Dans certains cas, NFκB peut avoir un rôle pro-apoptotique. Ainsi, NFκB contribue à induire l'apoptose des cellules de la microglie en induisant l'expression de neurotoxines (Kucharczak et al. 2003).

Le fait que NFκB soit capable d'augmenter l'expression de gènes anti-apoptotiques en fait un candidat pour être un promoteur de tumeur. Ainsi, des réarrangements, des amplifications ou des mutations faux-sens des sous-unités NFκB ont été détectées dans des cas de tumeurs solides ou hématopoïétiques (Rayet & Gelinas 1999). Cependant, les altérations génétiques de NFκB ou IκB sont des phénomènes peu fréquents comparés aux oncogènes ou suppresseurs de tumeur c-Myc, Ras ou p53. En revanche, une activation aberrante de NFκB ainsi qu'une localisation nucléaire du facteur de transcription sont fréquemment retrouvées dans les cancers. La plupart du temps, ces modifications résultent de défauts dans la voie de régulation de NFκB : transduction du signal constitutive en amont d'IKK, absence de mécanisme de régulation négative ou micro-environnement profitable (par exemple, l'environnement de tumeurs solides est hypoxique et contient des cytokines inflammatoires, deux conditions activatrices de NFκB) (Perkins 2004).

NFκB pourrait stimuler la tumorigenèse par l'induction de gènes anti-apoptotiques (Burstein & Duckett 2003). Mais d'autres phénomènes sont capables de promouvoir la croissance et la survie des tumeurs. Ainsi, NFκB active la cycline D1 (Guttridge et al. 1999) et le promoteur c-Myc (Kim et al. 2000) ; il joue donc un rôle sur la prolifération cellulaire. Mais NFκB régule aussi l'expression de molécules d'adhésion cellulaire, de métalloprotéinases de la matrice, du facteur de croissance vasculaire endothélial et joue donc sur la capacité des tumeurs à envahir d'autres tissus, à former des métastases et à induire la croissance de vaisseaux pour lutter contre l'hypoxie (Baldwin 2001).

4) *Régulateur de la réponse au stress :*

NFκB est activé en réponse à des stress physiques (chocs hémorragiques ou une ischémie/reperfusion) (Pahl 1999), des stress environnementaux (métaux lourds, fumés de cigarette ou drogues thérapeutiques) (Pahl 1999) et d'autres types de stress cellulaires responsables d'une mauvaise conformation des protéines tels que le stress oxydant (Kretz-Remy et al. 1996), une surcharge du réticulum endoplasmique (Pahl & Baeuerle 1997), un traitement par des analogues d'acides aminés (Kretz-Remy et al. 1998) ou encore un stress thermique sont des inducteurs de NFκB (Kretz-Remy et al. 2001).

Ces éléments laissent à penser que NFκB pourrait être un régulateur général de la réponse au stress. NFκB pourrait alors activer la transcription de gènes qui permettraient de diminuer les effets délétères du stress. De plus, il apparaît que de nombreux inducteurs de NFκB sont aussi des inducteurs de la réponse au choc thermique.

Chapitre 2 : Choc thermique et agrégation protéique

I. Le choc thermique :

Le choc thermique ou hyperthermie est l'un des inducteurs du mécanisme de défense cellulaire appelé réponse au choc thermique. Cette réponse est induite quand l'environnement de la cellule devient délétère et altère le repliement des protéines (choc thermique, métaux lourds, stress oxydant, irradiation UV...).

A. Le choc thermique affecte l'architecture de la cellule :

De nombreux processus sont affectés par le choc thermique : parmi ceux-ci, le repliement des protéines, la fluidité membranaire, le cycle cellulaire, l'état d'oxydo-réduction intra-cellulaire ou encore la transcription.

1) Augmentation de la fluidité membranaire :

Les membranes biologiques sont des structures particulièrement sensibles à la température. Leur réponse des membranes cellulaires au choc thermique dépend en grande partie des caractéristiques des lipides qui les constituent. Les mouvements divers des lipides confèrent une certaine fluidité aux membranes qui augmente avec la température. La membrane plasmique semble être la première cible du choc thermique (Bowler 1987), mais des modifications des membranes mitochondriales, du réticulum endoplasmique (RE) puis de l'enveloppe nucléaire sont également observées (Iwagami 1996).

Ces perturbations membranaires ont de nombreuses conséquences au niveau cellulaire dont une augmentation du calcium dans le cytoplasme (issue du RE), une déplétion en ATP et la production de radicaux libres de l'oxygène suite à la perméabilisation des membranes mitochondriales (Park et al. 2005; Kuhl & Rensing 2000).

2) Désorganisation du cytosquelette :

L'hyperthermie provoque des changements d'organisation du cytosquelette dépendant du type cellulaire et de l'intensité du traitement (Coakley 1987) telles qu'une perturbation de la polymérisation des filaments d'actine et de tubuline conduisant à des défauts d'adhésion cellulaire (Huang et al. 1999) ou une destruction des centrosomes conduisant à une organisation incorrecte des microtubules (Nakahata et al. 2002). Suite à l'arrêt du traitement

hyperthermique, le cytosquelette est remis en place en 24h, le collapse observé initialement étant résolu (Grzanka et al. 2008).

3) *Déstabilisation de l'architecture nucléaire :*

Les premiers travaux de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence des changements dans la structure nucléaire de cellules HeLa dans des conditions de stress thermique (Heine et al. 1971). En effet, la matrice nucléaire est une structure thermolabile qui présente une forte agrégation protéique suite à une hyperthermie (Lepock et al. 2001). Les deux protéines de choc thermique Hsp70 et Hsp27 migrent alors dans le noyau et se lient à la matrice nucléaire où elles peuvent jouer un rôle structural (Pouchelet et al. 1983; Kampinga et al. 2004; Roti Roti et al. 1998).

4) *Dénaturation des protéines :*

De nombreux travaux rapportent une inactivation et une insolubilisation des protéines cellulaires suite à un choc thermique (Pinto et al. 1991). Ces études ont permis de montrer qu'un prétraitement des cellules par l'oxyde de deutérium ou le glycérol, deux composés stabilisateurs de la structure des protéines, conduit à une diminution de l'inactivation ou de l'insolubilisation de ces protéines (Edington et al. 1989). Ces résultats indiquent donc que le choc thermique provoque une dénaturation des protéines.

Dans les cellules, les polypeptides en cours de formation sont plus sensibles au choc thermique que les protéines déjà conformées, qui sont plus stables (Baler et al. 1992). Le choc thermique déstabilise les protéines de telle sorte que les zones hydrophobes, enfouies au sein de la macromolécule dans les conditions physiologiques normales, soient exposées à leur surface. Ces zones hydrophobes interagissent entre elles et génèrent ainsi des agrégats résistants à la protéolyse appelés lipofuscine (Burgman & Konings 1992). Ces agrégats sont le plus souvent délétères pour la cellule.

L'altération des protéines à l'issue d'un choc thermique est probablement l'événement majeur qui pourrait expliquer la diversité des effets d'un choc thermique tels que l'altération de la morphologie et de l'adhésion cellulaire, l'inhibition de la prolifération cellulaire, la modification du patron d'expression génique ou encore la mise en route de certaines voies de signalisation (Kampinga 1993).

B. Le choc thermique affecte le fonctionnement de la cellule :

1) *Activation de la réponse au choc thermique :*

La réponse à une élévation de température est universelle et très conservée dans des organismes aussi divers que les bactéries, les animaux ou les plantes : il s'agit de la réponse au choc thermique (Lindquist 1986).

En 1962, Ritossa a pu observer chez des drosophiles ayant été soumises à une augmentation de température, un renflement spécifique (« *puffing* ») au niveau des chromosomes polytènes des glandes salivaires (Ritossa 1996). Par la suite, différents travaux ont pu montrer que ces renflements correspondaient à l'expression de gènes particuliers : les gènes de choc thermique codant les protéines de choc thermique (Hsp pour *Heat Shock Proteins*) et que ce phénomène existe chez tous les organismes, des archéobactéries à l'Homme (Nover & Scharf 1997).

L'expression inductible des Hsp est régulée par la famille des facteurs de transcription de choc thermique HSF (*Heat Shock Factor*) (Pirkkala et al. 2001; Morimoto 1998).

a) La famille HSF :

En réponse à différents stress, les HSF acquièrent une capacité de liaison à l'ADN et se lient au niveau de séquences HSE (*Heat Shock Element*) sur les promoteurs des gènes de choc thermique, ce qui permet leur transcription et donc l'accumulation des Hsp (Fernandes et al. 1994). Parmi les quatre facteurs de transcription HSF, le facteur HSF1 joue le rôle le plus central dans la réponse au choc thermique. Dans les cellules non stressées, HSF1 existe sous forme de monomères inertes cytoplasmiques ou nucléaires, dont la liaison à l'ADN est inhibée à la fois par des interactions intramoléculaires, par une phosphorylation constitutive sur certains résidus sérine et par l'interaction avec les molécules chaperons Hsp70 et Hsp90.

A la suite d'un stress, l'apparition de protéines mal conformées dans la cellule nécessite l'intervention de chaperons pour leur reconformation (Hsp70, Hsp90 et Hdj-1). Les chaperons se détachent alors d'HSF1 et le facteur de transcription se trimérise. Puis, HSF1 subit une hyperphosphorylation et se lie à l'ADN, ce qui induit la transcription des gènes de choc thermique (Pockley 2001). L'arrêt de la transcription se fait par une régulation négative de l'activité transcriptionnelle grâce à la protéine HSBP1. Puis, la protéine Hsp70 et son co-

chaperon Hdj-1 se lie à HSF ; il y a alors dissociation des trimères HSF et donc répression de la transcription des gènes codant les protéines Hsp (Satyal et al. 1998).

b) Les protéines de choc thermique :

Les Hsp sont présentes à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes. Ce fort degré de conservation suggère qu'elles jouent un rôle primordial dans les processus cellulaires fondamentaux.

Des manipulations génétiques de l'expression des Hsp au sein des cellules ont démontré le rôle protecteur de ces protéines contre la cytotoxicité induite par différents stress (De Maio 1999). *In vivo*, les Hsp agissent en reconformant les protéines dont la structure a été altérée et/ou en stimulant les voies de dégradation protéique si l'altération est trop importante. Elles permettent donc à la cellule d'éliminer les protéines mal conformées ou aberrantes générées par le stress, en jouant le rôle de chaperons moléculaires. Elles aident au repliement et à l'assemblage des polypeptides dans des structures oligomériques et préviennent la formation de structures protéiques incorrectes résultant de l'exposition transitoire de surfaces protéiques hydrophobes ou chargées qui sont normalement impliquées dans des interactions entre chaînes polypeptidiques (Arrigo 2005). L'augmentation du taux des Hsp n'est pas restreinte à la période de stress mais peut durer plusieurs heures, voire plusieurs jours, après le stress, générant ainsi un état de tolérance au stress. Dans le cas d'un choc thermique, on parle de thermotolérance (Mizzen & Welch 1988). Bien que partageant des propriétés communes, chaque famille de Hsp présente des particularités concernant son mécanisme d'action, sa dépendance à l'ATP ou sa localisation cellulaire.

Les protéines chaperons peuvent être classées en deux catégories selon leur activité : les holdases et les foldases. Les premières stabilisent la conformation non-natives des polypeptides afin d'éviter les interactions protéiques et leur agrégation alors que les secondes assistent le repliement des polypeptides. Cette catégorisation provient également du mode d'action de ces protéines : les holdases sont ATP-indépendantes alors que l'action des foldases est dépendante de l'hydrolyse d'ATP (Saibil 2008). Les foldases peuvent être trouvées libres ou associées aux ribosomes. Ces dernières interagissent avec les ribosomes et les polypeptides en cours de synthèse, guidant ainsi les étapes initiales du repliement. Les étapes suivantes sont gérées par les foldases libres qui n'interagissent qu'avec le polypeptide,

pendant et après sa synthèse, tant que la conformation native n'est pas atteinte (Kramer et al. 2009; Hartl & Hayer-Hartl 2009).

Les Hsp sont classées en sous-familles en fonction de leur masse moléculaire (Table 3) : chez les mammifères, les sous-familles majeures sont Hsp90, Hsp70, Hsp60 et les petites Hsp (sHsp pour *Small Hsp*) (Nover & Scharf 1997).

(i) *Famille Hsp90* :

La famille Hsp90 est constituée de protéines liant l'ATP et possédant une activité d'autophosphorylation. Les membres les plus étudiés sont Hsp90 α , Hsp90 β et Grp94. Cette dernière est exclusivement retrouvée dans le réticulum endoplasmique (Gupta 1995) alors que les deux premières sont majoritairement cytoplasmiques avec une petite fraction nucléaire (Pearl & Prodromou 2000). Les Hsp90 sont caractérisées par un fort niveau d'expression même en absence de stress. Elles sont impliquées dans le transport cytoplasmique de précurseurs protéiques ou de récepteurs hormonaux et dans certains aspects de la transduction des signaux (Picard 2002).

Les chaperons moléculaires Hsp90 maintiennent les protéines dans une conformation favorable au repliement par un mécanisme dépendant de l'ATP (Wiech et al. 1992). En revanche, elles n'assurent pas elles-mêmes le repliement mais s'associent avec d'autres protéines, comme Hsp70, afin de permettre le repliement des protéines dénaturées. Il a été montré chez la drosophile qu'Hsp90 peut rétablir la conformation native auprès de nombreuses protéines mutées, permettant ainsi le maintien d'un phénotype sauvage (Rutherford & Lindquist 1998).

(ii) *Famille Hsp70* :

Les protéines de la famille Hsp70 représentent certainement les Hsp les plus conservées et les plus étudiées. Elles possèdent une structure commune comprenant un domaine N-terminal à activité ATPase et un domaine C-terminal de liaison aux peptides. L'ensemble des membres de la famille partage la fonction de chaperon moléculaire dépendant de l'ATP. La liaison transitoire d'une protéine immature ou dénaturée à une protéine de cette famille stimule l'hydrolyse de l'ATP en ADP entraînant ainsi un changement de conformation du chaperon, ce qui augmente son affinité pour la protéine (Mayer & Bukau 2005). Cette

liaison empêche la perte de fonction, la mauvaise interaction ou encore l'agrégation de cette protéine. Celle-ci est ensuite relâchée lors de l'échange de l'ADP contre un ATP (McCarty et al. 1995). Des co-chaperons tels que GrpE ou Hsp40 sont associés aux protéines de la famille Hsp70 et interviennent dans son activité de reconformation (Karzai & McMacken 1996; Laufen et al. 1999; Liberek et al. 1991).

Les différents membres de la famille Hsp70 peuvent être scindés en deux sous-catégories : les constitutifs, comme Hsc70 ou Grp78, et les inductibles tel que Hsp70. Cette dernière participe majoritairement au phénomène de thermotolérance et est nécessaire au maintien des fonctions cellulaires et à la survie lors de l'exposition à des stress physiques ou chimiques, à la fois par son activité chaperon et par son rôle d'inhibition de l'apoptose (Jaattela et al. 1998).

(iii) Les chaperonines :

Les chaperonines Hsp60 et Hsp10 ont d'abord été identifiées chez *E. coli* et nommées respectivement GroEL et GroES. Elles sont nécessaires à la croissance et à la morphogénèse de la bactérie (Georgopoulos & Hohn 1978). Hsp60 et Hsp10 sont exprimées dans le cytosol puis subissent une translocation vers la mitochondrie. Elles forment alors un complexe impliqué dans le transport des protéines mitochondriales codées dans le noyau. A l'intérieur de la mitochondrie, le repliement des protéines est sous le contrôle d'un homologue mitochondrial d'Hsp70 (Hsp70m) et du complexe Hsp60/Hsp10 (Nover & Scharf 1997).

Hsp60 est composé de deux bagues heptamériques formant un cylindre à activité ATPase, qui catalyse l'assemblage de complexes oligomériques et aide au repliement de protéines monomériques (Sigler et al. 1998). Afin de faciliter la liaison des protéines naissantes ou dénaturées, la face interne du cylindre possède des régions hydrophobes.

Hsp10 est associée à Hsp60 via un mécanisme dépendant de l'ATP ; elle est considérée comme un co-chaperon d'Hsp60. Elle forme un complexe heptamérique qui ferme le cylindre, lorsque la protéine à conformer est à l'intérieur, afin de l'isoler du reste de la cellule (Mayhew et al. 1996).

(iv) Famille des sHsp :

Les membres de la famille des petites protéines de choc thermique (sHsp), dont le membre le plus étudié est Hsp27, ont la particularité d'être aussi exprimés en absence de stress, au cours du développement ou lors d'événements précoces de différenciation cellulaire (Arrigo & Ducasse 2002; Chaufour et al. 1996). Toutes les sHsp sont caractérisées par la présence d'un domaine α -cristalline hautement conservé d'environ 80 acides aminés (Figure 3). Les petites Hsp ne semblent pas posséder d'activité de renaturation mais une fonction *holdase* permettant la formation de réservoirs d'intermédiaires de repliement (Ehrnsperger et al. 1999). Les protéines de ces réservoirs sont ensuite prises en charge par les *foldases* afin d'être reconformées (Ehrnsperger et al. 1997) ou dirigées vers le système ubiquitine-protéasome pour être dégradées (McDonough & Patterson 2003).

Outre leur fonction de chaperon moléculaire, les sHsp agissent comme modulateurs de la réponse apoptotique. Ainsi, Hsp27 agit négativement sur l'apoptose en interagissant avec le cytochrome c relargué des mitochondries, ce qui empêche la formation de l'apoptosome (Paul et al. 2002). De plus, Hsp27 agit en amont de la mitochondrie et bloque certaines des voies de transduction qui convergent vers la protéine Bid (Paul et al. 2002).

Certaines protéines de cette famille sont aussi impliquées dans l'induction du processus autophagique et permettent la dégradation des protéines mal-conformées, principalement lorsqu'elles sont agrégées. Cette fonction est principalement médiée par HspB8 et son partenaire BAG3, un co-chaperon d'Hsp70 (Carra et al. 2008b).

De part ces fonctions, les sHsp sont considérées comme des protéines clés dans la lutte contre plusieurs pathologies telles que certaines maladies dégénératives ou certains cancers. Ainsi, ces sHsp pourraient être des cibles thérapeutiques majeures dans le traitement de ces maladies (voir revue en annexe, p202).

2) Le choc thermique bloque le cycle cellulaire :

La sensibilité des cellules au choc thermique dépend de la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent au moment du stress : elle est accrue pendant la mitose, et encore plus pendant la phase S alors que des cellules en phase G1 sont relativement résistantes (Dewey 1989). Un choc thermique modéré appliqué à des fibroblastes en culture, non synchronisés, induit deux blocages du cycle cellulaire : le premier en transition G1/S et l'autre en transition G2/M (Kuhl & Rensing 2000).

Lors de la transition G1/S sont vérifiés la taille de la cellule, son état nutritionnel et l'existence de dommages sur l'ADN, avant d'autoriser la réplication de l'ADN. Les Cyclines D/Cdk4 et E/Cdk6 jouent un rôle décisif dans ce point de contrôle en permettant la phosphorylation de pRb et donc l'activation d'E2F qui active les gènes spécifiques de la phase S (Giacinti & Giordano 2006). Or, le choc thermique abolit l'hyperphosphorylation de pRb, probablement par l'induction directe de p21, un inhibiteur des Cdk2 et 4 (Khandjian 1995). De la même façon, le choc thermique augmente le taux de p53 qui est lui-même responsable d'une expression élevée du même inhibiteur p21 (Nitta et al. 1997).

Le second blocage a lieu lors de la transition G2/M. Lors de cette étape, sont vérifiés l'achèvement de la synthèse d'ADN ainsi que les étapes préparatoires de la mitose. L'étape principale permettant cette transition est l'activation et la translocation nucléaire du complexe Cycline B/Cdk1 qui phosphoryle des protéines intervenant dans la condensation chromosomique. Peu de choses sont connues sur la façon dont le choc thermique conduit à un arrêt du cycle cellulaire en G2 ; une explication plausible serait une augmentation de l'expression de l'inhibiteur p21, capable d'inhiber la kinase Cdk1 (Font de Mora et al. 1997; Niculescu et al. 1998).

3) Le choc thermique inhibe l'expression des gènes :

Il a pu être montré chez la drosophile que pendant et après un choc thermique, la transcription des gènes est réprimée (Lindquist 1986). D'autres études ont montré que l'épissage d'ARN pré-messagers existants est interrompu pendant le choc thermique (Yost & Lindquist 1986; Yost & Lindquist 1991). De même, la traduction des ARN messagers (ARNm) pré-existants est abolie ; en effet, on observe une inhibition de l'interaction des protéines de la coiffe avec l'extrémité 5' de l'ARNm (Lamphear & Panniers 1991), une inhibition de facteurs d'initiation de la traduction par phosphorylation (Murtha-Riel et al. 1993) et une altération de la phosphorylation des protéines ribosomiques (Scharf & Nover 1982). Lorsque la température revient à la normale, la synthèse protéique reprend graduellement, le temps nécessaire à la reprise étant proportionnel à la sévérité du choc thermique subi.

4) *Voies de transduction du signal mobilisées par le choc thermique :*

Les voies de transduction du signal mobilisées par le choc thermique dépendent de la sévérité du stress subi et varient chez chaque espèce (Park et al. 2005).

Différentes études rapportent qu'un choc thermique modéré peut faire intervenir les voies Ras/Rac1, PI3K/AKT, ERK1-2, SAPK/JNK et p38MAPK alors qu'un choc thermique plus sévère fera intervenir les voies ERK1-2, SAPK/JNK et p38MAPK, seulement (Figure 4).

La superfamille des GTPases Ras est impliquée dans divers processus dont la progression dans le cycle cellulaire, la division cellulaire, la régulation de la morphologie et de la motilité cellulaire ou le trafic intra-cellulaire des molécules et organelles. Ras possède une fonction de relais entre des récepteurs tyrosine kinase de surface et des cascades de signalisation cytoplasmique les voies Raf-ERK1-2, PI3K/AKT ou Rho-Rac1-NADPH oxydase. Cette dernière voie est plus particulièrement impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine, de la transcription, du développement et de la croissance. Un choc thermique doux active Ras/Rac1, mais le mécanisme de cette activation reste encore incompris : il pourrait faire intervenir des récepteurs de facteurs de croissance (Lin et al. 1997) ou une activation directe par le choc thermique (Rudolph et al. 2001).

La voie PI3K est impliquée dans des fonctions cellulaires telles que la signalisation mitogénique, la croissance et la survie, le remodelage du cytosquelette, le trafic vésiculaire ou le contrôle métabolique. L'effet anti-apoptotique de PI3K est dans la plupart des cas médié par la sérine/thréonine kinase Akt/PKB. Un choc thermique modéré augmente l'activité de c-Src qui active PI3K (Lin et al. 1997).

Parmi les voies de transduction du signal répondant au stress, la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) joue un rôle crucial en régulant l'activité de facteurs de transcription. Il existe 3 sous-familles : ERK, SAPK/JNK et p38MAPK. La voie ERK est importante pour la survie cellulaire tandis que les voies SAPK/JNK et p38MAPK seraient plus liées à la réponse au stress et impliquées dans l'apoptose. C'est la balance entre l'activation des voies ERK et SAPK/JNK/p38MAPK qui est déterminante pour la survie de la cellule ou son entrée en apoptose (Xia et al. 1995). Un choc thermique modéré active ERK1/2 par phosphorylation de ses résidus thréonine 202 et 204. De même, il active la voie SAPK/JNK de façon dépendante de Rac-1, alors que pour un choc thermique sévère, cette activation est indépendante de Rac-1. Enfin, le choc thermique induit la phosphorylation de p38MAPK sur ses résidus thréonine 180 et 182 qui phosphoryle à son tour d'autres cibles

telles que la MAPKAPK2/3, responsable entre autres, de la phosphorylation de Hsp27 (Guay et al. 1997).

Lorsque le choc thermique est plus sévère, les voies de transduction du signal conduisent à une mort par apoptose, plus ou moins importante, de la population cellulaire soumise au stress. Il a cependant été montré que selon le type cellulaire, il existe de très grandes variations de sensibilité à l'apoptose induite par le choc thermique (Hildebrandt et al. 2002). De plus, lorsque le choc thermique dépasse un certain seuil, la cellule ne meurt plus par apoptose mais par nécrose : là encore, la température de ce seuil est très variable en fonction des types cellulaires (Samali et al. 1999).

5) *Le choc thermique modifie le potentiel d'oxydo-réduction intra-cellulaire :*

Il a été démontré que le peroxyde d'hydrogène est capable d'activer, *in vivo* et *in vitro*, le facteur de transcription HSF. L'induction transcriptionnelle en réponse au choc thermique est, de plus, très fortement inhibée en conditions d'hypoxie ou en présence d'agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT) (Jacquier-Sarlin & Polla 1996; Kretz-Remy & Arrigo 2002). HSF1 peut être directement activé *in vitro* par un choc thermique ou par le peroxyde d'hydrogène ; cette activation est inhibée par l'utilisation de composés réducteurs (Ahn & Thiele 2003). L'activation de HSF1 dépendante du potentiel redox nécessite la formation d'un pont disulfure entre deux résidus cystéine en position 35 et 105. La mutation de ces résidus cystéine inhibe l'induction des Hsp et de l'apoptose en réponse au choc thermique, ce qui suggère que la fonction *in vivo* d'HSF1 est dépendante d'une régulation par le potentiel redox intra-cellulaire (Ahn & Thiele 2003).

Afin de s'adapter à ces contraintes vitales, un large éventail de protéines aidant au repliement correct des protéines est présent dans la cellule : les chaperons moléculaires. Néanmoins, ce système peut s'avérer insuffisant lorsque le stress génère une trop grande quantité de protéines mal-conformées, ce qui conduit à une agrégation des protéines toxique pour la cellule.

II. L'agrégation protéique :

A. Biosynthèse et repliements des protéines :

La conformation native des protéines est dépendante de la séquence d'acides aminés du polypeptide (Anfinsen 1973). Cette conformation, thermodynamiquement stable, est le plus souvent composée d'un cœur hydrophobe entouré d'une couche hydrophile (Levy & Onuchic 2006).

Bien que la conformation native d'une protéine puisse être obtenue spontanément et sans intervention extérieure, la très haute concentration en protéines dans les cellules (300 à 400 mg/ml) rend impossible un repliement correct. De plus, la recherche aléatoire de cette structure thermodynamiquement stable consommerait une quantité de temps et d'énergie incompatible avec la survie cellulaire (Zimmerman & Trach 1991).

Le repliement des protéines nouvellement synthétisées est couplé à la traduction (Harms et al. 2001). Une absence de repliement ou un repliement incorrect conduisent à des interactions protéines-protéines inappropriées et à l'apparition d'agrégats protéiques.

B. L'agrégation protéique : mécanisme général :

Le mécanisme général de formation des agrégats protéiques suit 4 étapes : la conversion de la conformation des protéines, la nucléation, la formation de protofibrilles et la condensation (Figure 5).

1) Etape 1 : Conversion de la conformation :

Le processus d'agrégation est initié par une conversion de la conformation du monomère qui passe d'un état soluble à une conformation altérée (Roberts 2007). Cette conversion peut avoir de multiples origines :

a) Conversion naturelle des protéines :

Certaines protéines, comme la plupart des protéines impliquées dans les protéinopathies ont une capacité intrinsèque à adopter une conformation pathologique, généralement inhibée par l'action des protéines chaperons. Cependant, au cours du vieillissement, la conformation pathologique peut prendre le dessus et être à l'origine de

maladies d'agrégation comme les α -synucléinopathies (Uversky 2007) ou les amyloïdoses systémiques séniles (Saraiva 2001).

b) Conversion liée à la sur-expression de la protéine :

L'accumulation anormale et persistante de certaines protéines peut augmenter leur capacité à s'agréger. Ceci est le cas par exemple lors de la triplication du gène codant l' α -Synucléine observée dans certaines formes de la maladie de Parkinson (Singleton et al. 2003) ou encore lors de l'accumulation de β 2-microglobuline dans les homéodialyses répétées (Verdone et al. 2002).

c) Conversion suite à des mutations :

Des mutations ponctuelles dans les gènes codant des protéines ayant tendance à s'agréger sont responsables du développement de certaines maladies d'agrégation, comme des formes familiales des maladies d'Alzheimer et de Parkinson ou diverses amyloïdoses héréditaires. De la même façon, l'expansion de triplets CAG dans ces gènes peut aussi avoir de lourdes conséquences dans le développement de maladies telles que Huntington ou les Ataxies spinocérébrales.

d) Conversion d'origine post-traductionnelle :

Dans la maladie d'Alzheimer, deux protéines tendent à s'agréger suites à ces modifications : Tau, lorsqu'il est hyperphosphorylé, et le précurseur β -amyloïde dont le clivage donne le peptide $A\beta_{40-42}$ qui forme des plaques séniles dans l'espace extra-cellulaire.

e) Conversion suite à l'exposition à des agents mutagènes :

Bien que leur implication ne soit pas complètement démontrée *in vivo*, des études *in vitro* montrent que certains herbicides, pesticides ou métaux lourds ont un impact sur la conformation des protéines.

Chacun de ces facteurs de conversion peut induire l'agrégation des protéines en agissant seul, en combinaison voire en synergie. La conversion n'est que l'étape initiale,

l'agrégation nécessite ensuite le regroupement de ces monomères pour former un noyau, structure de base de l'agrégat.

2) *Etape 2 : Nucléation :*

Les protéines dont la conformation est altérée (issues de l'étape 1) forment, suite à un ensemble d'associations-dissociations entre les monomères, de petits oligomères instables. Une structure irréversible émerge ensuite ; elle est appelée le noyau (Roberts 2007). Ce noyau correspond au plus petit oligomère thermodynamiquement stable dans lequel, pour la première fois, le taux d'association est supérieur au taux de dissociation (Ferrone 1999). Ce noyau est rendu stable par la formation de liaisons hydrogènes et par les contacts entre les zones hydrophobes des protéines du noyau.

3) *Etape 3 : Formation de protofibrilles :*

L'agrégation étant thermodynamiquement plus avantageuse que la dispersion, une première théorie propose que la croissance de l'agrégat, à partir du noyau, se ferait par l'ajout de monomères. Ces ajouts seraient réversibles, jusqu'au blocage de l'élément ajouté suite à des modifications conformationnelles. L'ajout des monomères se ferait suivant un axe linéaire bien précis (Roberts 2007).

Selon une deuxième théorie, la croissance des agrégats pourrait se faire par l'assemblage de structures pluri-protéiques appelées des granules. Ces derniers correspondent à des noyaux ayant subis des distorsions conformationnelles suite à des contraintes physiques ou chimiques. Les granules s'assemblent alors pour former les protofibrilles (Bhak et al. 2009).

Dans les deux cas, les filaments obtenus sont essentiellement linéaires. Cette linéarité est dûe au fait que les contacts inter-protéines au sein de l'agrégat forment des feuilletts β .

4) *Etape 4 : Condensation :*

Les protofibrilles formées sont capables de s'associer pour former trois types de structures différentes en fonction des interactions entre les protofibrilles et de l'environnement cellulaire : des gels, des fibrilles et des agrégats amorphes (Bhak et al. 2009; Roberts 2007). Par exemple, les agrégats amorphes sont plus rapidement formés et ne

nécessitent pas de conditions particulières, contrairement aux fibrilles (Uversky 2010). Différentes structures peuvent être obtenues à partir d'une même protéine, reflétant l'existence de plusieurs voies possibles pour leur formation. Ainsi, il existe un polymorphisme d'agrégation (Bhak et al. 2009; Kodali & Wetzel 2007).

C. L'agrégation des protéines : quelques exemples :

L'agrégation protéique peut être classées suivant deux catégories : les agrégations physiologiques voulues et les agrégations physiologiques non voulues.

1) *Agrégations physiologiques voulues :*

Ce processus d'agrégation est utilisé à des fins physiologiques dans divers organismes, des bactéries à l'Homme (Fowler et al. 2007). Quelques exemples peuvent être cités :

(i) Les entérobactéries utilisent des fibrilles amyloïdes pour former un biofilm de protection contre des composés anti-microbiens (Barnhart & Chapman 2006).

(ii) Certains champignons et bactéries filamenteuses se servent de fibrilles amyloïdes, pour former un manteau permettant de réduire les tensions de surface avec l'eau afin de faciliter le branchement d'une partie du corps (Gebbinck et al. 2005; Talbot 2003).

(iii) Les protéines du chorion chez les insectes et les poissons s'auto-assemblent en une couche de fibrilles amyloïdes qui protège l'œuf contre les stress chimiques et physiques (Iconomidou et al. 2000).

(iv) Enfin, chez les mammifères, la biosynthèse de la mélanine nécessite la polymérisation de fibrilles amyloïdes de la protéine Pmel17 (Fowler et al. 2006). Cette agrégation physiologique est aussi responsable de la génération du cytosquelette cellulaire. En effet, la polymérisation de la forme globulaire G-actine en microfilaments F-Actine suit ce mécanisme d'agrégation (Glenn et al. 1996).

2) *Agrégations physiologiques non voulues :*

Chez l'Homme, plus de vingt protéines cellulaires sont liées à des pathologies d'agrégation. Bien que des agrégats soient observés dans les cellules, il semblerait que ce ne soit pas les grosses structures qui soient responsables de la majorité des effets pathologiques

mais les petits oligomères solubles qui sont potentiellement plus cytotoxiques (Ferreira et al. 2007; Sakono & Zako 2010).

a) Oligomères d' α -Synucléine :

Les Synucléines sont des protéines dont le rôle physiologique reste mal compris. Il semblerait que l' α -Synucléine joue un rôle dans la formation et le maintien du complexe SNARE au niveau des structures pré-synaptiques. Son absence provoquerait l'arrêt de la libération de neurotransmetteur et une dégénérescence neuronale (Burré et al. 2010). L'agrégation de l' α -Synucléine engendre la formation de Corps de Lewy et de filaments radiaires, observés dans plusieurs maladies neuro-dégénératives humaines appelées les α -Synucléinopathies dont la maladie de Parkinson fait partie (Brown 2010).

Trois types d'oligomères solubles ont été décrits : des sphères de taille variable, des chaînes de sphères formant des protofibrilles et des anneaux complets ou incomplets (Conway et al. 2000; Ding et al. 2002). Ces oligomères solubles sont cytotoxiques et affectent la viabilité cellulaire en modifiant la stabilité et la perméabilité des membranes cellulaires. Les protofibrilles se lient directement à certaines fractions membranaires alors que les anneaux forment des pores amyloïdes intégrés dans la membrane (Ding et al. 2002). La formation des fibrilles insolubles est moins toxique pour les neurones et semble correspondre à un moyen de détoxification des cellules afin d'assurer leur survie.

b) Oligomères d'Huntingtine :

La chorée de Huntington est une maladie neurodégénérative affectant les fonctions motrices et cognitives du patient, suite à une perte de neurones du striatum. Cette maladie génétique à transmission dominante est causée majoritairement par l'expression d'une forme mutée de la protéine appelée Huntingtine (Krobitsch & Kazantsev 2011).

L'Huntingtine, exprimée dans les cellules neuronales, est localisée essentiellement dans le cytoplasme, associée aux vésicules et au réseau de microtubules (Li et al. 2003). Bien qu'elle ait été montrée comme impliquée dans le trafic vésiculaire, le transport du fer, la transcription, la transmission synaptique et des processus anti-apoptotiques, sa fonction exacte reste inconnue à ce jour (Cattaneo et al. 2005).

La pathologie résulte d'une augmentation du nombre de répétitions CAG (codon de la Glutamine) dans l'exon 1 du gène codant l'Huntingtine. Au-delà de 36 répétitions CAG, la protéine devient pathologique et tend à s'agréger (MacDonald et al. 1993). Une étude récente a montré que l'Huntingtine pathologique forme trois types de structures différentes au sein des cellules : des monomères, des oligomères et des corps d'inclusion (Olshina et al. 2010). Les inclusions formées sont retrouvées au niveau du corps cellulaire (localisation intra- et péri-nucléaire) et au niveau des dendrites (DiFiglia et al. 1997). Leur taille est proportionnelle au nombre de répétitions présentes au sein de la protéine (Scherzinger et al. 1999). La formation de ces inclusions, moins toxiques que les formes solubles, serait une réponse de la cellule pour limiter la toxicité des petits agrégats solubles (Arrasate et al. 2004), capables par exemple de bloquer le protéasome (Bennett et al. 2007).

c) Oligomères d' α B-Cristalline :

L' α B-Cristalline, aussi appelée HspB5, est une petite protéine de stress (sHsp) exprimée dans le cristallin de l'œil, mais également dans des organes présentant un métabolisme oxydatif très actif comme le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques et cardiaques. Plusieurs mutations de cette protéine ont été décrites ; elles sont à l'origine de cataractes, de cardiomyopathies et/ou de myopathies myofibrillaires. La mutation la plus étudiée, R120G (mutation ponctuelle entraînant le remplacement d'un résidu arginine en position 120 par une glutamine), induit ces trois types de pathologies (Vicart et al. 1998).

La mutation R120G induit un défaut dans la structure quaternaire de la protéine, qui perd alors son activité chaperon (Simon et al. 2007). Cette conformation altérée entraîne l'agrégation des protéines mutées HspB5-R120G, particulièrement avec les filaments de Desmine auxquels elle est liée (Vicart et al. 1998). L'agrégation de ce mutant est progressive : dans un premier temps, une multitude de petits agrégats sont observés dans le cytoplasme puis ils sont regroupés pour former de larges agrégats grâce à un transport actif dépendant des microtubules (Chávez Zobel et al. 2003).

Comme pour l'Huntingtine et l' α -Synucléine, il semblerait que les formes solubles d'HspB5-R120G soient les plus toxiques pour la cellule. En effet, lors de l'arrêt de l'expression de cette forme mutée, chez des souris exprimant le gène HspB5 portant la mutation R120G sous le contrôle d'un promoteur inductible, bien que les larges agrégats soient maintenus, les pathologies associées ne se développent pas (Sanbe et al. 2005). L'une

des conséquences principales de la mutation R120G est la perte de la fonction anti-apoptotique d'HspB5. La protéine mutée est en effet incapable d'inhiber : (i) la translocation du cytosol vers la mitochondrie des protéines pro-apoptotiques Bax et Bcl-X_S (Mao et al. 2004) mais également (ii) le clivage de la caspase 3 (Kamradt et al. 2002).

Les mutations décrites au niveau des trois protéines présentées ci-dessus modifient leur conformation, elles ont alors une tendance accrue à l'agrégation. Dans la cellule, plusieurs mécanismes sont présents afin de limiter cette agrégation et les conséquences néfastes qui en découlent. Ces mécanismes sont regroupés sous le terme générique de Contrôle Qualité des Protéines.

III. Réponse cellulaire à l'agrégation protéique, le Contrôle Qualité des Protéines :

A. Les chaperons moléculaires :

La conformation des protéines est le plus souvent composée d'un cœur hydrophobe entouré d'une couche hydrophile (Levy & Onuchic 2006). Cette conformation est obtenue grâce à un large éventail de protéines aidant au repliement correct des protéines : les chaperons moléculaires, constitués majoritairement des protéines de choc thermique (Hsp) (cf. partie « Les protéines de choc thermique », p40).

Lorsque les protéines dénaturées ne peuvent pas être reconformées par les Hsp, elles sont adressées par CHIP (*Carboxyl terminus of Hsc70 Interacting Protein*) au protéasome 26S pour qu'elles soient dégradées. CHIP se lie au complexe chaperon Hsp70/Hsc70 et ubiquitine les protéines à dégrader grâce à son activité enzymatique E3 (Ballinger et al. 1999; Murata et al. 2001). La protéine CHIP mais également la protéine co-chaperone BAG1 interagissent toutes deux avec le complexe Hsp70-Hsc70 et avec des sous-unités du protéasome (Lüders et al. 2000; Urushitani et al. 2004); elles établissent donc un lien direct entre les protéines polyubiquitinées et le protéasome qui assurera leur dégradation.

B. Le protéasome :

Le protéasome est composé d'une sous-unité catalytique, la sous-unité 20S, qui peut être associée à différentes sous-unité régulatrices. Ainsi, il y a dans la cellule plusieurs protéasomes actifs différents (Tanaka 2009). Le plus connu et longtemps considéré comme

« le » protéasome, est le protéasome 26S qui se compose de la partie catalytique 20S et d'une ou deux sous-unité(s) régulatrice(s) 19S fixées à ses extrémités (Figure 6). Il est impliqué majoritairement dans la reconnaissance et la dégradation des protéines polyubiquitinées.

1) La sous-unité catalytique 20S :

Le protéasome 20S est une particule cylindrique en forme de tonneau composé de 4 anneaux heptamériques : deux anneaux aux extrémités du tonneau, appelés anneaux α , servant de portail d'accès à la chambre protéolytique, formée des deux anneaux β internes. Parmi les sous-unités β , seules $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ possèdent une activité protéolytique, sur la face interne de la chambre protéolytique. Cette activité est de type Caspase pour $\beta 1$ (clivage après un résidu acide), de type Trypsine pour $\beta 2$ (clivage après un résidu basique) et de type Chymotrypsine pour $\beta 5$ (clivage après un résidu hydrophobe) (Murata et al. 2009).

Le protéasome 20S génère des oligopeptides d'une longueur moyenne de 7 à 8 acides aminés. La majorité de ces produits est dégradé par des oligopeptidases et/ou des amino-carboxyl peptidases, tandis que quelques peptides sont adressés aux complexes majeurs d'histocompatibilité de type I (Nussbaum et al. 1998).

Chez les eucaryotes, le point d'entrée des substrats dans la chambre protéolytique est fermé par les parties N-terminales des sous-unités α (Groll et al. 1997). L'activation du protéasome, entraînant l'ouverture des anneaux α et permettant l'entrée des substrats à l'intérieur de la chambre catalytique, a longtemps été décrite comme dépendante de la liaison du protéasome 20S avec différentes sous-unités régulatrices, dont la plus connue et la plus étudiée est la sous-unité 19S (Tanaka 2009).

2) La sous-unité régulatrice 19S :

La particule régulatrice ou 19S est impliquée dans plusieurs fonctions :

- la reconnaissance des protéines polyubiquitinées à dégrader,
- l'ouverture de la chambre protéolytique,
- la dénaturation des protéines (mécanisme dépendant de l'ATP),
- leur déubiquitination,
- et leur translocation à l'intérieur du protéasome 20S.

La sous-unité 19S est composée d'au moins 19 sous-unités différentes. Elle se divise en deux sous-complexes, la base et le couvercle, reliés par une sous-unité charnière, Rpn10.

Le couvercle, qui se compose de 9 sous-unités non ATPasiques, déubiquitine les substrats du protéasome, capturés par la base, pour faciliter leur dégradation.

La base se compose de 6 sous-unités ATPasiques différentes et de 3 sous-unités non ATPasiques. Les sous-unités ATPasiques sont nécessaires pour dénaturer les substrats du protéasome et pour ouvrir les anneaux α , pré-requis nécessaires à l'entrée du substrat dans la chambre protéolytique. Certaines sous-unités (RPN1, RPN13, RPT5 et RPN10) capturent les protéines polyubiquitinées, directement ou grâce à des protéines dites navettes. En effet, ces protéines possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine, majoritairement des domaines du type UBA (*Ubiquitin-Associated domain*), leur permettant d'interagir avec un substrat polyubiquitiné (Kleijnen et al. 2000).

3) L'adressage au protéasome 26S :

Dans les cellules eucaryotes, les protéines peuvent subir une grande variété de modifications post-traductionnelles. Impliquées dans la régulation de leurs fonctions, ces modifications peuvent modifier par exemple les interactions protéine-protéine, leur localisation cellulaire ou leur demi-vie.

Une de ces modifications, à la base de nombreux mécanismes cellulaires, est la conjugaison des protéines avec une ou plusieurs molécule(s) d'ubiquitine, ou ubiquitination.

a) L'ubiquitine :

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés et de masse moléculaire de 9 kDa. Exclusivement retrouvée chez les eucaryotes, elle est considérée comme l'une des protéines les plus conservées au cours de l'évolution (seuls trois acides aminés différents) (Sharp & Li 1987).

L'ubiquitine est impliquée dans des mécanismes aussi divers que la transcription, la réparation de l'ADN, l'autophagie, l'activation de kinases ou encore la dégradation par le protéasome (Bhat & Greer 2011; Clague & Urbe s. d.; Ramaekers & Wouters 2011).

Une molécule d'ubiquitine contient 7 lysines, potentiellement ubiquitinables : K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63. Tous ces résidus peuvent être conjugués avec une autre

molécule d'ubiquitine pour former des chaînes de polyubiquitines (Ikeda & Dikic 2008). Les chaînes de polyubiquitines les plus abondantes dans les cellules sont les enchainements de molécules d'Ubiquitine impliquant les lysines 48 et 63.

b) Voie classique d'ubiquitination des protéines :

La conjugaison d'une molécule d'Ubiquitine se fait le plus souvent sur un résidu lysine interne de la protéine ciblée (Glickman & Ciechanover 2002). Elle nécessite l'action consécutive de trois enzymes : E1 (enzyme d'activation de l'Ubiquitine), E2 (enzyme de conjugaison de l'Ubiquitine) et E3 (enzyme de liaison de l'Ubiquitine) (Figure 7).

La première étape, dépendante de l'ATP, est une étape d'activation de l'ubiquitine qui se réalise par la formation d'une liaison thioester, riche en énergie, entre le résidu Glycine en C-terminal de la molécule d'ubiquitine, et l'enzyme E1. Lors de la deuxième étape, l'enzyme E2 récupère l'ubiquitine activée par une réaction de trans-thiolation et la conjugue au substrat. Pour finir, l'enzyme E3 catalyse le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 à un résidu lysine de la protéine à dégrader ainsi que la formation d'une liaison covalente isopeptidique.

Dans le protéome humain, il existe deux enzymes E1, environ 40 enzymes E2, et plus de 600 enzymes E3. Ces dernières sont très nombreuses puisque ce sont elles qui apportent la spécificité du substrat à dégrader (Murata et al. 2009; Pickart 2004).

La dégradation des protéines agrégées est limitée au niveau du protéasome. En effet, leur taille, souvent trop importante, peut empêcher leur dégradation par le protéasome. De plus, le protéasome est souvent inhibé par les agrégats protéiques. La cellule regroupe alors les agrégats pour former un agrégat unique appelé agrésome.

C. L'agrésome :

1) *Formation* :

En 1998, Johnston *et coll.* ont montré que la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) forme un agrégat unique insoluble localisé à proximité de l'enveloppe nucléaire lorsqu'elle est sur-exprimée ou lorsque le protéasome est inhibé. Cette protéine membranaire est responsable du flux d'ions chlorure entre la cellule et l'environnement et sa mutation est notamment impliquée dans le développement de la

Mucoviscidose. Des expériences de microscopie électronique ont mis en évidence que cette structure unique, dense aux électrons, entoure un centriole et colocalise avec des marqueurs du centrosome comme la Tubuline- γ , ce qui lui a valu le nom d'agrésome (Johnston et al. 1998). Des résultats identiques ont été obtenus par d'autres équipes avec la Préséniline-1 ou un mutant de la Superoxyde Dismutase 1 (SOD1) (Garcia-Mata et al. 1999; Notterpek et al. 1999; Johnston et al. 2000).

La formation de l'agrésome est inhibée par l'utilisation de drogues induisant une dépolymérisation des microtubules comme le Nocodazole. De plus, le blocage du complexe moteur de la Dynéine par la sur-expression de Dynamitine inhibe également sa formation (Garcia-Mata et al. 1999; Johnston et al. 1998). L'agrésome nécessite donc le transport rétrograde le long des microtubules des protéines agrégées, de la périphérie de la cellule vers le centre organisateur des microtubules (Garcia-Mata et al. 1999). Le recrutement des protéines agrégées au niveau des complexes de Dynéine se fait grâce à la présence d'une protéine intermédiaire capable de lier les agrégats d'un côté et de se fixer aux complexes de Dynéine de l'autre. Une de ces protéines est l'Histone Déacétylase-6 ou HDAC6 (Boyault et al. 2007a).

2) *Composition :*

L'agrésome est une entité complexe composée de plusieurs éléments :

- l'agrégat. Le plus souvent, les protéines de l'agrégat sont marquées par une chaîne de polyubiquitines mais dans certains cas comme les agrégats de formes mutantes de l' α -Synucléine ou de la Superoxyde Dismutase, les protéines ne sont pas toujours ubiquitinées (Basso et al. 2006; Goker-Alpan et al. 2010; Johnston et al. 1998).
- des protéines chaperons. Des analyses par immunohistochimie réalisées chez la levure ont mis en évidence la présence de Hsc70, de Hdj1 et 2 (Hsp40 chez les mammifères) et de la chaperonine TriC/TCP (Wigley et al. 1999; Garcia-Mata et al. 1999).
- des filaments intermédiaires. Ce sont principalement des filaments de type III comme la Vimentine ou la GFAP. Les protéines s'accumulent au niveau périnucléaire en cas de formation d'un agrésome (Herrmann & Aebi 2000). La Vimentine est notamment distribuée tout autour de l'agrésome et forme ainsi une sorte de cage, isolant les protéines agrégées du reste de la cellule (Johnston et al. 1998).

- les protéasomes 20S et 26S. Cependant, la quantité d'unités du protéasome présente au sein de l'agrésome (1% du total) est très largement insuffisante pour éliminer les protéines agrégées (Fabunmi et al. 2000; Wigley et al. 1999). Néanmoins, le fait de regrouper en un même endroit les protéines agrégées facilite leur élimination par un processus autophagique spécifique nommé agréphagie.

Chapitre 3 : L'autophagie

Le terme « autophagie » signifie en grec « se manger soi-même ». Il englobe un ensemble de mécanismes cataboliques aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires par le lysosome. D'abord découvert dans les situations de carence, l'autophagie permet de dégrader des protéines non essentielles afin de recycler les acides aminés et de synthétiser les éléments nécessaires à la survie cellulaire.

Sous le terme générique d'autophagie se cache en fait trois mécanismes distincts : la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperons et la macroautophagie.

I. La microautophagie :

Au cours de ce processus, des portions du cytoplasme sont directement « phagocytées » par le lysosome via un mécanisme d'invagination de la membrane lysosomale. Les microautophagosomes ainsi formés sont alors rapidement dégradés par les enzymes lysosomales. Cette voie est largement méconnue en termes d'importance physiologique et de machinerie moléculaire. Elle est étudiée essentiellement chez les levures. Chez *Pichia pastoris*, une levure méthylotrophe, l'utilisation du glucose comme source d'énergie, en lieu et place du méthanol, induit la dégradation spécifique des péroxisomes par microautophagie. Ce mécanisme, appelé micropexophagie, est dépendant de la protéine ubiquitine-like Paz2, orthologue de la protéine Atg8 des mammifères (Mukaiyama et al. 2004). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la microautophagie intervient dans l'élimination de parties non-essentielle du noyau en cas de carence nutritive. Ce mécanisme, appelé PMN (*Piecemeal Microautophagy of the Nucleus*), est initié au niveau des jonctions nucléovacuolaires formées suite à l'interaction des protéines membranaires Vac8 (vacuole) et Nvj1 (noyau) (Pan et al. 2000).

II. L'autophagie médiée par les chaperons :

Dans des conditions particulières de stress, la plupart des cellules, à l'exception de celles du muscle squelettique, dirigent sélectivement certaines protéines cytosoliques vers les lysosomes. Ce mécanisme, appelé Autophagie médiée par les chaperons ou CMA (*Chaperone Mediated Autophagy*), ne prend en charge que les protéines cytosoliques solubles possédant la séquence peptidique consensus KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) soit environ 30% des protéines cytosoliques (Dice 1990) (Figure 8). Ce signal peptidique est reconnu par la

protéine cytosolique de choc thermique de 70 kDa, Hsc70, qui se fixe spécifiquement au motif KFERQ (Chiang et al. 1989). L'interaction entre Hsc70 et son cargo est modulée par différents co-chaperons tels que Hsp90, Hsp40, Hip, Hop ou encore des protéines de la famille BAG (Agarraberes & Dice 2001). Après fixation de ce complexe au récepteur membranaire lysosomal LAMP-2A, la protéine possédant la séquence KFERQ est internalisée dans le lysosome afin d'y être dégradée (Cuervo & Dice 1996). L'internalisation de la protéine est réalisée au niveau de complexes multimériques de LAMP-2A (Bandyopadhyay et al. 2008) et nécessite une dénaturation partielle de la protéine afin qu'elle pénètre plus aisément à l'intérieur du lysosome (Salvador et al. 2000). La forme lysosomale d'Hsc70, Lys-Hsc70, est également nécessaire pour la dégradation du cargo (Agarraberes et al. 1997).

Les voies de transduction du signal activant la CMA restent inconnues à ce jour mais elles ont pour conséquences une accumulation d'Hsc70, de sa forme lysosomale, de LAMP-2A et la relocalisation des lysosomes dans la région périnucléaire (Cuervo & Dice 2000).

La CMA joue un rôle primordial dans la lutte contre le vieillissement. En effet, elle est fortement impliquée dans l'élimination des protéines oxydées dont l'accumulation est une des causes du vieillissement. Une possible explication pourrait venir du fait que les protéines oxydées sont partiellement dénaturées ; de ce fait, leur motif KFERQ pourrait se trouver plus accessible pour le complexe Hsc70 et, leur passage à travers la membrane lysosomale s'en trouverait facilité (Kiffin et al. 2004). De plus, le stress oxydant a aussi pour conséquence une accumulation d'Hsc70 et de LAMP-2A, augmentant la capacité de la CMA (Kiffin et al. 2004). Malheureusement, avec l'âge, la CMA baisse, ceci étant dû à un plus faible taux de LAMP-2A à la surface des lysosomes (Cuervo & Dice 2000). Il en résulte une accumulation de protéines oxydées et une accélération du processus de vieillissement.

III. La macroautophagie :

La macroautophagie (appelée par la suite par le terme générique d'autophagie) consiste en la séquestration d'une portion du cytoplasme dans une vésicule à double membrane appelée autophagosome. La fusion de cette dernière avec un lysosome permet la dégradation des éléments contenus à l'intérieur (Figure 9). L'autophagie fonctionne à un niveau basal dans la majorité des types cellulaires, mais est aussi induite par des stimuli variés tels que certains stress (notamment thermique), des cytokines, des protéines mal conformées ou agrégées. Ces divers stimuli activent la macroautophagie par l'induction du complexe

d'initiation, qui représente le tout premier effecteur dans la chaîne cinématique de la macroautophagie.

A. Les mécanismes moléculaires de la formation des autophagosomes :

1) *Le complexe d'initiation :*

Chez les mammifères, le complexe d'initiation est formé des protéines ULK1, mAtg13, FIP200 et Atg101, et est formé de façon constitutive (Mizushima 2010) (Figure 10). Atg101 a été mise en évidence récemment, son rôle n'est pas connu mais elle est nécessaire à la stabilité et à la phosphorylation basale du complexe d'initiation (Hosokawa et al. 2009b). FIP200 est une protéine multifonctionnelle intervenant dans le contrôle de l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération, la taille des cellules et la mort cellulaire (Hara et al. 2008).

L'activité du complexe d'initiation est régulée par phosphorylation. La kinase responsable de cette régulation, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), fait partie d'un complexe protéique nommé mTORC1 (*mTOR Complex 1*) (Hosokawa et al. 2009a).

Le complexe d'initiation est nécessaire au recrutement d'autres protéines Atg au niveau d'une structure appelée PAS (*Pre-Autophagosome Structure*) avant la formation de l'autophagosome. L'activité kinase de ULK1 n'est pas nécessaire pour le recrutement des protéines Atg8, Atg9 et Atg17 au niveau du PAS mais elle est néanmoins requise pour l'induction de l'autophagie, ces cibles n'étant pas connue à ce jour (Cheong et al. 2008).

Le complexe d'initiation est également nécessaire au relargage d'Atg9 du PAS vers d'autres structures membranaires comme l'appareil de Golgi (Young et al. 2006).

2) *Le Pré-autophagosome :*

Le PAS préfigure le futur autophagosome. Il est constitué d'une membrane lipidique isolée et de protéines Atg associées. L'origine des membranes lipidiques des vésicules autophagiques reste inconnue à ce jour. Plusieurs compartiments cellulaires ont été évoqués : le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi, l'enveloppe nucléaire ou encore les membranes mitochondriale et plasmique. Si seules des suppositions sur son ou ses origines peuvent être émises, cela est dû au fait que la double membrane des autophagosomes ne comporte aucun marqueur spécifique de ces différents compartiments ; seules des protéines

liées à l'autophagie y sont retrouvées. Les protéines Atg présentent au niveau du PAS forment différents complexes protéiques : le complexe d'initiation (cf. page précédente), le complexe I de la Phosphatidylinositol-(3)-kinase (PI3K) de classe III, le complexe Atg2-Atg18 et les systèmes de conjugaison Atg12 et LC3 (Suzuki & Ohsumi 2010).

a) Le *Core Complex* :

Chez les mammifères, différents complexes régulant l'autophagie intègrent la PI3K de classe III. Ils sont constitués d'un noyau invariable appelé *Core Complex*, contenant Vps15, Becline-1 (Kihara et al. 2001) et Ambra1 (Fimia et al. 2007), associé à d'autres protéines qui donnent au complexe sa fonction physiologique finale. Parmi ces protéines, les trois plus connues sont Atg14L, UVRAG et Rubicon (He & Levine 2010) (Figure 11) :

- Atg14L, aussi appelé Barkor (Beclin 1-associated autophagy-related key regulator), est localisé dans la membrane externe du RE où elle recrute la PI3K de classe III au niveau d'une structure particulière appelée omegasome. La PI3K de classe III y forme du Phosphatidylinositol(3)Phosphate (PI3P). Le PI3P est primordial pour le recrutement et l'activité de plusieurs protéines autophagiques, ce qui fait de l'omégasome une plateforme pour la formation de l'autophagosome (Matsunaga et al. 2010).
- Le rôle du complexe contenant UVRAG (UV irradiation Resistance-Associated Gene) est peu connu. Il a été décrit que via son interaction avec Bif-1, UVRAG est nécessaire à l'induction de l'autophagie en condition de carence nutritive dans des fibroblastes embryonnaires de souris mais le mécanisme n'est pas connu (Takahashi et al. 2007).
- Contrairement aux deux autres, le complexe contenant Rubicon (RUN domain Becline-1 interacting and Cystein rich containing protein) bloque le processus autophagique (Matsunaga et al. 2009). En effet, le nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes est accru par l'inhibition de Rubicon. Son activité n'est pas clairement établie mais sa liaison au Core Complex induit une chute de l'activité de la PI3K de classe III.

b) Les systèmes de conjugaison Atg12 et LC3 :

Les systèmes de conjugaison Atg12 et LC3 sont similaires au système de greffage de l'ubiquitine (Figure 12) :

- Atg12 est activé par Atg7, une enzyme de type E1. Atg12 est ensuite conjuguée à Atg5 via Atg10, une enzyme de type E2. Atg16L se lie alors au complexe Atg5-Atg12, formant un complexe multimérique de 800 kDa (Kuma et al. 2002). Ce complexe joue le rôle d'enzyme de type E3 pour le système de conjugaison LC3 (Fujita et al. 2008).
- MAP1LC3 (Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3), plus communément appelé LC3, est dans un premier temps clivé par HsAtg4B, ce qui expose la glycine 120, permettant sa conjugaison aux phosphatidyléthanolamines (PE) membranaires présents dans la membrane lipidique du PAS (forme alors appelée LC3-II). Cette conjugaison nécessite l'activité d'Atg7 (E1), d'Atg3 (E2) et du complexe Atg5-Atg12-Atg16L (E3) (Fujita et al. 2008; Kabeya et al. 2004). En réalité, 8 orthologues ont été décrits, classés en deux sous-familles : LC3 et GATE16/GABARAP. Les membres de ces deux sous-familles sont impliqués dans la biogenèse des autophagosomes mais leurs fonctions ne sont pas redondantes (Weidberg et al. 2010). L'inhibition spécifique de chaque membre par interférence à ARN a permis de montrer que la sous-famille LC3 est impliquée dans l'élongation de la membrane du PAS (autophagosomes de très petite taille) alors que GATE16/GABARAP interviendrait plutôt dans des stades plus tardifs du processus autophagiques (Weidberg et al. 2010).

Ces différents complexes protéiques sont nécessaires pour la formation des autophagosomes mais leur rôle reste mal compris. Ils semblent jouer un rôle d'échafaudage pour la formation correcte des vésicules, notamment au niveau de sa taille et de sa courbure, rôle qui nécessite leur association à la membrane du pré-autophagosome. En plus des PE et d'Atg14L, la protéine trans-membranaire VMP1 (*Vacuole Membrane Protein 1*) pourrait être impliquée dans cette association. Cette protéine peut en effet lier LC3, par l'intermédiaire de TP53INP2 (*Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 2*), et Becline-1 directement (Nowak et al. 2009; Ropolo et al. 2007).

3) *L'expansion des membranes de la vésicule :*

La protéine mAtg9 est également retrouvée dans les membranes autophagiques. Cette dernière est la seule protéine Atg possédant des domaines transmembranaires qui lui permettent d'être enchâssée dans les membranes lipidiques. Elle joue un rôle primordial dans l'élongation du PAS et la formation d'un autophagosome complet.

L'adressage et le relargage de mAtg9 au niveau du PAS est sous le contrôle des complexes ULK1-mAtg13 et PI3K de classe III (Young et al. 2006). En revanche, l'implication de FIP200 et du complexe Atg2-Atg18, également impliqués chez la levure, n'a pas encore été étudiée. Une protéine importante dans la régulation du trafic de mAtg9 a récemment été découverte. Cette protéine, appelée p38IP (*p38-Interacting Protein*), peut se lier à mAtg9 et est nécessaire à sa circulation entre les différents compartiments cellulaires et donc à l'autophagie. La dissolution du complexe mAtg9-p38IP par la p38MAPK bloque l'autophagie. La kinase p38MAPK est notamment sensible à la concentration en acides aminés dans la cellule : active en milieu riche et inactive en milieu pauvre (Webber & Tooze 2010). En ce qui concerne sa fonction, mAtg9 peut interagir avec Bif-1. Cette dernière possède un domaine BAR (*Bin-Amphiphysin-Rvs domain*) qui permet d'imprimer une courbure aux membranes lipidiques (Takahashi et al. 2007).

4) *La fermeture des vésicules et le recyclage de la machinerie autophagique :*

Lorsque l'élongation de la membrane est suffisante, un mécanisme mal connu intervient afin de clore la vésicule.

Chez les mammifères, ce sont les protéines de la sous-famille GATE16/GABARAP qui semblent impliquées dans la fermeture des vésicules autophagiques. En effet, leur inhibition par interférence à ARN conduit à une accumulation de vésicules autophagiques ouvertes (Weidberg et al. 2010). Noda *et coll.* émettent l'hypothèse que, chez les mammifères, la fermeture des autophagosomes serait conduite par l'homo-oligomérisation de ces protéines suivie de l'hémifusion des membranes, formant ainsi un autophagosome complet (Noda et al. 2009).

C'est également à cette étape que l'ensemble de la machinerie autophagique présenté ci-dessus (excepté mAtg9 et LC3-II) est décrochée de la membrane autophagique afin d'être recyclée dans le cytoplasme et ainsi servir à la formation d'un nouvel autophagosome (Xie & Klionsky 2007). Pour la plupart des protéines, ces étapes de décrochage et de recyclage

restent mal comprises pour le moment. Pour LC3-II, la fraction située sur la membrane interne reste en place, alors qu'une partie de la fraction présente sur la membrane externe est clivée par la protéase HsAtg4B et recyclée.

5) *Le trafic des vésicules autophagiques au sein de la cellule :*

Le cytosquelette joue un rôle très important dans l'autophagie, notamment le réseau de microtubules qui permet le déplacement des vésicules autophagiques grâce aux moteurs moléculaires associés.

Il a été montré que le mécanisme autophagique suit un mouvement centripète au sein des cellules de mammifères. Bien que le déplacement le long des microtubules se fasse de façon bidirectionnelle, les autophagosomes tendent à se diriger et à s'accumuler au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC pour *MicroTubules Organizing Center*), tout comme les lysosomes. Ce mouvement centripète est dépendant du moteur moléculaire de Dynéine (Jahreiss et al. 2008).

Différentes modifications post-traductionnelles peuvent affecter la tubuline comme la détyronisation, l'acétylation ou la phosphorylation (Hammond et al. 2008). Ces modifications ont un impact sur la conformation des tubulines et sur les microtubules eux-mêmes. Ces changements de conformation modulent l'environnement protéique associé aux tubulines (Hammond et al. 2008). Par exemple, l'hyperacétylation des tubulines sur la lysine 40 induit le recrutement des moteurs moléculaires de Dynéine et de Kinésine sur les microtubules et accélère ainsi le trafic des vésicules autophagiques (Dompierre et al. 2007).

Le mouvement des autophagosomes le long des microtubules leur permet de se diriger vers le MTOC où sont localisées les lysosomes.

6) *La fusion aux lysosomes :*

La dégradation du matériel présent au sein des autophagosomes est réalisée par les enzymes lysosomales. L'accomplissement d'un processus autophagique complet nécessite donc la fusion des autophagosomes avec des lysosomes.

De nombreuses protéines sont impliquées dans ces mécanismes de fusion et sont pour la plupart conservées de la levure à l'Homme. Il a été montré que la fusion est réalisée grâce au complexe protéique SNARE, composé de trois principales catégories de protéines : v-

SNARE, t-SNARE et SNAP-25. La structure tridimensionnelle de ce complexe, avec ses quatre hélices α et son changement de configuration, guide le complexe vers la fusion. Puis, le complexe est désassemblé par l'ATPase SNF, en lien avec la protéine α SNAP (Martens & McMahon 2008).

Chez les mammifères, la plupart des protéines impliquées dans la fusion autophagosome/lysosome ont été mises en évidence par l'observation d'une accumulation d'autophagosomes dans le cytoplasme, dans le cas de cellules déplétées pour ces protéines. Parmi celles-ci, peuvent être citées des protéines des complexes ESCRT (Hrs (Tamai et al. 2007) ou SKD1 (Nara et al. 2002) par exemple), comme chez la levure, ou encore les protéines Ubiquilin (N'Diaye et al. 2009), Rab7 (Jager et al. 2004), VCP et HDAC6. En fonction du stimulus, les protéines impliquées dans la maturation peuvent être différentes. C'est le cas pour VCP et HDAC6 qui sont toutes deux nécessaires à la fusion dans le cas d'une autophagie basale ou pour l'élimination d'agrégats protéiques polyubiquitinés mais qui ne semblent pas intervenir en cas de carence nutritive (Lee et al. 2010; Tresse et al. 2010). HDAC6 recrute au niveau du lieu de maturation des autophagosomes, une protéine appelée Cortactine qui est un modulateur du réseau de F-Actine. Il en résulte la formation d'un réseau de F-Actine servant de plateforme pour la fusion des membranes (Lee et al. 2010).

Les protéines lysosomales sont elles aussi importantes pour la maturation des autophagosomes. Les protéines lysosomales membranaires, ou LMP (pour *Lysosomal Membrane Protein*), sont au nombre d'environ vingt-cinq chez les mammifères mais il existe de nombreuses protéines additionnelles. Ces LMP ont plusieurs rôles importants pour les lysosomes comme l'acidification des vésicules, la fusion membranaire, le transport des lysosomes ou encore l'import de protéines cytosoliques, endosomales ou autophagiques. Des mutations ou des déplétions de ces différentes protéines sont à l'origine de maladies lysosomales. Pour certaines de ces maladies, un des phénotypes observés est une accumulation de vésicules autophagiques immatures qui pourrait être impliquée dans le développement de la pathologie (Saftig & Klumperman 2009). Par exemple, une déficience pour la protéine membranaire LAMP2 chez des souris récapitule la maladie de Danon observée chez l'Homme où les symptômes sont une cardiomyopathie et/ou une myopathie des muscles squelettiques associées dans les cas les plus sévères à un retard mental. Chez les souris KO pour LAMP2, comme chez les patients, les lysosomes sont dispersés dans le cytoplasme et n'ont pas la localisation périnucléaire leur permettant de fusionner avec les autophagosomes (Saftig et al. 2008). Les protéines LAMP semblent également impliquées

dans la fusion entre les lysosomes et les vésicules autophagiques. En effet, dans des cellules de mammifères déficientes pour les protéines LAMP1 et 2, le recrutement au niveau des autophagosomes de la GTPase Rab7, impliquée dans la fusion, est retardé et la fusion finale est inhibée (Jager et al. 2004).

Outre les complexes protéiques impliqués dans la mécanistique de la fusion, cette dernière ne peut avoir lieu sans l'acidification des lysosomes. Elle est contrôlée par une pompe à protons appelée *V-type H⁺ ATPase Complex*. Cette pompe permet l'import de protons H⁺ au sein du lysosome, ce qui entraîne l'acidification de la vésicule et donc l'activation des hydrolases solubles lysosomales (Forgac 2007). Une mutation dans le gène *vma21*, qui code pour une sous-unité de l'ATPase, conduit à une myopathie avec autophagie excessive liée au chromosome X, dont la caractéristique principale est une accumulation de vésicules autophagiques immatures (Ramachandran et al. 2009). Ce phénotype cellulaire est également observé suite à l'utilisation de la drogue Bafilomycine A1 qui bloque l'acidification des lysosomes en inhibant la sous-unité V0 de l'ATPase. Cette drogue, utilisée sur de courtes durées, empêche la fusion finale, alors qu'utilisée sur de longues durées, elle ne bloque pas la fusion mais uniquement la dégradation du contenu de l'autolysosome par inhibition de l'activité des enzymes lysosomales (Klionsky et al. 2008a).

B. Les autophagies sélectives :

1) *La mitophagie :*

La présence de mitochondries à l'intérieur d'autophagosomes a été détectée pour la première fois en 1957 par microscopie électronique (Clark 1957). Ce processus, nommé mitophagie, permet le maintien d'une population mitochondriale fonctionnelle par l'élimination dirigée des mitochondries altérées (Kim et al. 2007).

Les études de la mitophagie sont récentes et beaucoup reste à découvrir mais il semble que la mitophagie soit présente chez tous les organismes, de la levure à l'Homme. Chez les mammifères, plusieurs gènes impliqués dans la mitophagie ont été mis en évidence, dont *bnip3* et *nix/bnip3L*. Ces deux gènes codent pour des protéines possédant un domaine BH3 de localisation mitochondriale (Zhang & Ney 2009). La sur-expression de *bnip3* dans des cardiomyocytes induit une chute de la quantité d'ADN mitochondrial, indiquant que la mitophagie est activée (Band et al. 2009). Nix interagit avec LC3 et GABARAP et pourrait faire le lien avec la machinerie autophagique (Novak et al. 2010).

Les dernières avancées concernant la mitophagie ont été réalisées dans les neurones notamment grâce à l'étude des maladies neurodégénératives. Elles ont permis de révéler le rôle de deux protéines essentielles pour la mitophagie : PINK1 et Parkin. PINK1, une sérine-thréonine kinase, interagit avec Becline-1 et intervient dans l'activation du processus autophagique (Michiorri et al. 2010). PINK1 s'accumule sur la membrane externe des mitochondries altérées, où elle recrute Parkin (Narendra et al. 2010), une E3-ubiquitine ligase cytosolique qui ubiquitine la protéine VDAC1 (*Voltage-Dependent Anion Channel 1*) ; la chaîne de polyubiquitines est alors reconnue par la protéine adaptatrice SQSTM1 qui fait le lien entre la mitochondrie à dégrader et les autophagosomes (Geisler et al. 2010).

2) L'agrégation :

L'autophagie joue un rôle important dans l'élimination sélective des agrégats protéiques. Les autophagosomes contenant les agrégats protéiques sont largement dépourvus d'autres matériels cellulaires, ce qui suggère que l'agrégation est une voie sélective dans laquelle l'expansion de la vésicule est réalisée directement autour des agrégats à dégrader (Filimonenko et al. 2010). Trois protéines semblent être importantes pour ce mécanisme : p62/Séquestosome-1 (SQSTM1), NBR1 (*Neighbor of BRCA1 gene 1*) et Alfy (*PI3P-binding Autophagy-like FYVE domain protein*).

SQSTM1 et NBR1 sont très semblables : elles possèdent toutes deux un domaine UBA (*Ubiquitin-Associated domain*) de liaison à l'ubiquitine et un domaine LIR (*LC3-Interacting Region*) de liaison à la protéine LC3 (Pankiv et al. 2007; Kirkin et al. 2009a). Elles se lient préférentiellement aux chaînes de polyubiquitines liées par la Lysine 63 et font donc un lien direct entre le cargo polyubiquitiné et l'autophagie. Elles possèdent également un domaine PB1 (*Phox and Bem1p domain*) d'interaction avec d'autres protéines à domaine PB1. Ce domaine permet notamment l'homo-oligomérisation de SQSTM1, un événement important pour la dégradation du cargo. NBR1 est également capable de s'homo-oligomériser via un domaine *Coiled-coil* (Ichimura et al. 2008). Il a été montré que ces deux protéines sont nécessaires à la formation des inclusions protéiques polyubiquitinées ainsi qu'à leur dégradation (Kirkin et al. 2009b).

Alfy a été identifiée comme une protéine indispensable pour l'agrégation alors qu'elle n'est pas nécessaire pour l'autophagie induite en réponse à une carence nutritive (Filimonenko et al. 2010). Sa sur-expression induit une réduction des inclusions de

Huntingtine dans des neurones primaires et une neuroprotection chez un modèle drosophile de la maladie de Huntington (Filimonenko et al. 2010). Alfy est localisée dans le noyau et est recrutée dans le cytoplasme en cas de stress d'agrégation, d'une manière dépendante de SQSTM1 (Filimonenko et al. 2010). Alfy possède un domaine PH-BEACH (*Pleckstrin Homology-Beige and Chediak-Higashi syndrome*) d'interaction avec SQSTM1 et une répétition de cinq domaines WD40 lui permettant d'interagir avec Atg5 et ainsi de recruter au niveau du cargo le complexe Atg5-12-16 (Clausen et al. 2010; Filimonenko et al. 2010). Alfy semble donc jouer un rôle d'adaptateur : elle connecte le cargo directement à la machinerie autophagique et permet ainsi la formation de la vésicule autour de l'agrégat à dégrader.

Les trois protéines précédemment citées (Alfy, p62 et NBR1) sont impliquées dans le recrutement de la machinerie autophagique au niveau des protéines mal-conformées mais nécessitent une activation de l'autophagie en aval. Pour cela, il doit exister un ou plusieurs senseurs qui détectent la présence des protéines altérées et enclenchent la réponse autophagique.

Carra *et coll* ont récemment mis en lumière un complexe cytosolique qui pourrait jouer le rôle de senseur. Ce complexe est constitué de deux protéines : BAG3 et HspB8 (Carra et al. 2008b). BAG3 appartient à la famille de co-chaperons BAG (*Bcl2-associated AthanoGene*) qui régulent la fonction ATPase des protéines de la famille Hsp70. HspB8, comme les autres membres de la famille des petites Hsp, est une protéine chaperon ATP-indépendante qui lie les protéines mal-conformées et facilite leur reformation en lien avec des protéines chaperons comme Hsp70. Des mutations d'une de ces deux protéines conduisent au développement de pathologies lourdes ; ainsi, les mutants K141E et K141N de HspB8 provoquent des neuropathies et des maladies neuromusculaires chez l'Homme alors que la mutation de BAG3 induit des desminopathies sévères. Plusieurs études rapportent une inhibition de l'agrégation de protéines pathologiques *in vitro* et *in vivo* lorsque l'une des protéines du complexe BAG3-HspB8 est sur-exprimée. A l'inverse, leur sous-expression ou l'utilisation de molécules inhibitrices du processus autophagique accélère l'agrégation (Carra et al. 2008b; Crippa et al. 2010; Carra et al. 2010). Ceci indique que le complexe BAG3-HspB8 réduit la concentration des protéines mal-conformées en activant le processus autophagique. La voie de signalisation n'est pas complètement élucidée mais elle aboutit à la phosphorylation par BAG3 du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α ; la traduction est donc inhibée, ce qui induit l'autophagie (Carra et al. 2009a).

De récentes études ont mis en évidence que d'autres protéines chaperons sont susceptibles de se lier à BAG3. Ainsi, HspB6 interagit avec BAG3 et la formation d'un complexe BAG3-HspB8-HspB6 est nécessaire pour l'élimination du mutant de la Huntingtine Htt43Q (Fuchs et al. 2009). La chaperonine CCT peut aussi être associée à BAG3 et le complexe formé est impliqué dans la lutte contre l'agrégation de l'actine monomérique (Fontanella et al. 2010). Il en résulte que BAG3 pourrait se lier à différentes protéines chaperons et ainsi former des complexes ayant une spécificité donnée pour une certaine catégorie de protéines mal-conformées.

C. La régulation de l'autophagie :

1) *mTOR* :

La protéine TOR (*Target Of Rapamycin*) a été découverte en 1991 comme une cible de la Rapamycine, un agent immunosuppresseur lors d'un criblage effectué chez *S. cerevisiae* (Heitman et al. 1991). Cette sérine-thréonine kinase appartient à la famille PIKK (*Phosphatidylinositol Kinase related Kinase*) et est impliquée chez la levure et les eucaryotes supérieurs dans la régulation de la transcription, de la traduction et du métabolisme. TOR intervient surtout comme élément central de la balance anabolisme/catabolisme. Son activation induit la synthèse protéique et inhibe l'autophagie ; son inhibition produit les effets inverses.

Le contrôle de la synthèse protéique par TOR se fait essentiellement par la phosphorylation de deux protéines : la p70S6Kinase (*70-kDa ribosomal protein S6 kinase*) et 4E-BP1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) (Yang et al. 2008). La p70S6Kinase, activée par TOR, phosphoryle la sous-unité S6 du ribosome 40S, ce qui induit la traduction de certains ARNm. 4E-BP1 est inhibé par TOR, ce qui lève le blocage de la traduction dépendante de la coiffe des ARNm (Yang et al. 2008).

Chez les mammifères, mTOR (pour *mammalian TOR*), l'homologue de TOR, intervient dans deux complexes protéiques : mTORC1 (contenant les protéines mTOR, Raptor et GβL ; sensible à la Rapamycine) et mTORC2 (composé des protéines mTOR, Rictor, mSin1 et GβL ; peu sensible à la Rapamycine) (Pattingre et al. 2008). En milieu riche en nutriments, mTORC1 inhibe l'autophagie par interaction directe avec le complexe d'initiation. En effet, la liaison entre Raptor et le domaine riche en prolines et sérines de ULK1 a pour conséquence la phosphorylation d'ULK1 et de mAtg13. Cette phosphorylation

inhibe l'activité de ULK1 et ainsi bloque l'autophagie. La carence en nutriments induit une dissociation de mTORC1. ULK1 et mAtg13 sont alors non-phosphorylées et l'autophagie est activée (Hosokawa et al. 2009a). mTORC2, dans les muscles squelettiques, inhibe l'autophagie en phosphorylant Akt/PKB (Sarbasov et al. 2005). Ce dernier est alors actif et inhibe le facteur de transcription FoxO3a. Parmi les gènes cibles de FoxO3a, *bnip3* et *lc3b* sont deux gènes impliqués dans l'autophagie ; ainsi, l'inhibition de FoxO3a bloque l'induction de l'autophagie (Zhao et al. 2007).

Les complexes mTOR, essentiellement mTORC1, sont activés par les nutriments, les facteurs de croissance et l'insuline et réprimés en cas de carence nutritive, de stress et de traitement par la Rapamycine (Figure 13) :

1. Le niveau de nutriments disponibles fait varier le ratio ATP/AMP. En cas de carence nutritive, ce ratio baisse, activant LKB1 qui, en retour, active par phosphorylation l'AMPK. Cette dernière peut inhiber mTORC1 de deux manières différentes : (i) en phosphorylant Raptor (Gwinn et al. 2008) ; (ii) en activant par phosphorylation le complexe protéique TSC1/TSC2 qui inhibe mTOR en bloquant la GTPase Rheb (Inoki et al. 2003; Bai et al. 2007).

2. La signalisation induite par la fixation de facteurs de croissance sur leur récepteur de type insuline suit une cascade kinase aboutissant à Akt/PKB (Yang et al. 2008) qui inhibe alors le complexe TSC1/TSC2, activant ainsi mTORC1 (Cai et al. 2006).

3. Outre les nutriments et les facteurs de croissance, de nombreux stress modulent l'activité de mTOR. L'hypoxie inhibe mTORC1 via une voie de signalisation faisant intervenir REDD1 et REDD2 en amont du complexe TSC1/TSC2 (Sofer et al. 2005). L'UPR inhibe mTOR en réduisant l'activité de la voie AKT/TSC/mTOR (Qin et al. 2010). Dans les cellules, mTORC1 est souvent localisé à proximité des mitochondries et son activité est bloquée en présence de mitochondries altérées et de stress oxydant (Desai et al. 2002).

4. Outre la Rapamycine, de nombreuses autres molécules ciblent mTOR. Par exemple, le Resveratrol inhibe mTOR, en activant l'AMPK (Vingtdeux et al. 2011).

2) *Becline-1* :

La Becline-1 a été initialement découverte en 1998 lors d'un crible double-hybride chez la levure visant à découvrir de nouveaux interacteurs de Bcl2 (Liang et al. 1998). La Becline-1 est une protéine à domaine BH3, ce qui lui permet d'interagir avec les protéines de la famille Bcl2 et notamment avec Bcl2 et Bcl_{XL}, qui inhibent l'autophagie (Maiuri et al. 2007; Oberstein et al. 2007). Becline-1 partage 30% d'identité de séquence avec la protéine Atg6 de *S. cerevisiae*, une protéine décrite la même année comme faisant partie d'un complexe protéique essentiel pour l'autophagie (Kametaka et al. 1998). Depuis ces découvertes, de nombreuses études ont été menées afin d'élucider la composition du complexe nécessaire à l'autophagie ainsi que sa régulation. Il en résulte que la Becline-1 appartient en réalité à au moins deux complexes régulateurs de l'autophagie : un activateur (le *Core Complex* avec la PI3K de classe III, Vps15 et Ambra1 ; cf. partie « Pré-autophagosome, p62) et un inhibiteur (avec Bcl2) (Patingre et al. 2005).

Dans le complexe inhibiteur, Bcl2 séquestre Becline-1, l'empêchant d'interagir avec les membres du *Core Complex*. Au sein des cellules, Bcl2 est localisé au niveau de la membrane des mitochondries et du RE. Seule la fraction présente à la surface du RE interagit avec la Becline-1, elle-même localisée au niveau du RE (Patingre et al. 2005). L'activation de l'autophagie passe donc par la rupture des interactions entre Becline-1 et ses inhibiteurs. Deux principaux modes d'action ont été décrits : soit par modifications post-traductionnelles d'un des interacteurs, soit par compétition entre les inhibiteurs et d'autres protéines pour la liaison au domaine BH3 de Becline-1. En ce qui concerne le premier mode, la principale protéine impliquée est la kinase JNK1. Une fois activée, suite notamment à une carence nutritive, elle phosphoryle Bcl2 sur trois résidus : les sérines 70 et 87 et la thréonine 69. Bcl2 perd alors son affinité pour Becline-1, libérant ainsi la protéine (Wei et al. 2008). Becline-1 peut aussi subir des modifications post-traductionnelles. Zalckvar *et coll* ont montré que la protéine kinase DAPK induit l'autophagie en phosphorylant la thréonine 119 de Becline-1, un résidu du domaine BH3. Cette phosphorylation affaiblit la liaison de Bcl2 et Bcl_{XL} et libère Becline-1 (Zalckvar et al. 2009).

La libération de la Becline-1 peut aussi survenir suite à une compétition par affinité pour son domaine BH3. Ainsi, lors d'une carence nutritive, la protéine pro-apoptotique Bad entre en compétition avec Bcl2 et Bcl_{XL} auprès de Becline-1 ; le complexe Bad-Becline-1 est retrouvé en majorité et l'autophagie est induite (Maiuri et al. 2007). D'autres protéines similaires à Bad ont aussi été décrites comme des inducteurs de l'autophagie et pourraient être

de possibles interacteurs de Becline-1 : Nix/BNIP3L (Zhang et al. 2008), Bik (Rashmi et al. 2008), Noxa, Puma et BimEL (Abedin et al. 2007).

IV. Les rôles physiologiques de l'autophagie :

A. L'autophagie basale :

Dans la plupart des organismes, l'autophagie est active à un taux basal. Dans cette configuration, elle tient une fonction de contrôle qualité cytoplasmique pour éliminer les protéines à longue durée de vie, les protéines agrégées, les organelles altérés et certaines structures inactives. Elle joue ainsi un rôle primordial dans l'homéostasie tissulaire de plusieurs organes des mammifères. L'utilisation de souris *knockout* conditionnelles pour certaines protéines de la famille Atg a permis de mettre en lumière l'importance de l'autophagie basale dans l'élimination des agrégats de protéines polyubiquitinées dans le cerveau, le foie, le cœur, les poumons et d'autres organes (Komatsu et al. 2006; Komatsu et al. 2005; Nakai et al. 2007; Kuma et al. 2004). Par exemple, la délétion des gènes *atg5* ou *atg7* dans le cerveau de souris induit la mort des neurones suite à une accumulation de protéines polyubiquitinées (Komatsu et al. 2006; Hara et al. 2006).

L'autophagie fonctionne à un niveau basal dans la majorité des types cellulaires, mais est aussi induite par des stimuli variés tels que certains stress (notamment thermique), des cytokines, des protéines mal conformées ou agrégées.

B. La carence nutritive :

Par la dégradation de portions du cytoplasme, l'autophagie recycle des acides aminés et lipides afin de fournir la cellule en énergie et lui permettre de survivre. Ce mécanisme est par exemple activé lors de la naissance où il permet au nouveau né de subvenir à ses besoins, suite à la rupture de l'approvisionnement placentaire (Kuma et al. 2004).

La carence nutritive induit une inhibition du complexe mTORC1 (Gwinn et al. 2008; Inoki et al. 2003). Elle induit également une hyperacétylation des tubulines qui a notamment pour conséquence l'activation de la kinase JNK. Cette dernière phosphoryle Bcl2 afin de libérer Becline-1 et donc d'induire l'autophagie grâce à la formation du complexe PI3K de classe III-Becline-1 (Geeraert et al. 2010).

C. L'immunité et l'inflammation :

1) *L'immunité innée* :

L'autophagie joue aussi un rôle important dans l'immunité innée. En effet, elle intervient dans l'élimination spécifique de nombreuses bactéries, plus particulièrement des bactéries du groupe A telles que *Streptococcus* ou *Staphylococcus aureus* (Deretic & Levine 2009). Elle a également été décrite comme impliquée dans la réduction de la réplication virale de deux virus à ARN simple brin : le virus de la mosaïque du tabac (Liu et al. 2005b) et le virus sindbis (Orvedahl et al. 2010).

Bien que l'autophagie soit un mécanisme important pour l'élimination de nombreux pathogènes, certains ont évolué afin d'échapper à la dégradation. L'évolution a retenu deux techniques différentes d'évasion : le camouflage et l'inhibition de l'autophagie. Par exemple, la protéine bactérienne ActA de *Listeria monocytogenes* recrute les complexes Arp2/3 et Ena/VASP qui tapissent la bactérie et empêche son ubiquitination et donc sa reconnaissance par le système autophagique (Yoshikawa et al. 2009). Certains Herpesvirus comme KSHV (*Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus*) ou HVS (*HerpesVirus Saimiri*) inhibent la formation de la forme II de LC3 grâce à la séquestration d'Atg3 par la protéine virale v-FLIP (Lee et al. 2009). HIV-1 détourne même la machinerie autophagique à son avantage. En effet, la protéine virale Gag se lie à LC3, ce qui lui permet d'être clivé (sans doute par HsAtg4B) et donc activée (Kyei et al. 2009).

2) *L'immunité adaptative* :

L'autophagie joue également un rôle important dans l'immunité adaptative. En effet, l'élimination par autophagie des pathogènes cellulaires permet la présentation des antigènes via les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II (CMH-I et CMH-II) (Schmid & Munz 2007). L'antigène nucléaire 1 du virus d'Epstein-Barr est par exemple reconnu par la machinerie autophagique. Cet antigène est ensuite présenté par le CMH-II à la surface des lymphocytes T CD4⁺ (Paludan et al. 2005).

D'autre part, il a été montré que la protéine autophagique Atg5 joue un rôle primordial au niveau des lymphocytes. En effet, elle est impliquée à différents stades du développement des lymphocytes B, que ce soit le maintien de la population de lymphocytes, leur prolifération ou encore la transition entre les progéniteurs et les lymphocytes matures (Miller et al. 2008).

Atg5 est également importante pour la survie et pour la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ après engagement via le TCR (*T Cell Receptor*) (Pua et al. 2007).

A l'inverse, l'autophagie peut être régulée par les lymphocytes, notamment dans les macrophages. Les cytokines secrétées par les lymphocytes T « *helper* » Th1 et Th2 influencent l'activité autophagique des macrophages : alors que l'Interféron γ et le TNF α (produits par les Th1) activent l'autophagie, les Interleukines 3 et 4 la bloquent (produits par les Th2) (Harris et al. 2009).

3) *L'inflammation :*

Tout comme NF κ B, l'autophagie est impliquée dans l'inflammation. Elle est par exemple impliquée dans la réponse à l'Interféron γ (IFN γ). L'IFN γ active Jak2-STAT1, selon un mécanisme dépendant de l'autophagie, ce qui aboutit entre autres à l'induction du facteur de transcription IRF1. Ce dernier active la transcription de plusieurs gènes codant pour des médiateurs cellulaires de l'inflammation. L'inhibition de l'autophagie (par 3-méthyladénine ou interférence à l'ARN) dans des fibroblastes embryonnaires murins induit une accumulation de radicaux libres de l'oxygène ainsi qu'une inhibition de STAT1 par la protéine SHP2 (*Src-Homology-2 domain containing Phosphatase 2*), ce qui inactive l'inflammation (Chang et al. 2010).

L'autophagie est également impliquée dans l'inflammation induite par les endotoxines chez le macrophage. En effet, elle limite la production des Interleukines 1 β et 18 en réponse à une stimulation par des lipopolysaccharides. Des macrophages déficients pour l'autophagie (interférence à ARN contre les ARNm d'*atg16L1* ou d'*atg5*) ont une réponse inflammatoire excessive avec une forte production des ces deux Interleukines (Saitoh et al. 2008).

D. Le développement :

Le recyclage des acides aminés et des lipides cellulaires par autophagie permettent l'élimination des structures cellulaires devenues obsolètes pendant la différenciation et le développement. Les ressources ainsi recyclées sont utilisées pour former de nouvelles protéines ou structures.

Cette hypothèse est confortée par des données génétiques obtenues chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum* et *Caenorhabditis elegans*. Alors que

les protéines Atg ne sont pas nécessaires pendant la croissance végétative chez la levure, elles deviennent essentielles lors de la carence nutritive et de la formation des spores qui en découle (Tsukada & Ohsumi 1993). Chez l'amibe, la mutation de plusieurs gènes *atg* entraîne une perte importante de la viabilité des spores pendant la carence nutritive (Otto et al. 2003). Enfin, en cas d'environnement défavorable, la larve du nématode passe en diapause « *dauer* » afin de survivre. Pendant la transition vers le stade *dauer*, l'autophagie est accélérée. L'inactivation de certains gènes *atg* bloque cette transition (Meléndez et al. 2003).

Des données récentes impliquent également l'autophagie dans le développement précoce chez la drosophile, la souris et les plantes. Chez *Drosophila melanogaster*, la déplétion du gène *draut1* (homologue d'*atg3*) conduit à la mort de la puppe pendant sa métamorphose (Juhász et al. 2003). Chez la souris, la mutation du gène *atg6/Becline-1* provoque une létalité embryonnaire précoce (Yue et al. 2003). Enfin, chez *Arabidopsis thaliana*, la mutation des gènes *apatg5* ou *apatg7* conduisent à des altérations phénotypiques comme la sénescence précoce des feuilles et l'absence de recyclage des ressources (Doelling et al. 2002).

Pendant le développement, l'autophagie participe donc au remodelage des cellules mais elle a également été décrite comme intervenant dans l'élimination de cellules et de structures obsolètes en tant que mécanisme de mort cellulaire programmé.

En effet, l'autophagie peut aussi être considérée comme un mécanisme de mort cellulaire à part entière, tout comme l'apoptose ou la nécrose. A ce titre, elle porte le nom de mort cellulaire programmée de type II, le type I étant l'apoptose et le type III, la nécrose. La mort cellulaire est le résultat d'un excès d'activité de l'autophagie qui aboutit à la destruction de structures et protéines essentielles à la survie de la cellule.

C'est le cas chez *Drosophila melanogaster* dont deux structures embryonnaires sont éliminées par autophagie : l'intestin moyen et les glandes salivaires (Denton et al. 2009; Berry & Baehrecke 2007). L'autophagie est également nécessaire au développement chez *Dictyostelium discoïdum*. L'autophagie induite par la carence nutritive dans les différentes cellules se transforme en mécanisme de mort uniquement dans les cellules présentant une expression du facteur DIF-1 (*Differentiation-Inducing Factor 1*) (Giusti et al. 2009).

E. Le vieillissement :

Le vieillissement s'accompagne d'une baisse de l'activité protéolytique globale chez la quasi-totalité des organismes vivants. Cette baisse a pour conséquence l'accumulation progressive de protéines et de structures cellulaires altérées (Ward 2002). L'autophagie participe à la lutte contre le vieillissement de part son action d'élimination, de manière ciblée ou non, des protéines et structures altérées comme les mitochondries et des radicaux libres oxygénés (Levine & Klionsky 2004).

Chez *D. melanogaster*, l'activation de l'autophagie conduit à l'allongement de la durée de vie des adultes et augmente la résistance des cellules nerveuses au stress oxydatif (Simonsen et al. 2008). De nombreuses études présentent la restriction calorique comme la meilleure manière d'étendre la durée de vie. Des études ont montré que la restriction calorique évite la baisse d'activité de l'autophagie liée à l'âge et prolonge ainsi la vie (Cuervo 2008).

En effet, la liaison du système lysosomal au système autophagique est mise à mal avec le vieillissement. Avec l'âge, le taux de la protéine membranaire LAMP2a diminue progressivement. Il a été montré que cette baisse est dans un premier temps compensée par l'augmentation des protéines chaperons intervenant dans la CMA. Toutefois, à un âge avancé, la compensation n'est plus possible, le taux de LAMP2a étant devenu trop faible (Terman et al. 2007; Cuervo & Dice 2000). Or, LAMP2a intervenant également dans la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, cette baisse réduit la maturation des autophagosomes, ce qui a pour conséquence une forte accumulation de vésicules immatures dans le cytoplasme des cellules âgées. La sur-expression de LAMP2a dans le foie de souris âgées permet de restaurer la CMA ainsi que la macroautophagie et d'accroître la survie (Zhang & Cuervo 2008).

La diminution de l'autophagie avec l'âge est aussi impliquée dans le développement de plusieurs maladies liées à l'âge dont le cancer et les maladies dégénératives, ce qui indique que sa fonction est de lutter contre le développement de ces maladies.

F. Le cancer :

L'étude du rôle de l'autophagie dans la tumorigenèse a débuté suite à des analyses génétiques réalisées sur le gène codant la protéine Becline-1. Ce gène est situé au niveau d'un locus de susceptibilité au cancer et il est retrouvé délété dans de nombreux cancers (cancer

des poumons, des ovaires, du sein ou encore de la prostate). Son implication dans la tumorigenèse a été démontrée par le fait qu'une expression ectopique de ce gène a pour conséquence, outre l'induction de l'autophagie, une baisse de la prolifération de cellules cancéreuses *in vitro* et une réduction des masses tumorales *in vivo* (Liang et al. 1999). Des souris hétérozygotes pour la mutation du gène *beclin* présentent une augmentation de l'incidence du développement de tumeurs spontanées et notamment des lymphomes des cellules B, des hépatocarcinomes ou des adénocarcinomes des poumons. Dans ces souris, l'autophagie est fortement réduite alors que la prolifération cellulaire est augmentée. Ces symptômes montrent que ce gène est un gène suppresseur de tumeurs haplo-insuffisant (Yue et al. 2003). D'autres gènes codant des protéines impliquées dans l'autophagie ont été décrits comme suppresseurs de tumeurs : *atg5* (Iqbal et al. 2009), *uvrag* (Ionov et al. 2004; Kim et al. 2008; Liang et al. 2006), *bif-1* (Coppola et al. 2008) ou encore *atg4c* (Mariño et al. 2007).

Outre ces gènes codant des protéines directement impliquées dans la machinerie autophagique, différents régulateurs du processus ont été décrits comme étant modifiés au cours de la tumorigenèse. Ainsi mTOR, le régulateur principal de la croissance cellulaire et de l'autophagie, est activé par de nombreux oncogènes (PI3Kinase de classe I, Ras, ...) et inhibé par plusieurs suppresseurs de tumeur (PTEN, ARH, ...) (Yecies & Manning 2011); (Arico et al. 2001; Lu et al. 2008).

Un autre régulateur de l'autophagie est le suppresseur de tumeur p53. En fonction de sa localisation, il active l'autophagie (nucléaire) ou il l'inhibe (cytoplasmique) (Feng et al. 2007; Budanov & Karin 2008; Crichton et al. 2006).

L'autophagie semble donc jouer un rôle primordial dans la lutte anti-cancéreuse. Cependant, ce rôle semble indirect et pourrait provenir de l'implication de l'autophagie dans la protection des cellules contre le stress génotoxique et dans le maintien de l'intégrité du génome. En effet, dans les cellules déficientes pour l'autophagie, l'ADN est endommagé (mutations, cassures) et l'absence de réparation provoque une amplification de ces dommages conduisant à une cancérisation de ces cellules (Mathew et al. 2007; Meek 2009). De plus, si ces cellules déficientes pour l'autophagie sont soumises à un stress métabolique, les dommages imposés à l'ADN, aux protéines et aux mitochondries vont accélérer la cancérisation (Mathew et al. 2009). Ces résultats semblent donc montrer que l'autophagie inhibe les premiers stades de la tumorigenèse mais elle semble au contraire nécessaire dans les stades plus avancés. En effet, il a été montré que les cellules au centre des tumeurs, qui ont plus difficilement accès aux nutriments et à l'oxygène, présentent un taux d'autophagie plus

élevé que les cellules à la périphérie qui sont moins soumises à ces stress (Degenhardt et al. 2006). L'autophagie est aussi importante pour les métastases. Par exemple, les cellules épithéliales cancéreuses présentent une forte induction de l'autophagie au moment où elles se détachent de la matrice extracellulaire, ce qui leur permet de survivre à la carence nutritive engendrée (Fung et al. 2008).

G. L'homéostasie cardiaque :

La croissance des cellules musculaires cardiaques est accompagnée d'une forte synthèse protéique et d'un remodelage important des éléments cellulaires existants afin de permettre la formation de nouveaux sarcomères. Une déficience en autophagie conduit à de sévères troubles cardiaques. Par exemple, la déficience en LAMP2 est à l'origine de la maladie de Danon. Les Hommes et les souris atteints par cette maladie présentent de sévères dysfonctionnements cardiaques associés à l'inhibition de l'autophagie (Saftig et al. 2001). De même, la déficience en Atg5 dans les cellules cardiaques de souris provoque à l'âge adulte une hypertrophie cardiaque associée à une dilatation du ventricule gauche et à un dysfonctionnement de l'activité contractile. Au niveau cellulaire, cette déficience induit une accumulation de protéines polyubiquitinées, une agrégation de mitochondries altérées et une désorganisation des sarcomères à l'origine du trouble contractile (Nakai et al. 2007). Ces résultats indiquent que l'autophagie basale joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie du cœur.

Par ailleurs, la baisse du niveau d'autophagie dans les cellules cardiaques au cours du vieillissement est responsable de différents troubles cardiaques inhérents à l'accumulation de protéines et organelles altérés, de radicaux libres de l'oxygène ou encore de Lipofuscine qui sont normalement éliminés lorsque le processus autophagique est actif (Brunk et al. 1992).

H. L'homéostasie du muscle squelettique :

La contraction musculaire est un des mécanismes cellulaires qui consomment le plus d'énergie. Ceci induit entre autres une quantité importante de protéines dénaturées, d'organelles altérés et de radicaux libres de l'oxygène. Ces éléments, toxiques pour la cellule, sont spécifiquement éliminés par le processus autophagique (Levine & Kroemer 2008). Par exemple, la Filamine est spécifiquement prise en charge par BAG3 et dégradée par la CMA,

lorsqu'elle est altérée. L'absence de dégradation, induit une myopathie sévère avec désintégration des disques Z (Homma et al. 2006).

L'autophagie basale semble bénéfique pour la survie des cellules musculaires. Les cellules musculaires de souris *knockout* conditionnels pour les gènes *atg5* ou *atg7* présentent une accumulation de protéines agrégées, de mitochondries altérées et sont ainsi soumises à l'activation de l'UPR et à un stress oxydant (Raben et al. 2008; Masiero et al. 2009). L'inhibition de la maturation des autophagosomes par la mutation de la protéine p97/VCP est aussi à l'origine de plusieurs maladies dont une myopathie avec corps d'inclusion, ce qui appuie le côté bénéfique de l'autophagie basale dans la survie des cellules musculaires (Ju et al. 2009).

Alors que l'autophagie basale semble bénéfique, son activation dans certains contextes pathologiques, présente un rôle néfaste pour la cellule. Plusieurs études vont dans ce sens. La mutation *SOD1*^{G93A} chez la souris induit une atrophie des muscles dépendante de l'autophagie (Dobrowolny et al. 2008). La délétion du gène codant pour le canal calcique DHPR induit aussi une atrophie musculaire dépendante de l'autophagie.

Le facteur de transcription FoxO3 semble être une protéine centrale pour l'activation de l'autophagie dans les cellules musculaires (induction des gènes codant les protéines LC3, PI3Kinase de classe III, BNIP3 et Cathepsine L) (Piétri-Rouxel et al. 2010). Chez des souris présentant une activation constitutive de FoxO3, une atrophie musculaire dépendante de l'autophagie est observée (Mammucari et al. 2007). Toutefois, l'activation de l'autophagie par FoxO3 est limitée par Runx1, un inhibiteur de l'autophagie dans les muscles squelettiques, ce qui permet de préserver la masse musculaire (Wang et al. 2005).

I. Les maladies neurodégénératives :

Le contrôle qualité des protéines est particulièrement important dans les neurones. En effet, leur faible renouvellement ne leur permet pas de transmettre à des cellules filles leurs déchets. Les neurones se retrouvent donc dans l'obligation de les éliminer. L'autophagie prend une grande part dans cette élimination (Winslow & Rubinsztein 2008). D'ailleurs, des souris déficientes pour l'autophagie développent de graves maladies neurodégénératives montrant l'importance de ce mécanisme catabolique dans l'homéostasie neuronale (Komatsu et al. 2006; Hara et al. 2006). Par exemple, les deux gènes *parkin* et *pink1* sont reliés à la maladie de Parkinson d'origine familiale. Leur mutation induit une absence de reconnaissance

et donc de dégradation des mitochondries altérées. Ces dernières relarguent des radicaux libres de l'oxygène responsables de la maladie de Parkinson (Narendra et al. 2008).

Plusieurs protéines pathologiques (Huntingtine, α -Synucléine, Tau et SOD1 par exemple) sont spécifiquement dégradées par autophagie (Ravikumar et al. 2002). Un défaut dans la reconnaissance de ces protéines ou dans le processus autophagique conduit à leur agrégation et au développement des maladies qui y sont associées (Huntington, Alzheimer, Parkinson et la Sclérose Latérale Amyotrophique respectivement) (Kegel et al. 2000; Li et al. 2008; Boland et al. 2008; Wong et al. 2008).

Outre le fait que les protéines pathogéniques ne sont pas dégradées, l'accumulation de vésicules immatures dûe au blocage de la maturation des autophagosomes est néfaste pour le neurone dans le sens où elle perturbe le trafic cellulaire (Yu et al. 2005; Kegel et al. 2000; Nixon et al. 2005). Cette accumulation peut devenir une source de produits toxiques supplémentaires. Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, les autophagosomes renferment le précurseur amyloïde APP et le complexe de clivage de ce précurseur pour former le peptide β 1-42. Il en résulte que l'autophagosome devient alors une plateforme pour la génération du peptide toxique β 1-42, ce qui accélère la dégénérescence (Yu et al. 2005). Chez des modèles de la maladie d'Alzheimer et de la démence frontotemporale, l'inhibition de l'autophagie est moins néfaste, du moins dans un premier temps, que son activation car elle réduit l'accumulation des autophagosomes et restaure un trafic intracellulaire correct (Lee & Gao 2009; Boland et al. 2008).

RESULTATS

Partie 1 : NFκB active l'autophagie après choc thermique

Au niveau cellulaire, le stress thermique affecte de nombreux processus dont la fluidité membranaire, la transcription et la conformation des protéines (apparition d'agrégats protéiques, désorganisation du cytosquelette) (Park et al. 2005). Parallèlement, les gènes de choc thermique sont préférentiellement transcrits, ce qui conduit à la synthèse des protéines chaperons Hsp (Liberek et al. 2008). Ces protéines permettent la reconformation des protéines dénaturées ou, en cas d'échec, leur adressage vers la sous-unité 26S du protéasome qui amorcera leur dégradation. Notre équipe a démontré que le choc thermique est aussi un puissant activateur du facteur de transcription NFκB (Kretz-Remy et al. 2001).

NFκB est un facteur de transcription inductible, appartenant à la famille Rel/NFκB, constitué de deux sous-unités : p50 et p65. En conditions normales, NFκB est inactivé par des protéines inhibitrices de la famille IκB. IκB, associé à NFκB, fait la navette entre le cytoplasme et le noyau et exerce sa fonction d'inhibition en bloquant la liaison à l'ADN et l'activité trans-activatrice du facteur de transcription NFκB (Hayden & Ghosh 2004). Son activation nécessite donc la dissociation de ce complexe. Notre laboratoire a montré que dans le cas d'un choc thermique, IκB n'est pas dégradé mais uniquement dissocié de NFκB, suggérant que l'activation de NFκB par le choc thermique ne suit pas la voie classique d'activation (Kretz-Remy et al. 2001).

Notre intérêt s'est ensuite porté sur les conséquences de l'activation de NFκB pendant la phase de récupération après choc thermique. Pour cela, des lignées stables de cellules tumorales HeLa, dépourvues de la sous-unité p65 de NFκB (interférence à ARN) ont été réalisées. Comme attendu, NFκB n'est pas activé par le choc thermique dans ces lignées, contrairement aux cellules témoins. De plus, le taux et l'induction des protéines Hsp sont similaires entre les cellules compétentes et incompétentes pour NFκB ; la réponse au choc thermique est donc fonctionnelle dans les deux lignées. Ainsi, ces dernières constituent un outil de choix pour l'étude du rôle de NFκB après un choc thermique.

NFκB jouant un rôle important dans la régulation de l'apoptose, nous avons commencé par analyser l'effet de l'absence de la sous-unité p65 de NFκB sur la résistance des cellules HeLa à un choc thermique ; nous avons pu observer que la déplétion de p65 sensibilise les cellules à la mort induite par le choc thermique. Cependant, nous avons montré que la protection exercée par NFκB, lors du choc thermique, ne dépend pas des fonctions anti-apoptotiques du facteur de transcription. En effet, les cellules déplétées en p65 traitées par

hyperthermie ne présentent pas d'externalisation des phosphatidylsérines membranaires. De plus, l'activation modérée des caspases est similaire dans les deux lignées.

Notre attention s'est alors portée sur l'autophagie. En effet, il a été décrit que le stress thermique peut activer l'autophagie (Komata et al. 2004) ; d'autre part, l'autophagie est un mécanisme intervenant à la fois dans la survie et la mort cellulaire (Codogno & Meijer 2005). Nous avons pu montrer que NFκB joue un rôle crucial dans la réponse au choc thermique en activant l'autophagie, qui augmente la survie des cellules à l'hyperthermie. En effet, dans les cellules dépourvues de NFκB, le choc thermique n'est plus capable d'activer l'autophagie (absence de vésicules autophagiques) et la mort cellulaire est fortement accrue. De plus, la stimulation artificielle de l'autophagie par la Rapamycine dans les cellules dépourvues de NFκB restaure une sensibilité presque normale des cellules à l'hyperthermie et son inhibition par la Bafilomycine A1 accroît cette sensibilité. Ces résultats démontrent donc pour la première fois que l'activation de l'autophagie par NFκB constitue un mécanisme de survie pour les cellules soumises à une hyperthermie.

Nous avons ensuite recherché à quels niveaux NFκB régule l'autophagie. L'induction de l'autophagie après choc thermique est fortement diminuée en présence d'Actinomycine D, un inhibiteur de la transcription ; ceci suggère que NFκB régule l'autophagie de par sa fonction de facteur de transcription et que des gènes cibles de NFκB pourraient donc réguler l'induction de l'autophagie en réponse au choc thermique. Une première analyse nous a permis de montrer que les régulateurs classiques de l'autophagie (protéines Atg, complexes Becline-1/PI3K de classe III et Becline-1/Bcl2, complexes mTORC1 et mTORC2) ne sont pas modulés par NFκB au cours de la réponse au choc thermique.

Enfin, puisqu'une des conséquences majeures de l'hyperthermie est la génération de protéines mal conformées ou agrégées, et que l'autophagie est un processus de dégradation des agrégats protéiques, nous nous sommes demandés si l'agrégation protéique pourrait constituer un lien entre hyperthermie et autophagie dépendante de NFκB. Pour tester cette hypothèse, les activités de NFκB et de l'autophagie ont été mesurées, suite à un choc thermique, dans des conditions où l'agrégation protéique est inhibée (utilisation de glycérol, connu pour stabiliser la conformation des protéines et inhiber leur agrégation induite par le stress thermique). L'induction de NFκB et de l'autophagie par le choc thermique en présence de glycérol est drastiquement réduite.

Nos résultats indiquent donc que l'augmentation, liée à l'hyperthermie, du taux de protéines agrégées est un événement primordial pour l'activation de l'autophagie dépendante de NFκB. Ce mécanisme serait donc impliqué dans la survie des cellules soumises à un choc thermique, sans doute par l'élimination des protéines dénaturées ou agrégées.

Research Paper

Autophagy activation by NFκB is essential for cell survival after heat shock

Mathieu Nivon,¹ Emma Richet,^{1,2} Patrice Codogno,³ André-Patrick Arrigo¹ and Carole Kretz-Remy^{1,*}

¹Université de Lyon; Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne; CNRS, UMR5534, Centre de génétique moléculaire et cellulaire. ²Division of Molecular and Cellular Neuroscience; Institute of Ophthalmology; London, UK; ³INSERM U756; Université Paris-Sud 11; Châtenay-Malabry, France

Abbreviation: 4EBP1, 4E-binding protein 1; HS, heat shock; Hsp, heat shock protein; mTOR, mammalian target of rapamycin; PE, phosphatidylethanolamine; PI, propidium iodide; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, short interfering RNA; UPS, ubiquitin proteasome system

Key words: NFκB, heat shock, autophagy, protein aggregation

The heat shock response is a widely described defense mechanism during which the preferential expression of heat shock proteins (Hsps) helps the cell to recover from thermal damages such as protein denaturation/aggregation. We have previously reported that NFκB transcription factor is activated during the recovery period after heat shock. In this study, we analyze the consequences of NFκB activation during heat shock recovery, by comparing the heat shock response of NFκB competent and incompetent (p65/RelA-depleted) cells. We demonstrate for the first time that NFκB plays a major and crucial role during the heat shock response by activating autophagy, which increases survival of heat-treated cells. Indeed, we observed that autophagy is not activated during heat shock recovery and cell death is strongly increased in NFκB incompetent cells. Moreover, if autophagy is artificially induced in these cells, the cytotoxicity of heat shock is turned back to normal. We show that despite a post-heat shock increase of Beclin 1 level in NFκB competent cells, neither Beclin 1/class III PI3K complex, Bcl₂/Bcl-X_L nor mTOR kinase are NFκB targets whose modulation of expression could be responsible for NFκB activation of autophagy during heat shock recovery. In contrast, we demonstrate that aberrantly folded/aggregated proteins are prime events in the signaling pathway leading to NFκB mediated autophagy after heat shock. Hence, our findings demonstrate that NFκB-induced autophagy during heat shock recovery is an additional cell response to HS-induced protein denaturation/aggregation; this mechanism increases cell survival, probably through clearance of irreversibly damaged proteins.

Introduction

The heat shock response is a ubiquitous cell defense mechanism.¹ In mammals, it is induced when the cell environment becomes deleterious and alters protein folding (as, for example, during heat shock, recovery from ischemia, UV irradiation or after exposure to heavy metals or oxidants). Many processes are affected by heat shock (HS); among them are protein folding,² membrane fluidity,³ cell cycle and its control,⁴ intracellular redox state⁵ and transcription.⁶ Indeed during a heat stress, heat shock genes are preferentially transcribed;⁷ the resulting heat shock proteins (Hsps) protect cells from thermally induced injuries by acting as molecular chaperones that help the cell to cope with aberrantly folded proteins.⁸ Several years ago, we reported HS as a strong inducer of HIV-1 LTR transcriptional activity.⁹ This induction required the presence of κB sites in HIV-1 LTR and resulted in the activation of NFκB transcription factor during HS recovery.¹⁰ Hence, despite observations describing an inhibition of NFκB induction by heat shock transcription factor (HSF) activation during the heat stress per se,⁷ we discovered that NFκB displays an intense activation during the recovery period subsequent to a heat challenge.¹⁰

NFκB belongs to the Rel/NFκB family of transcription factors consisting of heterodimers of various subunits including p65/RelA, p50, cRel, p52 and RelB.¹¹ The heterodimer p65-p50 is the most frequent association in numerous cell types and was thus referred as NFκB transcription factor. NFκB is an inducible factor that is inactivated by binding to inhibitory subunits of the IκB family. Most of IκB proteins inhibit NFκB by blocking both its DNA binding and transactivation ability.¹¹ Consequently, NFκB activation depends on the disruption of the NFκB/IκB complex. The majority of NFκB activators¹² induces NFκB/IκB dissociation via the so-called "canonical" pathway: IκB proteins are phosphorylated by IKK kinase leading to their recognition and polyubiquitination by the ubiquitin ligase machinery Skp1-Culin-Fbox and their degradation by the 26S proteasome.¹³ Then, free NFκB dimers translocate into the nucleus and induce transcription of target

*Correspondence to: Carole Kretz-Remy; CGMC; CNRS-UMR5534; Bât. G. Mendel; 16 Rue Dubois; Université Claude Bernard Lyon 1; Villeurbanne Cedex F-69622 France; Tel.: +33.4.72.44.79.57; Fax: +33.4.72.43.26.85; Email: Carole.Kretz@univ-lyon1.fr

Submitted: 12/17/08; Revised: 03/30/09; Accepted: 04/20/09

Previously published online as an *Autophagy* E-publication:
<http://www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/8788>

genes.^{11,13} In contrast, we demonstrated that NFκB activation during the recovery period after HS does not follow the “classical” pathway described above. It requires no IKK activation or IκBα phosphorylation and subsequent degradation but is concomitant with a dissociation of the NFκB/IκB complex.¹⁰ NFκB targets numerous genes; among them are those encoding cytokines, immune receptors, cell adhesion molecules, acute phase proteins, regulators of apoptosis or stress response proteins.¹² Hence NFκB is essential in many biological processes such as inflammation,¹⁴ innate and adaptive immunity,¹⁵ stress response,¹² apoptosis and cancer.^{16,17} Recently, a direct cross talk between NFκB and autophagy was demonstrated.¹⁸ Indeed, TNFα-induced NFκB activation was shown to repress autophagy¹⁹ and inhibition of NFκB was reported to increase starvation-induced cell death.²⁰ On the other hand, autophagy was described to regulate NFκB activity.^{21,22}

Autophagy is an evolutionary conserved mechanism whereby cells self-digest cellular components in the cytoplasm. During macroautophagy process (herein referred as autophagy) expanding-membrane structures called phagophores (or isolation membrane) are generated, isolate parts of the cytoplasm and form double-membrane autophagosomes. This phenomenon, regulated by *atg* genes, requires the interaction of class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) with the tumor suppressor Beclin 1,^{23,24} (mammalian homologue of the yeast Atg6) for the nucleation of the isolation membrane and two ubiquitin-like conjugation systems Atg12-Atg5 plus LC3-phosphatidylethanolamine (PE) (the mammalian orthologue of the yeast Atg8) for the elongation of the isolation membrane. Once formed, autophagosomes fuse with lysosomes, forming autophagolysosomes where autophagic cargos are degraded by lysosomal hydrolases; the resulting degradation products are released in the cytoplasm for recycling.²⁵ Autophagy is under the control of various signal transduction pathways; among them the autophagy inhibitor mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) plays a central role by inhibiting the formation of the Atg1-Atg13 complex indispensable for autophagosome formation.^{26,27} Several studies indicate a dual role of autophagy in cell survival and cell death. Autophagy is basically active in most cell types and is involved in the regulation of long-lived proteins turnover and also in the clearance of damaged organelles.²⁴ Moreover, when cells are in starvation conditions, autophagy is fundamental to cell survival by maintaining cellular ATP energy production and macromolecules synthesis.²⁸ Autophagy is also involved in the protection against muscular disorders and neurodegeneration through its ability to degrade protein aggregates.^{29,30} In contrast, autophagy can represent a nonapoptotic type of cell death^{29,31} and be involved in tumor suppression¹⁸ or tissue degradation.³²

Here we examined the consequences of NFκB activation during the recovery period after HS by comparing the HS response of NFκB competent and p65/RelA-depleted cells (shRNA expression). We demonstrate that NFκB plays a crucial role in the HS response because it is necessary for the induction of autophagy during the recovery period post-HS, a mechanism that increases cell survival to HS. We show that neither the tumor suppressor Beclin 1 nor mTOR and Bcl₂/Bcl-X_L protein families seem to be

NFκB transcriptional targets, which could be responsible for the dependency to NFκB of HS-induced autophagy. However, we provide evidence of the essential role played by aberrantly folded/aggregated proteins in the signaling pathway leading to NFκB activation and stimulation of autophagy during HS recovery.

Results

Characterization of p65-depleted cells. We previously reported that NFκB transcription factor is activated during the recovery period after HS.¹⁰ We therefore investigated the consequences of such activation by analyzing the HS response of cells devoid of the p65/RelA subunit of NFκB. To this end, stable transfectants of HeLa cells were obtained that express either control (HeLa-cont #1, HeLa-cont #2, HeLa cont #3) or p65 directed (HeLa-p65 KD (knockdown) #1, HeLa-p65 KD#2 and HeLa-p65 KD#3) short hairpin interfering RNAs (shRNAs) (see Materials and Methods). As shown in Figure 1A, the level of p65 was unaffected in control shRNA cell lines compared to HeLa cells whereas it was strongly decreased in cell lines expressing p65 shRNAs (HeLa-p65 KD#1, #2 and #3). We could also observe that the level of the p50 subunit of NFκB was unaffected in every cell line tested whereas a small decrease in the level of IκBα subunit was observed in HeLa-p65 KD cells. Moreover, the near absence of p65 in HeLa-p65 KD cells did not modify the level of the major Hsps: Hsp90, Hsp/Hsc70, Hsp60, Hsp40 and Hsp27. Next we analyzed NFκB activity after HS in these cell lines. To this end, cells were transiently transfected with a κB-dependent reporter gene (pNFκBluc, see Materials and Methods), submitted to a HS treatment and allowed to recover at 37°C for 24 hours (Fig. 1B). By quantifying luciferase activity we demonstrated that the expression of p65 shRNAs in HeLa-p65 KD#1, #2 and #3 cell lines drastically decreased the heat-induced expression of the κB-dependent reporter gene. Thereafter, since Hsps are major actors that protect cells from thermal-induced injuries and because we wanted to analyze the HS response of p65-depleted cells, we checked whether expression of the various shRNAs altered Hsps induction of expression after HS. To this end, the level of the major Hsps was analyzed by western-blot in HeLa, HeLa-cont and HeLa-p65 KD cell lines submitted or not to a heat stress followed by a recovery period of either 6 or 24 hours at 37°C. As seen in Figure 1C, the HS-induced expression of Hsps was not altered in the different shRNA cell lines, suggesting that Hsps expression is independent of p65 level. We next checked whether Hsps expressed in p65-depleted cells were still functional. Since Hsps help the cell to cope with aberrant protein folding by acting as molecular chaperones, we measured the folding capacity of control and p65-KD cell lines after HS using a luciferase refolding assay. This assay allows determining cell-folding capacity by quantifying cell extracts ability to restore the activity of constitutively expressed luciferase that has been inhibited by HS-induced misfolding/denaturation. As shown in Figure 1D, the level of recovered luciferase activity was similar in every cell lines during the HS recovery period, indicating that p65-depletion has no effect towards the cellular refolding capacity. Taken together, those results indicate that p65-depleted cell lines are incompetent for NFκB dependent gene expression after HS; moreover, the absence

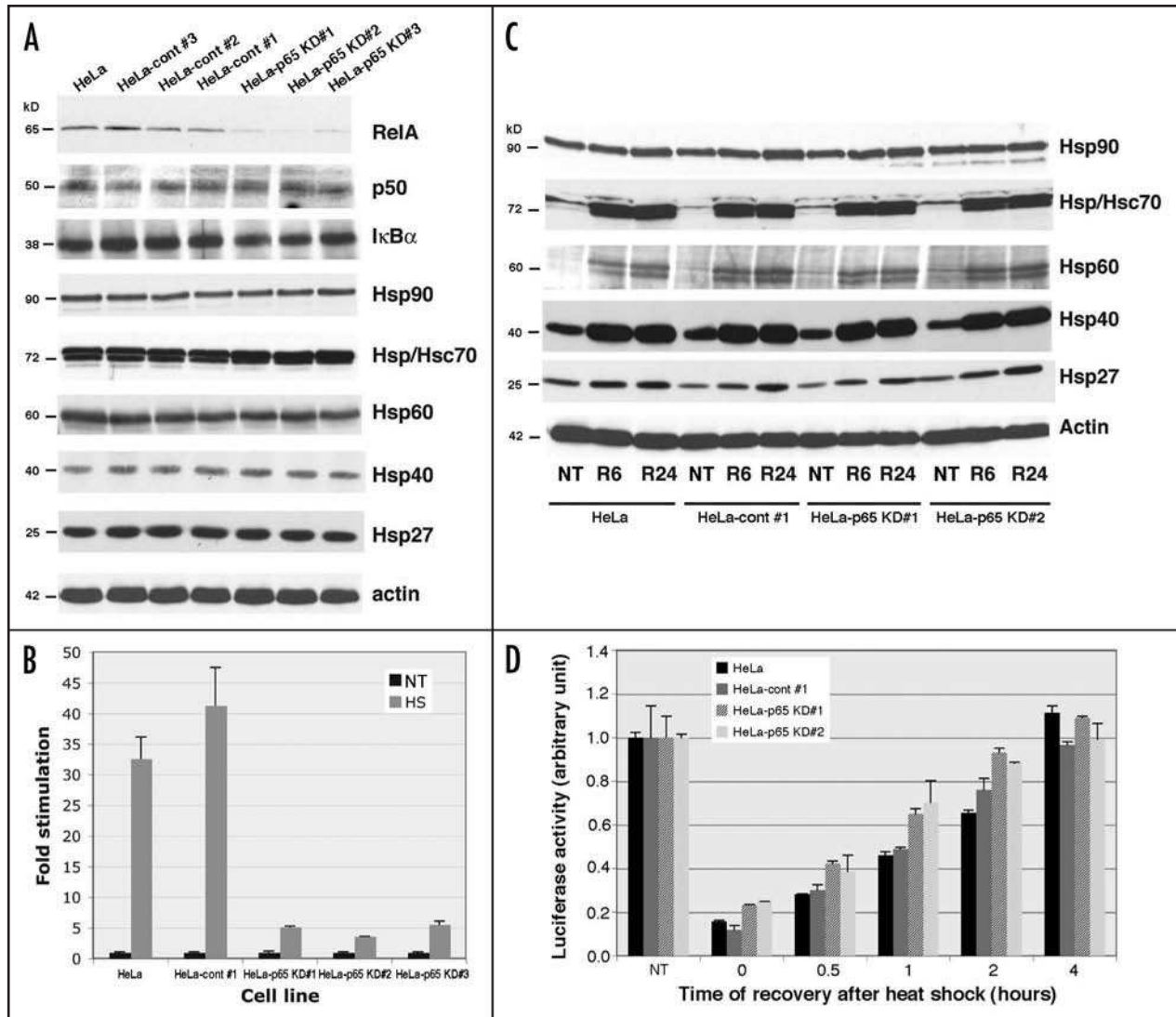


Figure 1. Characterization of p65-depleted HeLa cells. (A) Total proteins of HeLa, HeLa-cont #1, -cont #2, -cont #3 and HeLa-p65 KD#1, #2 and #3 cell lines were separated by SDS-Page and analyzed in immunoblots probed with specific antibodies for their content in p65/RelA, p50, IκBα polypeptides as well as main Hsps (Hsp90, Hsp/Hsc70, Hsp60, Hsp40 and Hsp27). (B) Cells were transiently transfected with pNFκBluc reporter construct and submitted (HS) or not (NT) to a 90 min HS treatment at 43°C. After a 24 h recovery period at 37°C, luciferase activity was measured. Results are presented as fold stimulation (ratio of luciferase activity after HS treatment vs. luciferase activity in untreated counterparts). (C) Cells were either left untreated (NT) or submitted to a 90 min HS treatment at 43°C followed by 6 (R6) or 24 (R24) hours of recovery at 37°C. Levels of main Hsps and Actin were analyzed by immunoblot. (D) Luciferase refolding assay. Cells were transiently transfected with pGL3-promotor vector. The day after, cells were submitted or not (NT) to a 20 min HS treatment at 43°C followed by 0 to 4 hours of recovery at 37°C before determination of luciferase activity.

of p65 does not alter Hsps expression and folding activity after HS. Therefore, p65-depleted HeLa cell lines are powerful tools to study the involvement of NFκB in cells recovering from HS.

p65 depletion sensitizes cells to heat shock. NFκB is an important modulator of cell death by inducing the expression of a number of anti-apoptotic proteins.^{16,17} We thus analyzed the heat resistance of p65-depleted HeLa cell lines. First, using trypan blue exclusion assay, we investigated the time course of the various cell lines viability at 37°C or after a HS treatment. At 37°C, the various shRNA cell lines (HeLa-cont #1, HeLa-65 KD#1 and #2) were growing rather similarly to HeLa cells, suggesting that p65 depletion is innocuous towards HeLa cells growth rate (Fig. 2A). When the same assay was performed after HS (Fig. 2B), a decreased

number of living cells was observed, due to HS induced cell death; then, 2 days after HS a regain of cell proliferation was observed. However, based on their growth behavior, two cell populations could be distinguished: cells that express normal p65 levels (HeLa and HeLa-cont #1) and cells that are p65-depleted (HeLa-p65 KD#1 and #2). For the latter, the intensity of HS-induced cell death was higher than in cells bearing normal p65 levels. Moreover, p65-depleted cells showed a regain of proliferation that was delayed and less intense. Hence, NFκB plays two complementary roles after HS: it protects cells from death and thereafter helps them to regain proliferation. These observations could be generalized to other cell types. Indeed, if compared to transient expression of control shRNAs, transient expression of shRNAs directed against p65 in

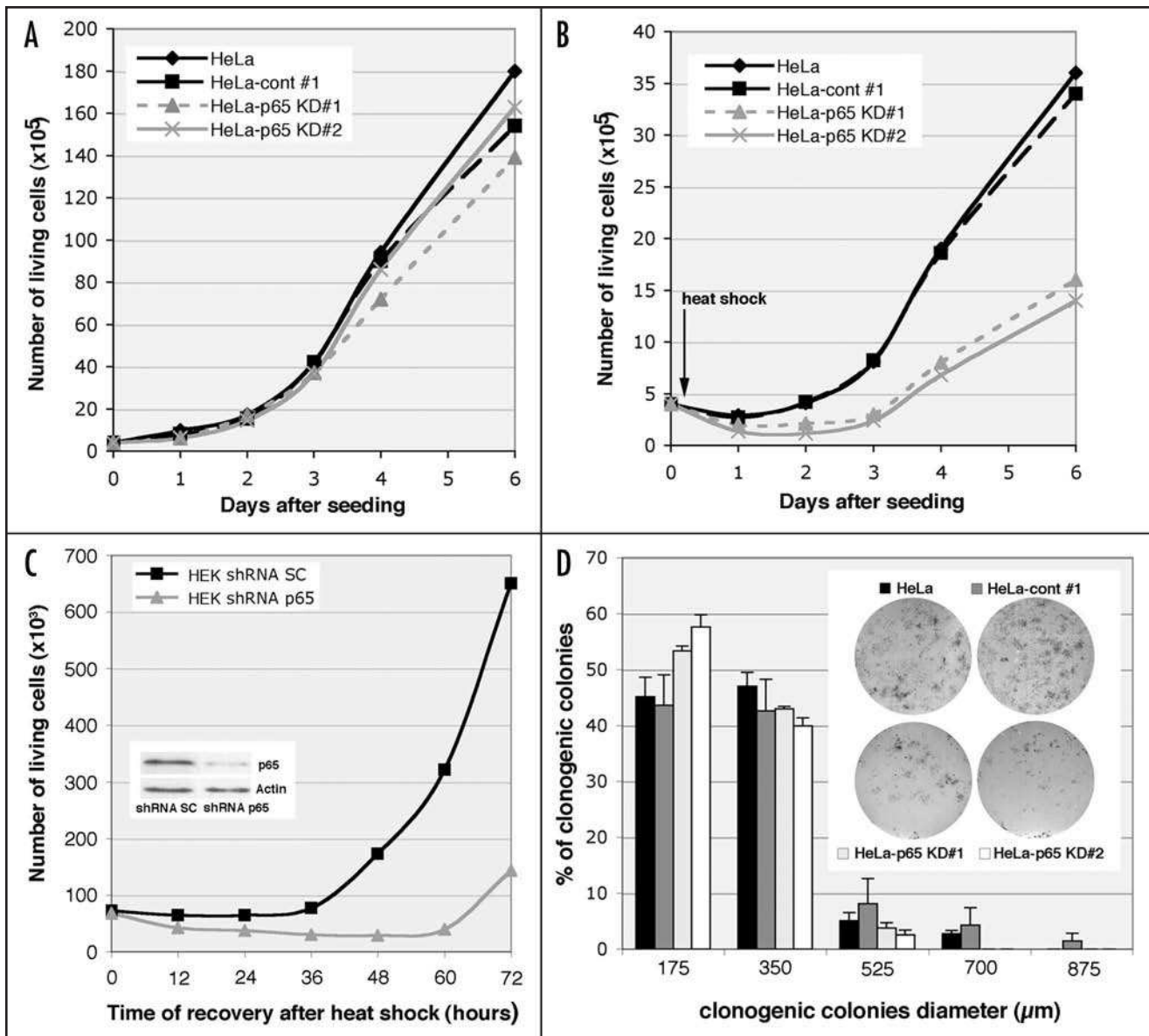


Figure 2. Cell growth and survival of heat-treated p5-depleted cells. (A and B) growth analysis of HeLa, HeLa-cont #1, HeLa-p65 KD#1 and KD#2 cell lines at 37°C (A) or after a 90 min HS at 43°C (B). In this latter case, HS was performed 4 hours after seeding cells into culture plates. Viable cells were numbered after trypan blue staining. (C) HEK 293 cells were transiently transfected with pSUPER-p65shRNA"25" (HEK shRNA p65) or pSUPER-SCshRNA (HEK shRNA SC). Two days after transfection, cells were submitted to a 90 min HS at 43°C. Viable cells were numbered after trypan blue staining every 12 hours after HS. Insert: analysis of p65 and Actin levels in HEK shRNA SC or HEK shRNA p65 by western blot, 2 days after transfection. The curves shown in (A–C) are representative of three independent experiments; SD are less than 10%. (D) Clonogenic colony formation assays of HeLa, HeLa-cont #1, HeLa-p65 KD#1 and KD#2 cell lines. Cells, seeded at same density, were submitted to a 90 min HS at 43°C and allowed to recover 5 days at 37°C before being stained with methylene blue and colonies diameter measured. The graph indicates the sizes of the colonies formed after HS in each cell line. Insert: staining of colonies formed in each cell line by methylene blue (these pictures are representative of 3 independent experiments).

human embryonic kidney 293 cells (HEK 293 cells) efficiently decreased p65 levels and sensitized HEK 293 cells to HS (Fig. 2C). The same observations were made with simian kidney COS cells (data not shown). Finally, our observations were confirmed by clonogenic colony formation assays performed with HeLa-cont and HeLa-p65 KD cell lines. After a 43°C HS treatment followed by 5 days of recovery at 37°C, the cellular clones formed were stained by methylene blue and photographed (Fig. 2D). HeLa-p65 KD cell lines formed very few clones compared to control cell lines

(HeLa and HeLa-cont #1). Moreover by evaluating the sizes of the colonies, we could observe that the percentage of small size colonies (175 μm) was only slightly increased in HeLa-p65 KD cells in comparison to control HeLa cells (HeLa and HeLa-cont #1) whereas control HeLa cells formed colonies of 700–875 μm that were not observed with HeLa-p65 KD cell lines. Therefore, those results confirm that p65 depletion sensitizes cells to HS and that NFκB, in addition to Hsps, plays a crucial role in cell survival and regain of proliferation after heat stress.

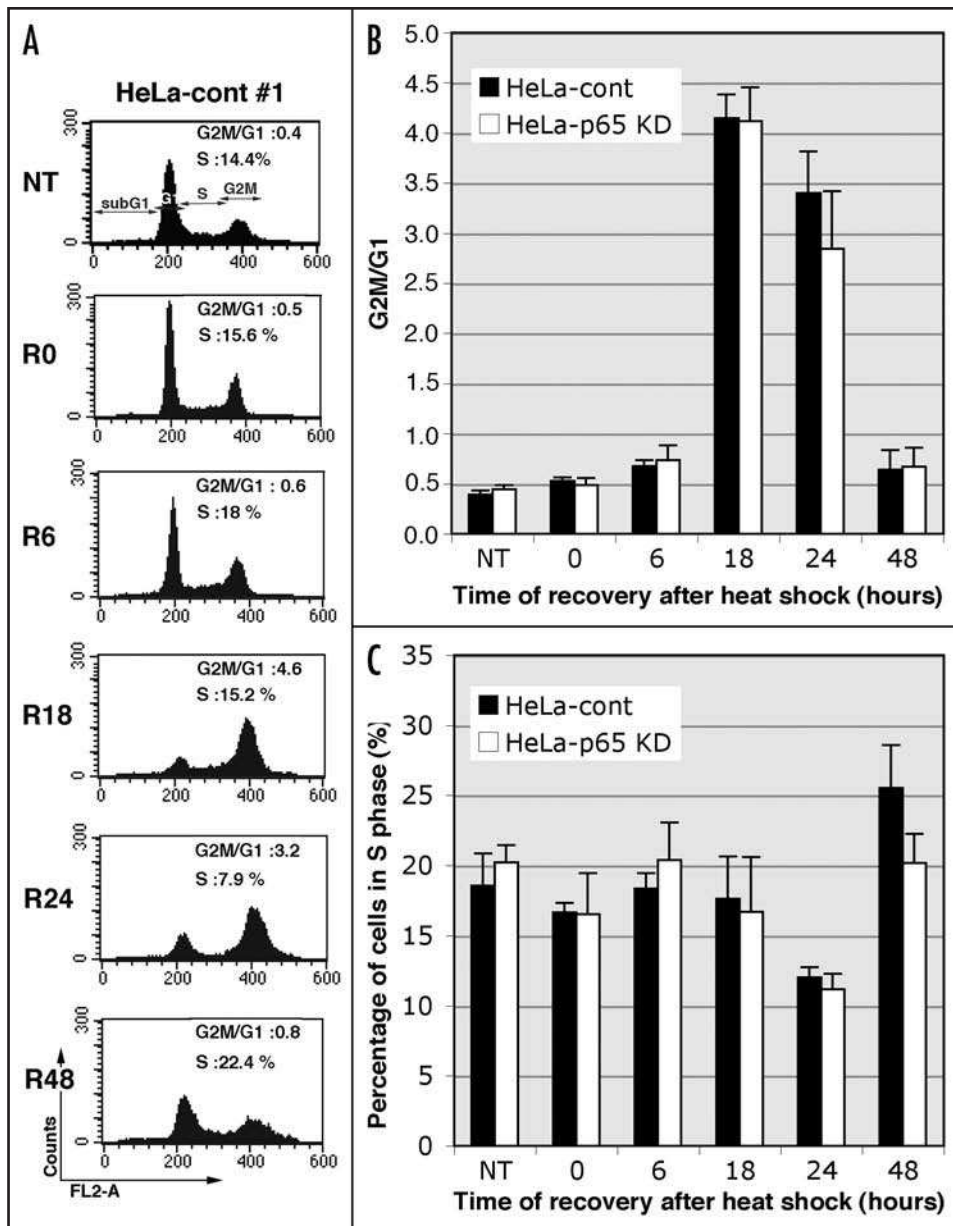


Figure 3. Cell cycle analysis of heat-treated p5-depleted and control cells. HeLa-cont #1, #2 and #4 and HeLa-p65 KD#1, #2 and #3 cell lines were submitted or not (NT) to a 90 min HS at 43°C before being incubated at 37°C during various time periods: 0 (R0), 6 (R6), 18 (R18), 24 (R24) and 48 hours (R48). At each time point, cells were stained by PI and analyzed by flow cytometry. (A) Pictures obtained by FACS analysis with HeLa-cont #1 cells. (B) Means of G₂M/G₁ ratios measured in HeLa-cont and HeLa-p65 KD cells during HS recovery. (C) Means of percentage of HeLa-cont and HeLa-p65 KD cells in S phase during HS recovery. Unpaired student t test indicates that there are no statistically significant differences between HeLa-cont and HeLa-p65 KD cells (p > 0.05).

We next tested if the delayed regain of proliferation observed in p5-depleted cell lines during HS recovery could be due to the involvement of NFκB into cell cycle modulation. To this end, cell cycle distribution of control and p5-depleted cell lines, exposed or not to HS, was measured using propidium iodide (PI) staining and FACS analysis (Fig. 3). We observed that in HeLa-cont #1 cells the ratio between G₂/M to G₁ populations increased from 0.4 under non-treated conditions to 4.6 after 18 h of recovery

post-HS and then decreased to 0.8 at the R48 recovery time point, indicating a G₂/M cell cycle arrest 18–24 h after HS (Fig. 3A). Similar results were obtained with the other control shRNA cell lines (HeLa-cont #2 and #4) and with the p5 shRNA cell lines HeLa-p65KD#1, #2 and #3. Indeed, means of G₂M/G₁ ratios in HeLa-cont cells and HeLa-p65 KD cells are not statistically different (p > 0.1) (Fig. 3B), indicating that p5 depletion does not alter the kinetic of recovery from heat-induced G₂/M cell cycle arrest. Moreover, as shown in Figure 3C, the modulation of the percentage of cells in S phase was identical in HeLa-cont and HeLa-p65 KD cells (p > 0.05). Therefore, the decreased survival of p5-depleted cells after a heat stress does not seem to be a consequence of NFκB ability to modulate cell cycle.

Sensitization of p5-depleted cells to heat shock is not due to increased apoptotic cell death. Depending on its intensity, HS has been described to induce either apoptosis or necrosis.^{33,34} Nature of the cell death induced is cell type and temperature dependent, necrosis occurring above a certain threshold. In order to determine how NFκB prevents cells from dying after HS, we first characterized the heat-induced death of p5-depleted cell lines. Control cells (HeLa and HeLa-cont #1) or HeLa-p65 KD#1 and #2 cell lines were submitted to a HS treatment followed by a recovery period at 37°C. Thereafter, cells were analyzed by flow cytometry using Annexin V-FITC/PI labeling. Figure 4A shows that in HeLa-cont #1 cell line the percentage of PI positive cells increased from 3.1% to 19.8% after a 24 h recovery period post-HS and then decreased to 7.2% 24 h later. Moreover, nearly no increase in Annexin V-FITC fluorescence was

observed during the recovery period, whereas a 16 h treatment with 0.5 μM of the apoptotic inducer staurosporine drastically increased the percentage of Annexin-V-labeled cells (data not shown). The absence of any increase in Annexin-V labeling was also observed in HeLa-p65 KD#2 cell line. However, in this cell line, the percentage of PI positive cells during HS recovery was much higher than in control cells (62.9% compared to 19.8% at R24 recovery time point). These results were confirmed using

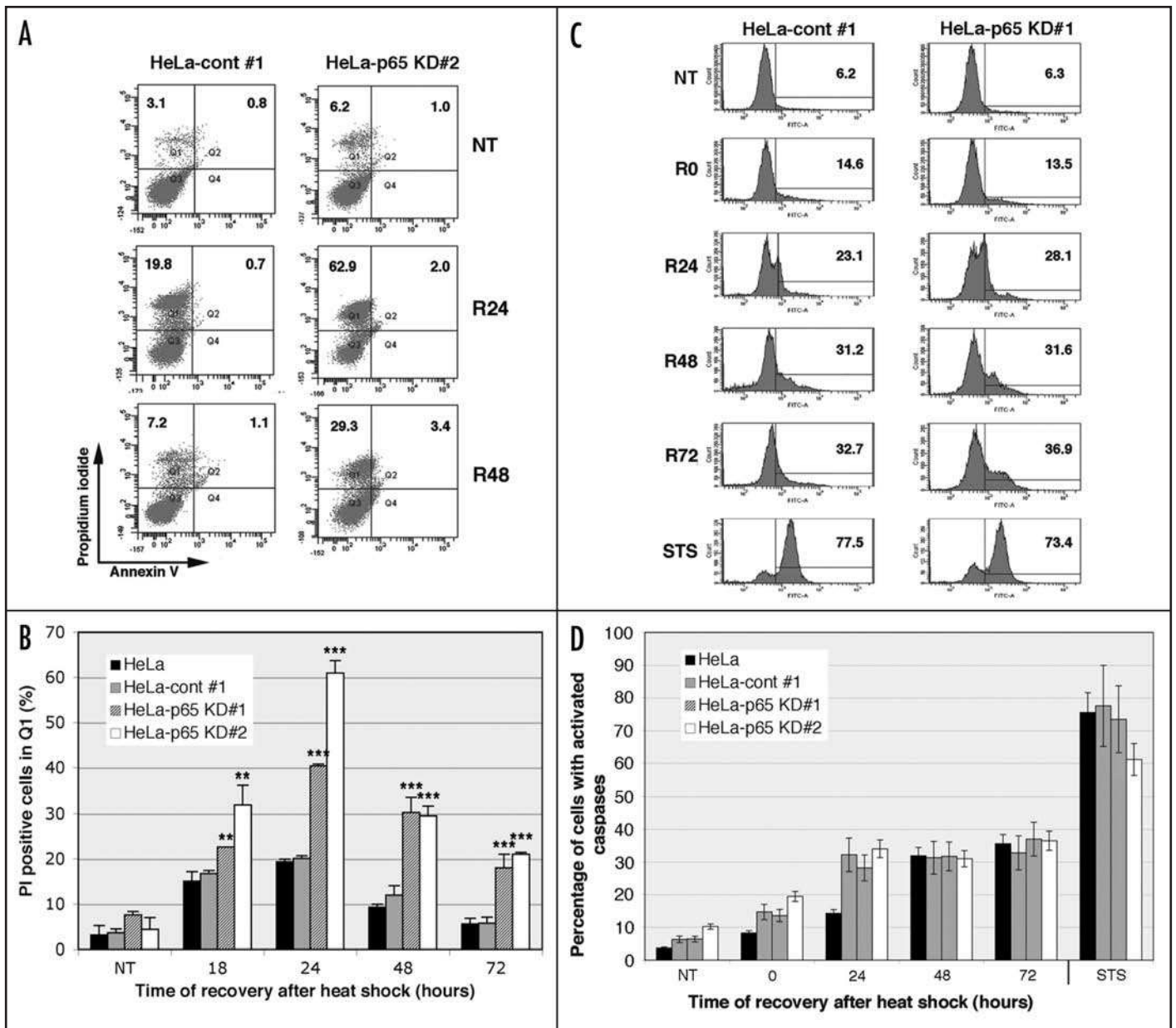


Figure 4. Enhanced death of p65-depleted cells in response to heat shock. HeLa, HeLa-cont #1, HeLa-p65 KD#1 and #2 cell lines were submitted or not (NT) to a 90 min HS at 43°C followed by a recovery period at 37°C of either 0 (R0), 18 (R18), 24 (R24), 48 (R48) or 72 (R72) hours. (A and B) at each time point, Annexin-V-FITC and PI staining of the various cell lines were performed. (A) FACSanto II analysis of HeLa-cont #1 and HeLa-p65 KD#2 cell lines in the absence of treatment (NT) or at the R24 and R48 recovery time points. Percentages of PI positive cells (Q1 area) and Annexin V- and PI positive cells (Q2 area) are indicated. (B) Summarization graph representing the percentage of PI positive cells (Q1 areas) in each cell line at the different time points, for three independent experiments. Significant differences from HeLa or HeLa-cont #1 cells are indicated (unpaired student t test with HeLa-p65 KD#1 vs. HeLa or HeLa-cont #1 and HeLa-p65 KD#2 vs. HeLa or HeLa-cont #1). (C and D) at each time point, cell lines were assessed for their caspases activity. As a positive control, each cell line was also submitted to 0.5 μM staurosporine treatment during 16 hours. (C) FACSanto II analysis obtained for HeLa-cont #1 and HeLa-p65 KD#1 cell lines. (D) Summarization graph of three independent experiments representing the percentage of cells with activated caspases in each cell line and at every time points. ANOVA test indicates no statistically significant differences between the four cell lines for the R24, R48 and STS points and no statistically significant differences for HeLa-cont #1, HeLa KD#1 and #2 for the earlier time points R0 and R24 ($p > 0.05$).

other shRNA cell lines as indicated in the summarization graph Figure 4B. In every cell line, the percentage of PI positive cells increased during the 24 first hours of HS recovery at 37°C and then decreased, due to regain of proliferation of living cells (see also

Fig. 2). But in contrast to control cells (HeLa and HeLa-cont #1), p65-depleted cells (HeLa-p65 KD#1 and #2) displayed a statistically significant higher percentage of PI positive cells ($p < 0.01$) and a delay in the decrease of the percentage of PI positive cells. Of

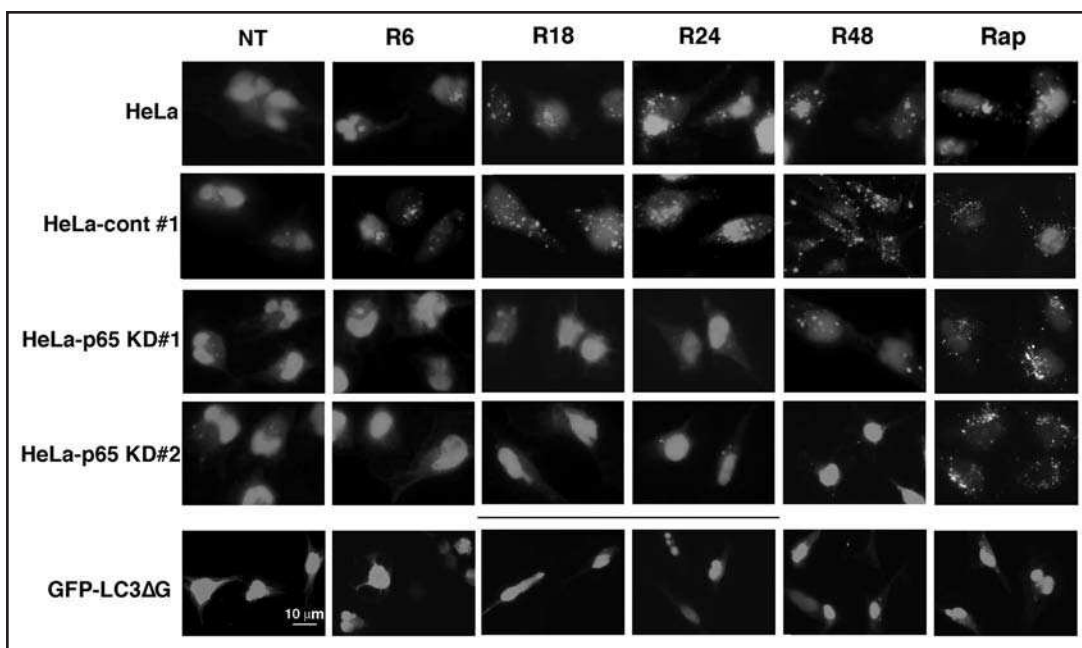


Figure 5. p65 depletion decreases heat-induced autophagy. HeLa, HeLa-cont #1, HeLa-p65 KD#1 and #2 cell lines were transfected with GFP-LC3 plasmid. The day after, cells were left untreated (NT) or submitted to a 90 min HS at 43°C followed by a recovery period at 37°C of 6 (R6), 18 (R18), 24 (R24) or 48 hours (R48). As a positive control, cells were also treated with 50 nM of rapamycin during 4 hours (Rap). Lower part of the figure: as a control for GFP-LC3 punctation, HeLa cells were transfected with GFP-LC3ΔG plasmid. GFP-LC3 staining was analyzed with a fluorescence microscope.

interest, we observed that the higher PI labeling of p65-depleted cells after HS was conserved in the presence of 10 μM z-VAD-fmk (data not shown).

Characterization of HS-induced cell death in p65-depleted cells was completed by measurement of caspase activation. Indeed, caspases have been reported to play an essential role in the execution of apoptosis after HS.^{34,35} Moreover, NFκB is known to stimulate the expression of caspase inhibitors.¹⁶ We therefore submitted HeLa, HeLa-cont #1 and HeLa-p65 KD (#1 and #2) cell lines to a HS treatment and quantified intracellular caspases activity with Apostat™ labeling. As shown in Figure 4C and in the summarization graph presented in Figure 4D, the percentage of cells that displayed activated caspases gradually increased during the 72 hours of recovery post HS; this increase was abolished in the presence of 10 μM z-VAD-fmk (data not shown). One-way analysis of variance suggested that there was no significant difference of caspases activity ($p > 0.05$) in HeLa, HeLa-cont and HeLa-p65 KD cells during the late recovery points (R48 and R72). However, for the first time points (R0 and R24) of HS recovery, caspases activity of HeLa cells slightly differed from shRNA-expressing cell lines (HeLa-cont #1 and HeLa-p65 KD#1 and #2). Nevertheless, in every cell line the increase in the percentage of cells showing activated caspases was quite modest (30%) when compared to the one (75%) observed after a 0.5 μM staurosporine treatment for 16 h. Hence, p65 depletion sensitizes HeLa cells to HS-induced death and this phenomenon is caspases- and phosphatidylserine externalization-independent. Therefore, NFκB does not appear to increase survival of heat-treated HeLa cells through an anti-apoptotic mechanism.

Autophagy induced by heat shock is drastically decreased in p65-depleted cells. In our search for a cellular process regulated by NFκB that could modulate cell survival, we paid particular attention to the autophagic process. Indeed, a mild HS was shown to induce autophagy in human malignant glioma cells³⁶ and autophagy was reported to increase cell survival or lead to cell death.²⁹ Moreover, it has been demonstrated that NFκB could inhibit TNFα induced autophagy.¹⁹ To determine the link existing between HS, autophagy and NFκB, we analyzed the autophagic activity after HS treatment in either HeLa, HeLa-cont #1 or HeLa-p65 KD (#1 and #2) cell lines. This was assessed by visualizing the formation of autophagic vacuoles using a GFP-LC3 probe (see Materials and Methods) whose PE-conjugated form (GFP-LC3-II) inside cells is associated with autophagosomal membranes. The association of GFP-LC3-II to autophagosomes leads to a punctate fluorescence versus diffuse cytosolic and nuclear staining in nonautophagic cells. Cells were transfected with GFP-LC3 expression vector and submitted to a heat stress. In control cell lines, the appearance of a punctate fluorescence could be detected as soon as after 6 hours of recovery post-HS and was still visible after 48 hours of recovery (Fig. 5); moreover, autophagy was as intense as what was observed after a 4 h treatment with 50 nM rapamycin (a classical autophagy inducer). In contrast, fluorescence remained diffuse during HS recovery in HeLa-p65 KD cells and only very few punctations could be observed 48 hours after HS while a rapamycin treatment could induce autophagy in these cells. Moreover, when the same experiment was performed with HeLa cells transfected with a negative control vector (GFP-LC3ΔG mutant probe that cannot conjugate to PE), no punctate staining was observed. These latter

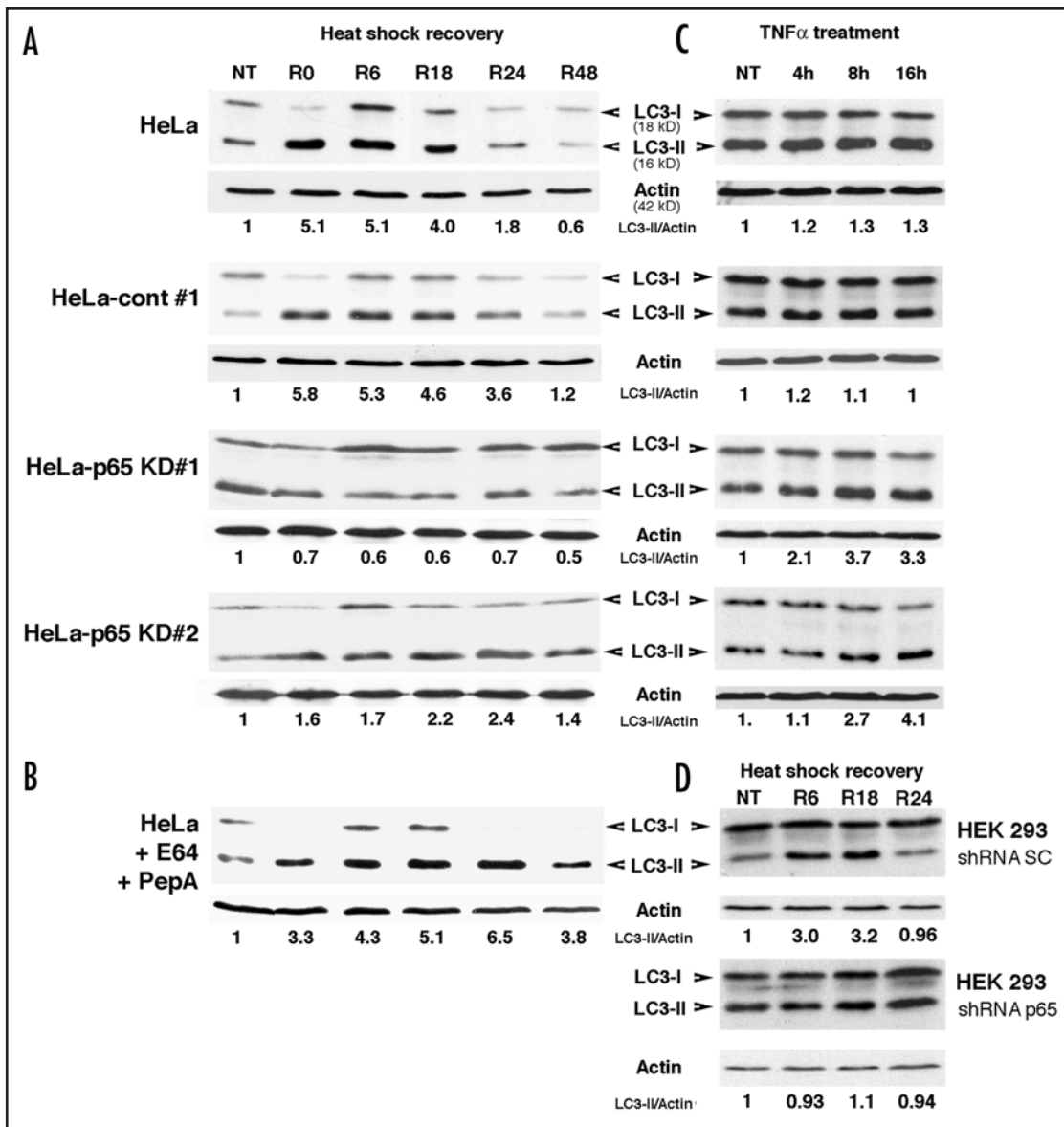


Figure 6. p65 depletion decreases LC3 conjugation to phosphatidylethanolamine during heat shock recovery. (A) HeLa, HeLa-cont #1, HeLa-p65 KD#1 and #2 cell lines were submitted or not (NT) to a 90 min HS at 43°C followed by a recovery period at 37°C of either 0 (R0), 6 (R6), 18 (R18), 24 (R24) or 48 (R48) hours. (B) Control analysis performed with HeLa cells submitted to the same HS treatment but in the presence of 5 μM cathepsin inhibitors pepstatin A and E64d. The inhibitors were added 15 min before the beginning of the HS treatment. (C) Control analysis for autophagy induction in HeLa-p65 KD cells. HeLa, HeLa-cont #1, HeLa-p65 KD#1 and #2 cell lines were submitted or not (NT) to a treatment of 4,000 U/ml of TNFα during 4, 8 or 16 hours. (D) HEK 293 cells were transiently transfected with control shRNA (shRNA SC) or p65-directed shRNA (shRNA p65). 48 h after transfection, cells were submitted or not (NT) to a 90 min HS at 43°C followed by a recovery at 37°C of 6, 18 or 24 hours. For each experiment, 15 μg of whole cell protein extracts were analyzed in immunoblots probed with a specific antibody directed against LC3 protein. Hybridization with anti-Actin antibody was also performed to ensure that equal protein loading was performed in each lane. The ratio between the intensity of LC3-II band vs. Actin band for each lane is indicated.

results thus indicate that the punctation observed with GFP-LC3 probe in recovering HeLa cells results from autophagosome formation and not from any HS-induced aggregation independent of lipidation.

The p65-dependent autophagosomes formation after HS was confirmed by analyzing the appearance of the PE conjugated form of LC3 (LC3-II) by western blot. Indeed, an accumulation of LC3-II (up to 5.1 or 5.8 fold) was observed at 0, 6 and 18 hours

post HS in HeLa and HeLa-cont #1 cell lines (Fig. 6A) followed by a gradual decrease to reach basal levels at R48 recovery point. In contrast, in HeLa-p65 KD cell lines, the level of LC3-II was nearly not modified during HS recovery (maximum of 2 fold induction), confirming that the autophagy process induced by HS is inhibited in p65-depleted cells. We next checked whether the increased conjugation of LC3 to PE observed in HS-treated control cells was associated with increased autophagic activity. HeLa cells were

submitted to a HS treatment in the presence of E64d, an inhibitor of cathepsins B, H and L and pepstatin A, a cathepsins D and E inhibitor (Fig. 6B). These inhibitors have been described to block the final step of autophagy (maturation) that leads to the lysosomal degradation of LC3-II. Addition of these inhibitors enhanced the increase of LC3-II level observed during HS recovery (up to 6.5 fold) and maintained it for a longer period of time (3.8 fold induction at the R48 time point compared to 0.6 in untreated HeLa cells, Fig. 6A upper lane). Hence, our results demonstrate that autophagy is induced and LC3 turnover is increased in cells submitted to a HS treatment.

As a control, the level of LC3-II was also measured in HeLa-cont and HeLa-p65 KD cells after a TNFα treatment (Fig. 6C). We observed that TNFα did not induce any increase of LC3-II level in HeLa and HeLa-cont #1 cells (maximum of 1.3 fold induction). In contrast, LC3-II level was increased up to 3.3 or 4 fold, after a 16 hours TNFα treatment in HeLa-p65 KD#1 and #2 respectively, confirming the study of Djavaheri-Mergny and coworkers describing an inhibition of TNFα-induced autophagy by NFκB.¹⁹ At last, p65-mediated activation of autophagy during HS recovery could be generalized to other cell types. Indeed, we observed an increased LC3-II accumulation in HEK 293 cells submitted to a HS treatment whereas this increase was no more detectable in HEK 293 cells transfected with shRNA directed against p65 (Fig. 6D). Similar observations were performed in COS cells (data not shown). Taken together, our results therefore demonstrate that autophagy is activated during the recovery period after a HS. However, even if p65-depleted cells are still competent for the formation of autophagosomes (see rapamycin and TNFα treatments), the induction of the autophagic process by HS requires NFκB transcription factor activation.

p65-dependent autophagy protects cells from heat shock induced death. Since p65-depleted cells were more sensitive to HS treatments and showed a weaker induction of autophagy in response to HS, we hypothesized that autophagy could be involved in cell protection against this type of stress. To test this hypothesis, HeLa cells were submitted to either a HS treatment, a 10 nM treatment with the autophagosome maturation inhibitor bafilomycin A1 or a combination of both treatments, before analyzing cell viability by trypan blue exclusion assay. As seen in Figure 7A, the presence of bafilomycin A1 in the culture medium significantly decreased cell viability after HS; 36 h after HS only 38% of cells survived the combined treatment compared to 64% when cells were exposed to HS alone ($p < 0.001$). As a control, cell viability was not significantly modified during the first 24 hours of a single bafilomycin A1 treatment ($p > 0.05$) and only slightly decreased after 36 hours of treatment. To confirm those results, cell survival to HS was also measured when *atg5*, an essential autophagy gene, was knocked down by siRNA transfection (Fig. 7B). Western blot analysis showed that *atg5* siRNAs were efficient to decrease Atg5 protein level. We also observed that *atg5* siRNA transfection did not modify HeLa cell survival in comparison to control siRNA transfection ($p > 0.05$). In contrast, the inhibition of *atg5* expression greatly decreased HeLa cells viability post-HS in comparison to cell viability observed in control siRNA transfected cells ($p < 0.05$).

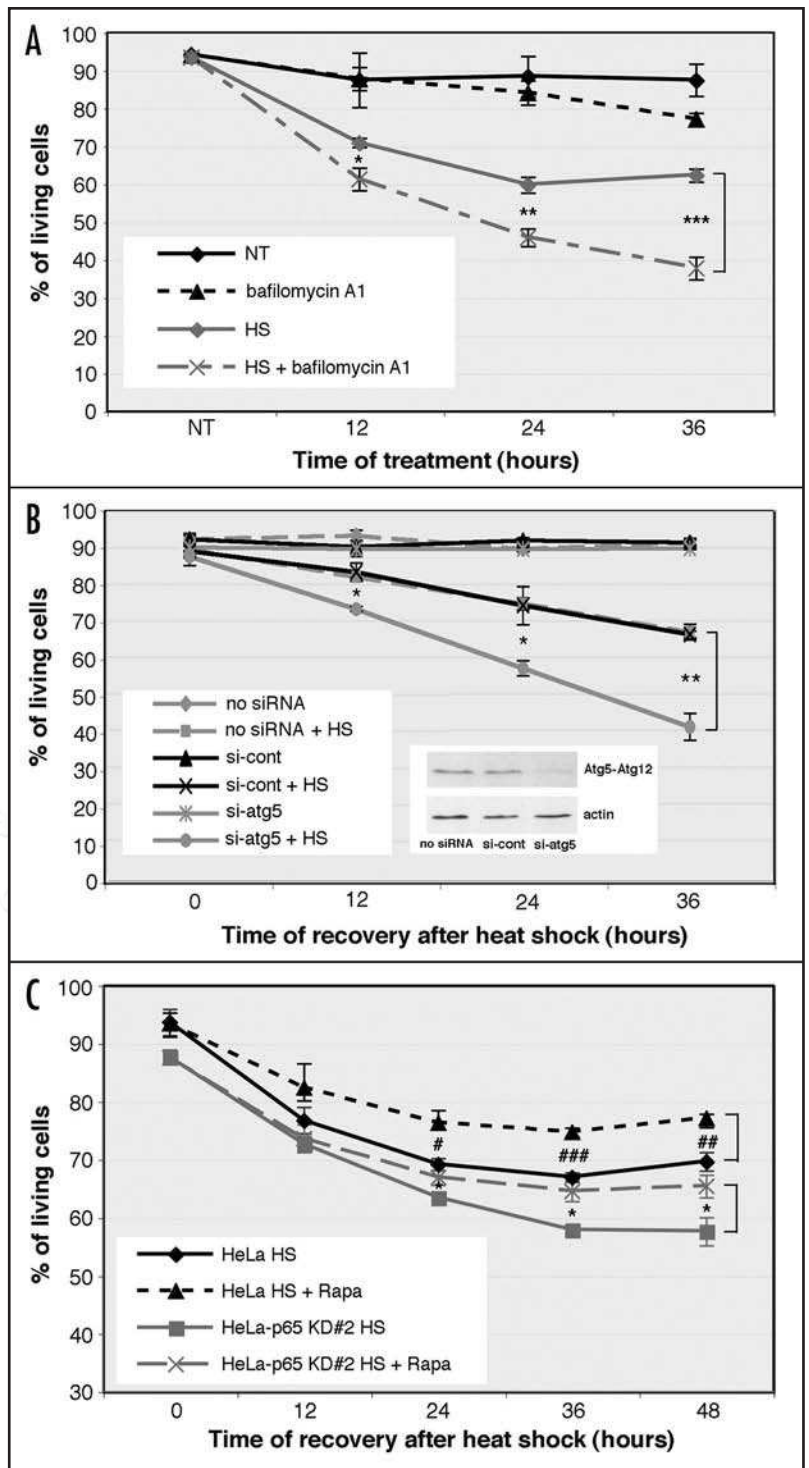
We then performed the reverse experiment by measuring cell survival to HS when autophagy is activated. HeLa cells and HeLa-p65 KD#2 cells were submitted to a HS treatment in the presence of 50 nM of the autophagy activator rapamycin (Fig. 7C). This treatment was shown to induce the formation of autophagosomes in both cell lines (see Fig. 5). We could observe that activation of autophagy by rapamycin treatment significantly enhanced cell survival to heat shock in both cell lines ($p < 0.05$). Of interest, in p65-depleted cells that are unable to undergo autophagic process during the recovery period after HS, the rapamycin stimulation of autophagy restored, during the 36 first hours of recovery, a sensitivity to heat shock statistically identical to that observed in HeLa cells ($p > 0.05$). Hence, our observations indicate that autophagy activation after HS is a survival mechanism. Moreover, rapamycin treatment was able to reverse the increased sensitivity to HS of p65-depleted cells, demonstrating that a major part of NFκB mediated protection against heat-induced death is achieved by activating autophagy.

Analysis of autophagy regulators in control and p65-depleted cells submitted to a heat shock treatment. In order to determine if NFκB could transcriptionally regulate the activation of autophagy during HS recovery, we checked whether LC3-II accumulation during HS recovery was still detectable when transcription is inhibited. To this end, HeLa cells were submitted to a 90 min HS treatment at 43°C in the presence or not of 1 μg/ml of actinomycin D and the level of LC3-II was quantified by western blot analysis (Fig. S1). We could observe that actinomycin D efficiently inhibited transcription since Hsp70 accumulation during HS recovery (due to HS-induced transcription) was strongly decreased (Fig. S1). Moreover, LC3-II accumulation was greatly decreased in the presence of actinomycin D suggesting that transcription of NFκB-target genes is involved in the regulation of HS-induced autophagy.

We therefore analyzed if major pathways that are known to regulate autophagy could be NFκB targets. First, we checked if mTOR level and/or activity could be modulated by NFκB during HS recovery. HS did not modify mTOR level in any of the cell lines analyzed (data not shown). We then examined mTOR activity by analyzing its phosphorylation status in heat-treated HeLa, HeLa-cont #1 and HeLa-p65 KD (#1 and #2) cell lines. The phosphorylation level of this protein decreased immediately after HS (R0) and increased again after 6 hours of recovery to reach normal levels 48 hours post-HS (Fig. 8A). However, the modulation of mTOR phosphorylation level was identical in control and p65-depleted cells. Similar observations were made regarding the phosphorylation status of mTORC1 substrate 4EBP1 and mTORC2 substrates Akt and FoxO3A (Fig. S2A and B, respectively). Hence, HS induces a transient inhibition of mTOR activity during the recovery period post-HS, which correlates with the induction of an autophagic process; however NFκB does not activate autophagy by modulating the mTOR pathway (mTORC1 and mTORC2) since modulation of mTOR activity during HS recovery was observed in both control and p65-depleted cells. We next analyzed the level of Bcl₂ and Bcl-X_L proteins during HS recovery since these anti-apoptotic proteins were shown to

Figure 7. Autophagy is a survival mechanism against heat shock. (A) HeLa cells were either left untreated (NT) or submitted to a 90 min HS at 43°C in the presence (HS + bafilomycin A1) or not (HS) of 10 nM bafilomycin A1. Bafilomycin was added just after the heat shock treatment. As a control for toxicity, cells were also treated with 10 nM bafilomycin A1 alone. Viable cells were numbered after trypan blue staining every 12 hours after HS. (B) HeLa cells were transfected or not (no siRNA) with control (si-cont) or atg5 siRNAs (si-atg5). 72 hours after transfection, cells were submitted (HS) or not to a 90 min HS at 43°C. Viable cells were numbered after trypan blue staining just after (0) and every 12 hours after HS. Insert: western blot analysis of Atg5 and Actin levels 72 hours post-transfection. (C) HeLa and HeLa-p65 KD#2 cell lines were submitted to a 90 min HS at 43°C in the presence (HS + Rapa) or not (HS) of 50 nM rapamycin. Rapamycin was added to the culture medium 4 hours before the beginning of the heat treatment. Viable cells were numbered after trypan blue staining just after (0) and every 12 hours after HS. Unpaired student t test was performed between (A) HeLa NT vs. HeLa + bafilomycin A1, HeLa + HS vs. HeLa + HS + bafilomycin A1; (B) si-cont vs. si-atg5 and si-cont + HS vs. si-atg5 + HS; (C) HeLa HS vs. HeLa HS + Rapa, HeLa-p65 KD#2 HS vs. HeLa-p65 KD#2 HS + Rapa and HeLa HS vs. HeLa-p65 KD#2 HS + Rapa.

inhibit Beclin 1-dependent autophagy by competing with class III PI3K for the binding to Beclin 1.³⁷ As shown in Figure 8B, Bcl-X_L and Bcl₂ (data not shown) levels were not modified in every cell lines during the recovery period post-HS. Identical observations were made for class III PI3K levels (Fig. 8C). As for the tumor suppressor Beclin 1, we could observe, in control cells, an increase of its level until 18 h of recovery at 37°C and thereafter a decrease until 72 h of recovery. In contrast, the level of this protein was not modified in p65-depleted cells (HeLa-p65 KD#1 and #2) (Fig. 8D). However, differential analysis of microarrays performed with mRNAs from HeLa control cells and HeLa-p65 KD#2 cells submitted or not to a HS treatment did not allow us to observe any modulation of *beclin 1* transcript level after HS, in contrast to other genes whose expression was differentially regulated (data not shown). Hence, those results suggest that *beclin 1* gene transcription is not under the control of NFκB transcription factor during HS recovery. We then performed co-immunoprecipitation analysis to check if the increase of Beclin 1 level observed in control cells during HS recovery, could mean that more class III PI3K/Beclin 1 complexes are formed in NFκB competent cells. A slight increase of Beclin 1/class III PI3K complexes after 6 hours of recovery post-HS was observed in both NFκB competent and incompetent cells (Fig. S3), demonstrating that the increased Beclin 1 level observed during HS recovery in control cells is probably not responsible for the NFκB regulation of HS-induced autophagy. At last, during HS recovery, we did not detect any differential modulation (control cells versus p65-depleted cells) of the level of Atg proteins that are essential for the formation of the pre-autophagosome (Atg5-12, Atg16L1 and Atg3) or Atg protein involved in the



expansion of the pre-autophagosome (Atg9L1) (Fig. S4). Taken together those results favor the hypothesis that classical regulators of the autophagic pathway such as mTOR, Beclin 1/class III PI3K and Atg proteins are not NFκB targets that could explain the dependency to NFκB of HS-induced autophagy.

Protein aggregation: a clue for the heat shock induced- and NFκB regulated-autophagy? We next determined in which way autophagy could be involved in the protection of cells from thermal

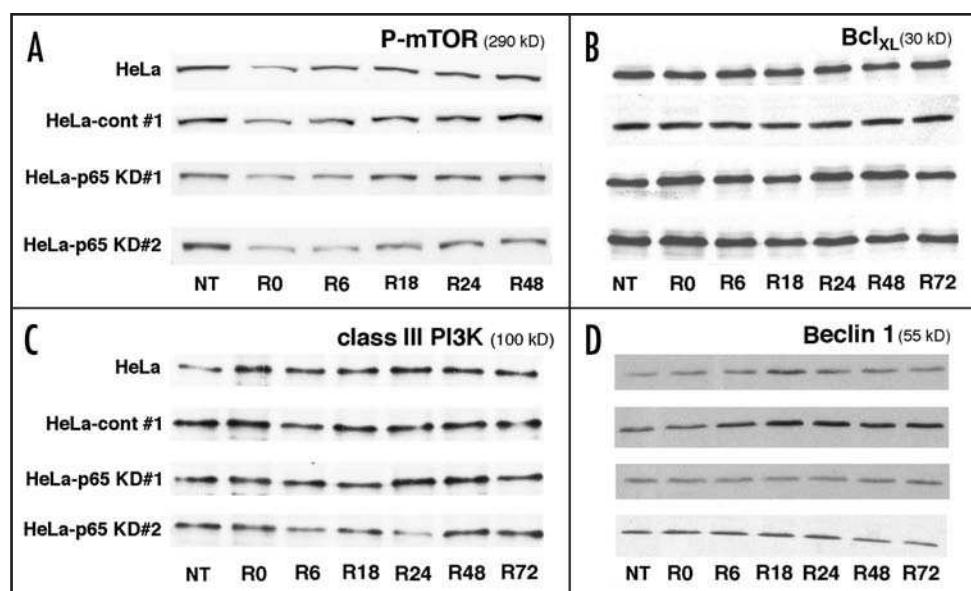


Figure 8. Analysis of autophagy regulators in control and p65-depleted cells during heat shock recovery. HeLa, HeLa-cont #1, HeLa-p65 KD#1 and #2 cell lines were submitted or not (NT) to a 90 min HS at 43°C followed by a recovery period at 37°C of either 0 (R0), 6 (R6), 18 (R18), 24 (R24), 48 (R48) or 72 hours (R72). Equal amounts of whole cell protein extracts were analyzed in immunoblots probed with specific antibodies directed against (A) phospho-mTOR, (B) Bcl_{xL}, (C) class III PI3K and (D) Beclin 1.

induced injuries. HS has been extensively described as an inducer of aberrant protein folding that can result in protein aggregation notably when Hsps, that are major actors in protein refolding, are overwhelmed.^{2,38} In this case, additional processes involved in protein degradation such as proteasome and/or autophagy are then required to avoid the formation of protein aggregates.³⁹ Of interest, autophagy is not induced during HS recovery in HeLa p65-KD cell lines and those cells are much more sensitive to HS than control cell lines.³⁰ We therefore hypothesized that the accumulation of proteins with damaged folding that are prone to form aggregates may be an inducer of NFκB that could activate autophagy; this process may in turn regulate the level of protein aggregates in response to HS and enhance cell survival. To this end, we analyzed the heat-induced NFκB activation in recovering cells that are protected from protein denaturation/aggregation by being cultured in a medium supplemented with glycerol. Indeed, glycerol is a well-known compound that stabilizes protein folding and inhibits protein insolubilization/denaturation induced by HS.^{2,40} We first checked whether glycerol was efficient to decrease the accumulation of misfolded proteins in HeLa cells after a HS. To this end, pGL3 promotor vector-transfected HeLa cells, grown in the presence or not of 0.5 M glycerol, were submitted to a luciferase refolding assay (see Materials and Methods) after being exposed to a 40 min HS at 43°C (Fig. 9A). We observed that in the presence of glycerol, the decreased luciferase activity observed after HS, caused by luciferase misfolding/denaturation, was less intense than in the absence of glycerol; moreover, the recovery of basal luciferase activity was more rapid. Therefore, our results suggest that glycerol decreases the level of luciferase denaturation/aggregation induced by HS. Those conclusions were confirmed by measuring the level

of SDS-insoluble protein aggregates conjugated to polyubiquitin during HS recovery, in the presence or not of glycerol. HeLa cells were submitted or not to a 90 min HS treatment at 43°C followed by a 6 h recovery at 37°C in the presence or absence of 0.75 M of glycerol and processed for filter trap assay (see Materials and Methods). We observed that the presence of glycerol did not modify the level of polyubiquitinated SDS-insoluble protein aggregates in untreated HeLa cells (Fig. 9B). In contrast, glycerol induced a 6-fold decrease of the level of polyubiquitinated protein aggregates in cells that were submitted to a HS treatment and left to recover for 6 hours, in comparison to cells submitted to the same heat stress in absence of glycerol. Moreover, in the presence of glycerol nearly no increase of protein aggregate levels could be observed during HS recovery in comparison to untreated cells. Taken together those results indi-

cate that glycerol is efficient for protecting cellular proteins from HS-induced denaturation.

We therefore tested if glycerol treatments could modulate NFκB activation by HS. pNFκBluc stable HeLa transfectants were submitted to either HS, either glycerol or a combination of both treatments before analysis of luciferase activity. As seen in Figure 9C, increasing concentrations of glycerol into culture medium did not modify NFκB-dependent basal transcription of luciferase gene. However, when glycerol was combined to HS, it drastically decreased, in a concentration dependent way, κB-dependent gene expression. To determine the specificity of glycerol towards protein misfolding, we then compared the effects of glycerol treatment on NFκB activation by HS, TNFα or cadmium chloride (Fig. 9D). We could observe that glycerol strongly inhibited NFκB activation by HS or cadmium chloride,⁴¹ two inducers of protein denaturation/aggregation whereas it had no significant effects on NFκB activation by TNFα. Therefore, those results strongly suggest that the accumulation of damaged/aggregated proteins is a crucial step for NFκB activation in cells recovering from HS.

We next investigated if the presence of damaged/aggregated proteins was also an important parameter in the induction of autophagy by HS. HeLa stable transfectants expressing GFP-LC3 probe were submitted or not to a HS treatment in the presence or not of 0.5 M glycerol in the culture medium. After a 24 h recovery period, autophagic vacuoles were visualized under UV microscope (Fig. 10A) and the number of punctations/cell was determined (Fig. 10B). We could observe that glycerol treatment did not significantly modify the percentage of punctated GFP-LC3 cells in comparison to untreated cells (around 28% of punctated cells). After a HS treatment, 83% of the cells showed a punctated

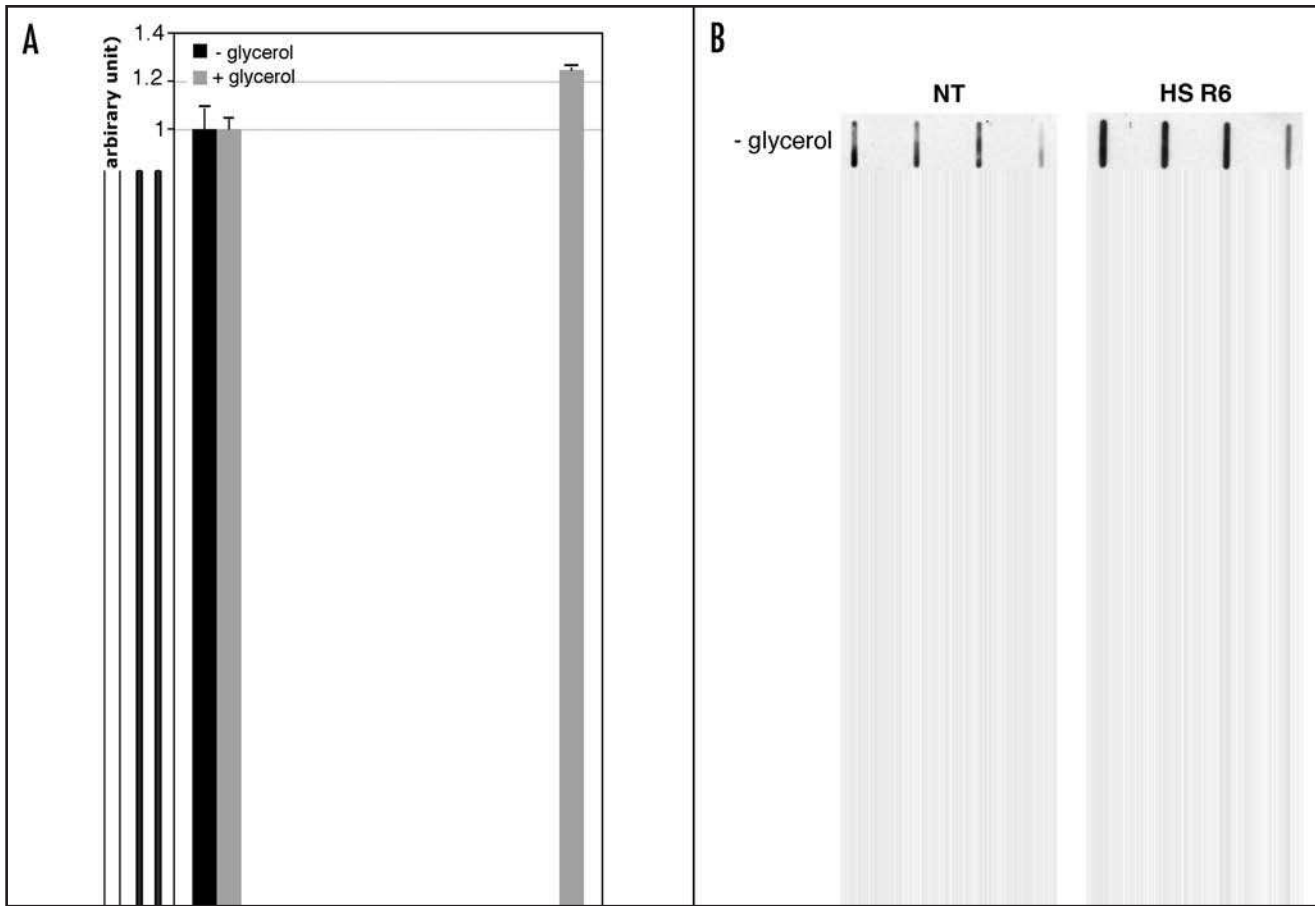


Figure 9. Glycerol sensitive damaged proteins as triggers of NFκB activation after heat shock. (A) Luciferase refolding experiment with HeLa cells after a 40 min HS at 43°C in the presence (+glycerol) or not (-glycerol) of 0.5 M glycerol in the culture medium, added 1 hour before the beginning of the HS treatment. (B) HeLa cells were either left untreated (NT) or submitted to a 90 min HS at 43°C followed by a 6 hours recovery period in the presence or not of 0.75 M glycerol. At the end of each treatment, extracts were prepared for filter trap assay. The samples were slot-blotted at four different dilutions on a cellulose acetate membrane and probed with anti-multiubiquitin. (C) pNFκBluc stable HeLa transformants were either left untreated (NT), submitted to a 90 min HS at 43°C followed by a 24 h recovery period (HS) or submitted to 24 h glycerol treatments at concentration from 0.25 to 1 M. A combination of treatments (HS + glycerol) was also performed. In this latter case, glycerol was added to the culture medium 1 hour before the beginning of the HS treatment. Luciferase activity was measured and is presented as fold stimulation (as described in Fig. 1). (D) pNFκBluc stable HeLa transformants were left untreated (NT), submitted either to a 90 min HS at 43°C (HS), a 4,000 U/ml TNFα treatment during 4 hours (TNFα) or a 20 μM CdCl₂ treatment during 6 hours. Every treatment was performed in the absence or presence of 0.75 M glycerol. Luciferase activity was measured 24 hours after the beginning of each treatment and is presented as fold stimulation. Unpaired student t test was performed between HS vs. HS + gly, TNF vs. TNF + gly and CdCl₂ vs. CdCl₂ + gly.

pattern with 41% of them exhibiting severe autophagy. In contrast, when cells were submitted to the same treatment in the presence of glycerol a statistically significant decreased percentage of punctated cells was observed (68% compared to 83%) and, above all, a strong decrease in the percentage of cells with intense autophagy was noted (11% compared to 41% of the autophagic cell population). Taken together, those results indicate that the accumulation of damaged/aggregated proteins is an important event for the triggering of a HS-induced autophagic process and therefore suggest that NFκB-induced autophagy during HS recovery promotes cell survival by clearing irreversibly damaged/aggregated proteins. To test this hypothesis, we measured control and p65-depleted cell survival to HS when autophagy was artificially activated by rapamycin treatment and protein aggregation was reduced by glycerol treatment. We observed that rapamycin and glycerol

co-treatment increased control and p65-depleted cell survival to HS (Fig. 10C); but above all the co-treatment restored a survival to HS in NFκB-depleted cells identical (p > 0.05 until 36 hours of HS recovery) or even increased (p < 0.05 for 48, 60 and 72 hours points) in comparison to control HeLa cells.

Therefore our results demonstrate that HS-induced denatured proteins are key factors for NFκB activation during HS recovery and that induction of autophagy is a major survival pathway in response to HS. Moreover, our observations suggest that HS-induced autophagy could help the cell to clear protein aggregates generated by heat shock conditions.

Discussion

We have previously shown that NFκB transcription factor is activated in cells recovering from HS through a pathway that

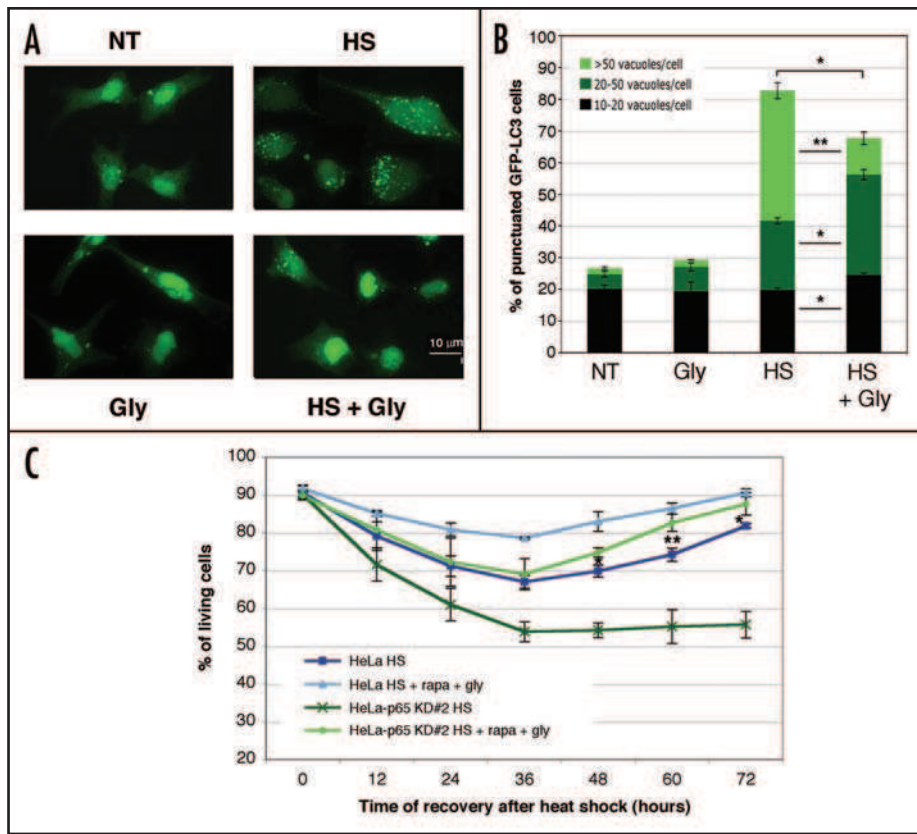


Figure 10. Glycerol sensitive damaged proteins as triggers of autophagy activation after heat shock. (A) Stable HeLa transfectants expressing GFP-LC3 probe were either left untreated (NT), submitted to either a 90 min HS at 43°C followed by a 24 h recovery period at 37°C (HS), a 0.5 M glycerol treatment during 24 hours (Gly) or the combination of both treatments (HS + Gly). GFP staining was analyzed with a fluorescence microscope. (B) Quantification of the intensity of autophagy observed in (A) by determination of the percentage of punctated cells. The graph also indicates, for each condition, the percentage of cells with intense autophagy (>50 vacuoles/cell), moderate autophagy (20 to 50 vacuoles/cell) or mild autophagy (10 to 20 vacuoles/cell). Counting of GFP-LC3 dots was performed on 300 cells, in 2 independent experiments. Unpaired student t test was performed between NT vs. Gly and between HS vs. HS + Gly for each category of autophagic cells. (C) HeLa and HeLa-p65 KD#2 cell lines were submitted to a 90 min HS at 43°C alone (HS) or a HS combined to glycerol (0.5 M) and rapamycin (50 nM) co-treatment (HS + rapa + gly). Glycerol was added to the culture medium 1 hour before the beginning of the HS and maintained during 5.5 hours. Rapamycin was added to the culture medium 4 hours before the beginning of the heat treatment. Viable cells were numbered after trypan blue staining just after (0) and every 12 hours after HS. Unpaired student t test was performed between HeLa HS vs. HeLa-p65 KD#2 HS + Rapa + gly.

requires neither IκB phosphorylation nor its degradation by the 26S proteasome.¹⁰ Here, our interest was to search for the cellular consequences of its heat-induced activation. Indeed, NFκB is a mediator of many cellular processes; among the most important ones are immunity,¹⁵ inflammation¹⁴ and cell survival,¹⁷ three processes that can be induced in response to a temperature raise such as in vivo fever. Our strategy was therefore to analyze the HS response of cells devoid of NFκB. To this end, we selected stable transfectants of HeLa cells, depleted in the p65 subunit of NFκB by shRNAs expression and stable counterparts expressing control shRNAs. We observed that in p65-depleted cells, the level of NFκB1/p50 subunit (the other partner of heterodimeric NFκB) was not affected, whereas the IκBα level was decreased as expected

for a NFκB target gene.¹² Moreover, in the absence of p65, the basal level and the HS induction of the main Hsps were not modified which was expected since Hsps expression is under the control of HSF-1 transcription factors,⁴² but not yet been tested. These p65-depleted cells also showed an inhibition of the HS-induction of a NFκB driven luciferase gene suggesting that no other member of the NFκB/Rel family could substitute for p65 to induce κB-dependent gene transcription after HS. Finally, we measured the folding capacity of the chaperone machinery in these cell lines and observed that it was not modified by p65-depletion. Since Hsps expression and global chaperone activity were not altered, p65-depleted cells represented a powerful tool to study the role of NFκB in the HS response.

NFκB is an important modulator of cell survival (suppression of apoptosis or activation of proliferation),¹⁶ we thus analyzed the survival of p65-depleted cells after a HS treatment. It was first observed that p65 depletion did not alter the growth rate of the different shRNA cell lines. In contrast, p65-depleted cells submitted to a heat stress showed an increased number of dead cells and a delayed regain of proliferation. These observations could be generalized to other cell types (HEK 293 and COS cells) where transient expression of shRNAs directed against p65 mRNAs sensitized cells to HS. Hence, our results suggest that, in addition to Hsps, NFκB is an important parameter that mediates cell survival after a heat stress. This protective role for the p65 subunit of NFκB was also observed in a recent report analyzing the response of embryonic cells to HS treatments.⁴³ In order to find the mechanism by which NFκB could mediate

cell survival after a heat stress, we first analyzed cell cycle modulation during the recovery period post-HS. Indeed, HS is known to induce cell cycle arrest in G₁/S and G₂/M by decreasing Cyclin D and increasing p21 levels;⁴ moreover, *cyclins D1* and *D3* are target genes of NFκB.¹² However, control and p65-depleted cells displayed a similar G₂/M cell cycle arrest and restart during the recovery period after heat stress, suggesting that the heat sensitivity of p65-depleted cells does not result from a NFκB-dependent cell cycle modulation. Since NFκB is an important modulator of apoptosis mainly through its transcriptional regulation of anti-apoptotic genes (*bcl2*, *bcl-X_L*, *NR12*, *XIAP*, *cIAP*...) ^{16,17} and that HS can induce apoptosis,^{4,33} we analyzed cell death process induced by HS in p65-depleted cells. Annexin-V/PI staining led us to conclude

that HS does not induce any externalization of phosphatidylserine residues of the cell plasma membrane, a hallmark of early apoptotic cell death.⁴⁴ In contrast, we observed a large increase in PI staining, indicative of plasma membrane alterations and suggestive of a necrotic or late apoptotic type of death. Concerning caspases, a z-VAD-fmk sensitive gradual activation of these enzymes was observed during the 72 h of recovery post-HS that was rather similar in HeLa-cont and HeLa-p65 KD cells. These results are consistent with recent reports describing caspase activation during HS even if the apical signalization (apical protease or caspase 2) is still a matter of debate.^{34,35,45} However, heat sensitivity of p65-depleted cells was still observed following z-VAD-fmk treatment, suggesting that this phenomenon is caspase-independent. Hence, NFκB mediated cell survival after HS is not due to its anti-apoptotic functions.

We then paid particular attention to the autophagic process. Indeed, a mild HS was shown to induce autophagy in human malignant glioma cells³⁶ and recently Swanlund and co-workers described an increased autophagy in rat hepatocytes after heat stress.⁴⁶ Moreover, autophagy originally described as a survival mechanism notably during starvation situations was also shown to induce cell death.^{29,31} At last, several studies recently described that NFκB could inhibit the autophagic process.^{19,20} Therefore we hypothesized that NFκB, HS and autophagy may be linked. Analysis of autophagic activity revealed that HS induces an autophagic process in control cells during HS recovery. But to our surprise, this induction was not observed in p65-depleted cells. Our results thus demonstrate that p65 is required for the induction of autophagy by HS. As NFκB was so far described as an inhibitor of the autophagic process notably after TNFα stimulation, we thus analyzed the induction of autophagy in control and p65-depleted cells after TNFα treatment. We could observe that TNFα treatment induced an intense autophagy in p65-depleted cells whereas no autophagy was detected after TNFα stimulation in control cells, confirming the study of Djavaheri-Mergny and coworkers.¹⁹ Hence, these results indicate that NFκB can regulate the autophagic process in a positive or negative way depending on the type of stimulus and that in the case of HS, NFκB is an activator of autophagy. Moreover, since HS-induced autophagy is strongly decreased in the presence of actinomycin D, this suggests that some proteins whose transcription is regulated by NFκB are indispensable for activation of autophagy during HS recovery.

We next tried to determine which NFκB-target pathways could activate autophagic process during the recovery period after HS. To this end, we analyzed the major pathways described to regulate autophagy. First, we analyzed if the inhibitor of autophagy mTOR^{26,27} could be a target for the heat-induced autophagy regulation by NFκB. mTOR is part of two protein complexes: mTORC1 and mTORC2. mTORC1, which includes Raptor, is rapamycin sensitive and is involved in S6K and 4EBP1 signaling. A transient decreased phosphorylation of mTOR and its target 4EBP1, consistent with an activation of autophagy was detected during HS recovery but this modulation of mTORC1 activity was detected both in control and p65-depleted cells. Moreover, rapamycin was able to induce autophagy both in control and

p65-depleted cells; hence, mTORC1 is involved in the activation of the autophagic process during the HS recovery period but is not a NFκB target that could explain the NFκB-dependency of autophagy activation by HS. mTORC2 complex, which contains Rictor, is rapamycin insensitive and is required for signaling to Akt/FoxO that can induce the autophagy/lysosome pathway.⁴⁷ However, we could not detect any NFκB-dependent modulation of the phosphorylation status of Akt1 or FoxO3A during HS recovery, demonstrating that FoxO3A is probably not involved in NFκB activation of autophagy during HS recovery. Similarly, we could not detect any NFκB-dependent modulation of major Atg, Bcl₂/Bcl-X_L or class III PI3K protein levels during HS recovery. In contrast, we observed an increase in Beclin 1 level during the recovery period post-heat stress in control cells that was not observed in p65-depleted cells. However, microarray analysis demonstrated that this modulation does not result from an increase in *beclin 1* transcript level and therefore does not directly depend on NFκB transcriptional activity but rather on post-translational regulation of this protein. In contrast to our findings, during the revision process of this paper, Copetti and coworkers reported that overexpression of p65 induces an increase of *beclin 1* gene transcription and thus modulates autophagy induced by ceramide.⁴⁸ However, the authors suggest that both autophagy and NFκB signaling are context and stimulus dependent since NFκB was shown to repress TNFα-induced autophagy¹⁹ and p65 overexpression could not activate the *beclin 1* promoter in some cell lines.⁴⁸ Taken together, we can conclude that, in line with this very recent report, we demonstrate that p65 is an activator of the autophagic process but the mechanism of action seems to be stimulus dependent since p65, despite the presence of NFκB binding sites in the *beclin 1* promoter,⁴⁸ does not induce *beclin 1* transcription in a context of HS treatment. Moreover, the modulation of the Beclin 1/class III PI3K complex observed during the recovery period post-HS was not dependent on the presence of NFκB. Therefore, we can conclude that classical regulators of the autophagic process are not key NFκB targets that could explain the dependency to NFκB of autophagy activation in the context of a HS treatment. NFκB targets that could regulate autophagy should thus be involved in parallel or downstream signaling pathways. More extensive investigations will be required to decipher those NFκB targets and the molecular mechanism by which they activate autophagy during HS recovery. Whether this mechanism has to deal with protein aggregation (as discussed below) or in the post-HS recovery of cytoskeleton organization that allows autophagy to take place, will have to be tested.

Since autophagy is no more activated in NFκB incompetent cells and these cells are much more sensitive to HS, we wondered if autophagy could promote cell survival and by which mechanism. We observed increased cell death when control cells were submitted to a HS treatment in the presence of bafilomycin A1, an inhibitor of autophagosomes maturation or when expression of *atg5*, an essential autophagy gene, was inhibited by siRNAs transfection. Moreover, when autophagy was increased by rapamycin treatment, p65-depleted cells hypersensitivity to HS was reduced and restored to a sensitivity identical to the one observed in

control cells. Hence, a major role of NFκB in protecting cells against heat-induced death is achieved by activating autophagy as a survival mechanism. Many studies reported an involvement of autophagy in the regulation of cell survival after different types of aggressions.^{29,49,50} Autophagy has also been described to favor tumor cell progression by preventing apoptosis or restricting necrosis.⁵¹ This last observation was also confirmed by our observations since loss of autophagy in p65-depleted cells is accompanied by an increase of PI stained dead cells, a hallmark of necrosis. However, our study demonstrates for the first time that NFκB is, in addition to the well described Hsps, a major partner of the HS response that helps cells to recover from thermal damages by activating autophagy. Moreover, autophagy, like Hsps which possess chaperone activity, has been reported to be involved in the clearance of aberrantly folded and aggregated proteins^{30,52} and HS is a well-known inducer of protein aggregation.^{2,40} We therefore wondered if NFκB and autophagy activation during HS recovery could be a response to the accumulation of misfolded or damaged proteins induced by HS. To check this hypothesis, we measured NFκB activation and autophagic activity during HS recovery in a context where proteins structures are stabilized. Previous studies have reported that pretreatment of cells with glycerol, a long known compound that help reduce the extent of thermal denaturation of proteins *in vitro*, also prevents HS-induced protein denaturation.^{2,40} We could observe that the addition of glycerol into culture medium drastically decreased NFκB activation during HS recovery, a phenomenon correlated with the observation of a drastic decrease in the formation of SDS-insoluble intracellular aggregates or enzyme inactivation. Glycerol effect seemed specific to its protein stabilizer properties since glycerol did not alter NFκB activation by TNFα whereas it strongly inhibited NFκB activation during HS recovery or after cadmium treatment, two stresses that have been reported to induce protein denaturation/aggregation.^{2,41} Moreover, since TNFα activation of NFκB is not decreased by the addition of glycerol into the culture medium, it is reasonable to postulate that glycerol does not alter ligand binding to membrane receptors and downstream signalization. Therefore our results demonstrate that the accumulation of aberrantly folded/aggregated proteins is an important step in the signal transduction pathway leading to NFκB activation during HS recovery. We also observed that glycerol treatment decreased the number of cells showing active autophagy and most of all decreased the intensity of the autophagic process during HS recovery. Therefore, aberrantly folded/aggregated proteins appear to trigger NFκB activation and subsequently HS-induced autophagy. Hence, we hypothesized that autophagy could be an additional mechanism to the chaperone activity of Hsps, that helps the cells to recover from thermal induced protein aggregation. Indeed, it is already known that if the refolding process mediated by Hsps is overloaded, then the ubiquitin proteasome system (UPS), via CHIP polypeptide, is an extra process that can degrade the proteins resistant to refolding. Autophagy could be another process involved in the clearance of those aggregates. This hypothesis was validated by the fact that, in p65-depleted cells, glycerol and rapamycin co-treatment could restore a survival to HS identical or even higher to the one observed

in control cells. Therefore, our results suggest that p65-depleted cells might not be able to deal with protein aggregates, a disability that can be overcome by reducing the level of protein aggregates (glycerol treatment) and by activating their clearance (activation of autophagy by rapamycin treatment). Taken together, our results demonstrate that autophagy activation by NFκB is a major process that takes place during the recovery period after HS and probably helps the cells to clear resistant and aberrantly folded/aggregated proteins induced by HS. We suggest that this process could be related to the UPS, aggresome and autophagy connection already described in pathological neuronal cells.³⁰ In this respect, analysis of p62/SQSTM1 behavior in p65-depleted cells submitted to a HS treatment will be of particular interest. Indeed, this protein partners with Lysine 63-linked polyubiquitin and binds also LC3 protein, therefore connecting UPS and autophagy processes.⁵³⁻⁵⁵

To conclude, this study demonstrates that autophagy activation during the recovery period after HS is a survival mechanism depending on NFκB activation and triggered by aberrantly folded/aggregated proteins. Therefore, autophagy is a crucial new partner involved in the HS response. These results also suggest that a therapeutic modulation of autophagy may be of interest to increase the beneficial effects of hyperthermia in the treatment of some cancers. Indeed, malignant cells are usually more thermosensitive than the corresponding normal cells. Based on these particular properties, hyperthermia was used in the treatment of some superficial tumors and was combined to immunotherapy, chemotherapy or X-irradiation. However, hyperthermia future in cancer therapy has been compromised by some drawbacks such as thermotolerance induction that impairs efficient cell killing.⁵⁶⁻⁵⁸ Attempts are then performed to improve the efficiency of hyperthermia-induced death. Inhibiting the NFκB-dependent induction of autophagy could therefore decrease cancer cells survival to HS and thus increase the benefits of hyperthermia treatments.

Materials and Methods

Cell culture, cell lines and heat shock treatments. HeLa, HEK 293 and COS cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% decompeted FCS, 1 μg/ml fungizone and 50 U/ml peni-streptomycin. pSUPER RNAi vectors (Oligoengine) were generated to produce control-shRNA and p65-shRNA directed against the p65 subunit of NFκB according to the manufacturer's instructions. Three different target sequences were used to generate p65-shRNA: sequence "5" 5'-GAT CAA TGG CTA CAC AGG A-3' (position 180 of p65 coding sequence), sequence "25" 5'-AGA GGA CAT TGA GGT GTA T-3' (position 660 of p65 coding sequence) and sequence "47" 5'-TGG CCT CCT TTC AGG AGT-3' (position 1570 of p65 coding sequence). Non-targeting scrambled (SC) and mismatch (MS) sequences were used as controls: "SC" 5'-AGA CGA GAT TGA TGT GGA T-3' and "MS" 5'-AGA GGA CAT CAA GGT GTA T-3'. A neomycin gene under the control of SV40 promoter (from pCineo vector) was inserted into XbaI and BamHI restriction sites of pSUPER vector. Stable transformants were obtained by transfecting HeLa cells with pSUPER RNAi vectors and selecting them for neomycin resistance (culture in 0.5 mg/ml of

G418). After selection, stable clones were screened by western blot analysis for p65 downregulation. “SC” control cell lines used in this study were named HeLa-cont #1 and HeLa-cont #2. “MS” control cell lines used in this study were named HeLa-cont #3 and HeLa-cont #4. Clone expressing sequence “5” shRNA was named HeLa-p65 (knockdown) KD#1, clone expressing sequence “25” shRNA was named HeLa-p65 KD#2 and clone expressing sequence “47” shRNA was named HeLa-p65 KD#3. Stable HeLa transfectants expressing GFP-LC3 have been already described.⁵⁹ The same transfection and selection protocols as described above were used to generate stable transfectants expressing pNFκB_{luc} vector. HS treatments were performed, unless when mentioned, at 43°C during 90 min.

Reagents and plasmids. Bafilomycin A1, trypan blue, methylene blue, glycerol and E64d were from Sigma. Pepstatin A and rapamycin were from VWR International. Recombinant protein G agarose was from Invitrogen. Human TNFα was from Strathman Biotec GA. CdCl₂ was from Merck. Anti-NFκB p65 is a rabbit polyclonal antibody (Upstate). Anti-NFκB p50, IκBα and phospho-Akt are rabbit polyclonal and anti-bcl2, -bcl-X_L are mouse monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Anti-Hsp90, -Hsp/Hsc70, -Hsp40, -Hsp27 are mouse monoclonal antibodies and anti-Hsp60 is a rabbit polyclonal antibody (Stressgen). Anti-actin is a mouse monoclonal antibody (Chemicon). Rabbit polyclonal antibody against Beclin 1 was from Imgenex. Rabbit polyclonal antibodies against mTOR, phospho-mTOR (Ser 2448), 4EBP1, phospho-4EBP1 (Ser 65), class III PI3K, phospho-FoxO3A (Thr 32) and Atg5 were from Cell Signaling technology. Rabbit polyclonal antibody for Atg16L1 and mouse monoclonal antibody against Atg3 were from Abcam. Rabbit polyclonal antibody against Atg9L1 was from Abgent. Mouse monoclonal anti-multiubiquitin clone FK1 was from MBL. Rabbit polyclonal anti-LC3 antibody has been already described.⁶⁰ siRNAs directed against atg5 mRNA were siGenome[®]SMARTpool[®] from Dharmacon. pSUPER RNAi vector was from Oligoengine, pGL3-promotor vector was from Promega and pNFκB_{luc} was from Clontech. The GFP-LC3 expression vector is a kind gift from T. Yoshimori (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan). The GFP-LC3ΔG plasmid is a kind gift from I. Tanida (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan).

Cell viability assays. (1) Trypan blue exclusion assay: cells were seeded in 100 mm dishes and incubated overnight at 37°C. Thereafter, they were submitted to various treatments. After different times of treatment or recovery periods, the number of nonstained viable cells and trypan-blue stained dead cells was counted. (2) Clonogenic colony formation assay: shRNA expressing clones were seeded at 10⁴ cells/35 mm dishes. The day after, cells were submitted to a HS treatment and let to recover at 37°C during 5 days, before staining of surviving cellular clones with 2% methylene blue in 50% ethanol.

Cell cycle analysis. 10⁶ cells were analyzed, by propidium iodide staining, for cell cycle distribution as previously described.⁶¹

Annexin-V-FITC and propidium iodide cell staining. Cells were seeded at 5 x 10⁵ cells/100 mm dishes. After treatments, they were trypsinized and rinsed in PBS. Annexin-V-FITC and PI

staining (AbCys) was performed as already described.⁶¹ Dual-color analysis (FL1 filter 515 nm for Annexin-V-FITC and FL3 filter 580 nm for PI) of a 10,000-cell population was performed on a FACScantoII flow cytometer (BD Bioscience).

Caspases activation measurement. Cells were seeded at 10⁵ cells/60 mm dishes. The day after they were submitted to various treatments and were trypsinized and rinsed with PBS before monitoring whole cell caspases activation by Apoptat[™] staining (R&D systems) as previously described.⁶¹

Transfection. Cells were seeded the day before transfection at a density of 1.5 x 10⁶ cells/100 mm dishes. They were then transfected with 11 μg of the desired plasmid according to the LipofectAMINE[™] reagent procedure (Invitrogen).

Luciferase assay. Cells were transfected with pNFκB_{luc} vector. After treatments, they were resuspended into PBS and luciferase activity was quantified using the Steady-glo[®] luciferase assay system according to the manufacturer's instructions (Promega). The intensity of light produced was measured with a Victor³ Luminometer (Perkin Elmer). The related light units produced were reported to 50 μg of total cellular proteins.

In vivo luciferase refolding assay. Cells transiently transfected with pGL3-promotor vector were, the day after, submitted or not to a 20 or 40 min HS treatment at 43°C to in vivo inactivate constitutively expressed luciferase by denaturation. After HS, cells were incubated at 37°C for recovery and to allow luciferase activity restoration by refolding of this enzyme; during this recovery period, samples were taken at various time points (0, 0.5, 1 and 2 hours) for luciferase activity measurements. Cell lysis and luciferase measurements were performed as described above. The related light units produced were reported to 50 μg of total cellular proteins.

Filter trap assay. SDS-insoluble protein aggregates conjugated to polyubiquitin were analyzed by filter trap assay as previously described.⁶² Briefly, cells were scraped in FTA buffer (150 mM NaCl, 50 mM DTT, 10 mM Tris-HCl pH 8) supplemented with 2% SDS. Samples were then homogenized by three passages through 25-gauge needle. 5 μg of protein extracts were then diluted (1, 1/2, 1/4 and 1/8), heated to 100°C for 3 min and applied with mild suction into a slot blot apparatus, onto 0.22 μm acetate cellulose membrane (Schleicher & Schuell) pre-washed with 0.1% SDS FTA buffer. The membrane was then washed three times with 0.1% SDS FTA buffer and 2 times with TBS-Tween 0.1% (TBS: 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl) and processed for immunoblotting with antipolyubiquitin antibody as described below.

Gel electrophoresis and immunoblotting. Briefly, 15 μg of total protein extracts were submitted to SDS-Page. After electrophoresis, proteins were transferred to Protran nitrocellulose membrane (Whatmann). Blots were then incubated with primary and horse radish-conjugated secondary antibodies and revealed with the ECL detection kit (Amersham Biosciences). For LC3-II blotting, immunorevelations were scanned and quantified using ImageJ 1.41o. The ratio LC3-II/Actin of each band is indicated.

Co-immunoprecipitation. HeLa cells were lysed for 30 min on ice with NP-40 lysis buffer (1% Nonidet P-40, 40 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl supplemented with protease inhibitor

complete mini EDTA-free (Roche diagnostics)). After centrifugation for 20 min at 15,000 xg, 500 μg of total cellular proteins from the supernatant were incubated with 50 μl of recombinant protein G agarose (80% vol/vol) for preclearing. After centrifugation, the supernatant was incubated for 1 hour at 4°C under gentle rocking with 1 μg of rabbit immunoglobuline (pre-immune) or anti-Beclin 1 antibody (immune). The immunocomplexes were precipitated with protein G agarose (50 μl at 80% vol/vol) under constant agitation at 4°C for 2 hours. Thereafter, the protein G-immunocomplexes were centrifuged, washed 5 times with NP-40 lysis buffer and boiled in SDS sample buffer before being analyzed by SDS-Page and immunoblotted with class III PI3K antibody.

Fluorescence microscopy analysis. Cells transiently transfected with GFP-LC3 or GFP-LC3ΔG vectors were grown on glass coverslips. Thereafter, they were submitted to various treatments, rinsed in PBS and fixed for 30 min with 2% paraformaldehyde pH 7.4. The stained cells were observed and photographed with a Zeiss axiovert 200M photomicroscope (Carl Zeiss, Inc.). Images were digitized with a camera (Coolsnap HQ²; Roper Scientific) and acquired with MetavueTM Imaging system; brightness and contrasts of images were adjusted using Photoshop CS2 (Macintosh version, Adobe). For counting of LC3 dots, the number of dot structures was quantified twice, on 300 cells, by two of the authors and in a blind manner.

Statistics. Unpaired student's t test was applied to compare results between two sample groups. One-way ANOVA test was also performed to test for differences among at least three groups. Differences between groups were considered statistically significant when p values < 0.05. p values codes were as follows: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Acknowledgements

We wish to thank Dominique Guillet for excellent technical assistance. We thank Mathias Faure for his help with the co-immunoprecipitation and siRNA experiments. This work was supported by the Ligue contre le Cancer, comité du Rhône (C.K.) and the Région Rhône-Alpes (A.P.A.). Mathieu Nivon was supported by a doctoral fellowship from the French Department of Research.

Note

Supplementary materials can be found at: www.landesbioscience.com/supplement/NivonAUTO5-6-Sup.pdf

References

1. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986; 55:1151-91.
2. Pinto M, Morange M, Bensaude O. Denaturation of proteins during heat shock. In vivo recovery of solubility and activity of reporter enzymes. *J Biol Chem* 1991; 266:13941-6.
3. Balogh G, Horvath I, Nagy E, Hoyk Z, Benko S, Bensaude O, Vigh L. The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response. *The FEBS journal* 2005; 272:6077-86.
4. Kuhl NM, Rensing L. Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:450-63.
5. Davidson JF, Schiestl RH. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 2001; 21:8483-9.
6. Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS. Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:10-23.
7. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature biotechnology* 1998; 16:833-8.
8. Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature reviews* 2004; 5:781-91.

9. Kretz-Remy C, Arrigo AP. The kinetics of HIV-1 long terminal repeat transcriptional activation resemble those of hsp70 promoter in heat-shock treated HeLa cells. *FEBS Lett* 1994; 353:339-44.
10. Kretz-Remy C, Munsch B, Arrigo AP. NFκappaB-dependent transcriptional activation during heat shock recovery. Thermolability of the NFκappaB.IkappaB complex. *J Biol Chem* 2001; 276:43723-33.
11. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NFκappaB signaling module. *Oncogene* 2006; 25:6706-16.
12. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NFκappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18:6853-66.
13. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NFκappaB signaling. *Cell* 2008; 132:344-62.
14. Tak PP, Firestein GS. NFκappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107:7-11.
15. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NFκappaB and the immune response. *Oncogene* 2006; 25:6758-80.
16. Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gelinis C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NFκappaB. *Oncogene* 2006; 25:6800-16.
17. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441:431-6.
18. Xiao G. Autophagy and NFκappaB: fight for fate. *Cytokine & growth factor reviews* 2007; 18:233-43.
19. Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souquere S, et al. NFκappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* 2006; 281:30373-82.
20. Fabre C, Carvalho G, Tasdemir E, Braun T, Ades L, Grosjean J, et al. NFκappaB inhibition sensitizes to starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2007; 26:4071-83.
21. Qing G, Yan P, Qu Z, Liu H, Xiao G. Hsp90 regulates processing of NFκappaB2 p100 involving protection of NFκappaB-inducing kinase (NIK) from autophagy-mediated degradation. *Cell research* 2007; 17:520-30.
22. Djavaheri-Mergny M, Codogno P. Autophagy joins the game to regulate NFκappaB signaling pathways. *Cell research* 2007; 17:576-7.
23. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation* 2005; 12:1542-52.
24. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2004; 36:2445-62.
25. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology* 2007; 9:1102-9.
26. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of cell biology* 2000; 150:1507-13.
27. Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* 2008; 90:313-23.
28. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature reviews* 2005; 6:439-48.
29. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell death and differentiation* 2005; 12:1509-18.
30. Martinez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet neurology* 2007; 6:352-61.
31. Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell death and differentiation* 2005; 12:1528-34.
32. Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* 2007; 131:1137-48.
33. Samali A, Holmberg CI, Sistonen L, Orrenius S. Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins. *FEBS Lett* 1999; 461:306-10.
34. Milleron RS, Bratton SB. Heat shock induces apoptosis independently of any known initiator caspase-activating complex. *J Biol Chem* 2006; 281:16991-7000.
35. Tu S, McStay GP, Boucher LM, Mak T, Beere HM, Green DR. In situ trapping of activated initiator caspases reveals a role for caspase-2 in heat shock-induced apoptosis. *Nature cell biology* 2006; 8:72-7.
36. Komata T, Kanzawa T, Nashimoto T, Aoki H, Endo S, Nameta M, et al. Mild heat shock induces autophagic growth arrest, but not apoptosis in U251-MG and U87-MG human malignant glioma cells. *Journal of neuro-oncology* 2004; 68:101-11.
37. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122:927-39.
38. Kampinga HH. Thermotolerance in mammalian cells. Protein denaturation and aggregation, and stress proteins. *J Cell Sci* 1993; 104:11-7.
39. Ding WX, Yin XM. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* 2008; 4:141-50.
40. Edington BV, Whelan SA, Hightower LE. Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *J Cell Physiol* 1989; 139:219-28.

41. Song C, Xiao Z, Nagashima K, Li CC, Lockett SJ, Dai RM, et al. The heavy metal cadmium induces valosin-containing protein (VCP)-mediated aggresome formation. *Toxicology and applied pharmacology* 2008; 228:351-63.
42. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes Dev* 1998; 12:3788-96.
43. Savion S, Sofer M, Brengauz-Breitmann M, Fein A, Torchinsky A, Toder V. NFκappaB regulates the response of embryonic cells to heat shock. *Int J Hyperthermia* 2007; 23:277-86.
44. Bredesen DE. Key note lecture: toward a mechanistic taxonomy for cell death programs. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2007; 38:652-60.
45. Moulin M, Arrigo AP. Caspases activation in hyperthermia-induced stimulation of TRAIL apoptosis. *Cell stress & chaperones* 2008; 13:313-26.
46. Swanlund JM, Kregel KC, Oberley TD. Autophagy following heat stress: the role of aging and protein nitration. *Autophagy* 2008; 4:936-9.
47. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* 2007; 6:458-71.
48. Copetti T, Bertoli C, Dalla E, Demarchi F, Schneider C. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Molecular and cellular biology* 2009; Epub ahead of print.
49. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, Kelekar A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell death and differentiation* 2007; 14:500-10.
50. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2006; 281:29776-87.
51. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation and tumorigenesis. *Cancer cell* 2006; 10:51-64.
52. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature genetics* 2004; 36:585-95.
53. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007; 131:1149-63.
54. Tan JM, Wong ES, Dawson VL, Dawson TM, Lim KL. Lysine 63-linked polyubiquitin potentially partners with p62 to promote the clearance of protein inclusions by autophagy. *Autophagy* 2007; 4:251-3.
55. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282:24131-45.
56. Hildebrandt B, Wust P. Interactions between hyperthermia and cytotoxic drugs. *Cancer treatment and research* 2007; 134:185-93.
57. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The lancet oncology* 2002; 3:487-97.
58. Engin K. Biological rationale and clinical experience with hyperthermia. *Controlled clinical trials* 1996; 17:316-42.
59. Bampton ET, Goemans CG, Niranjana D, Mizushima N, Tolkovsky AM. The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. *Autophagy* 2005; 1:23-36.
60. Chaumorcet M, Souquere S, Pierron G, Codogno P, Esclatine A. Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy* 2008; 4:46-53.
61. Moulin M, Arrigo AP. Long lasting heat shock stimulation of TRAIL-induced apoptosis in transformed T lymphocytes. *Experimental cell research* 2006; 312:1765-84.
62. Carra S, Sivilotti M, Chavez Zobel AT, Lambert H, Landry J. HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells. *Human molecular genetics* 2005; 14:1659-69.

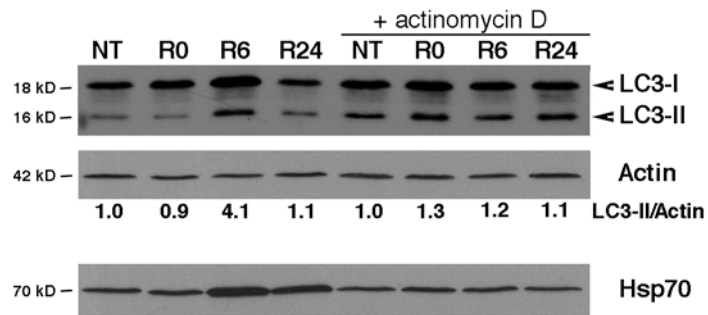


Figure S1: Analysis of LC3-II accumulation during heat shock recovery in the presence of actinomycin D

HeLa cells were submitted or not (NT) to a 90 min HS at 43°C followed by a recovery period at 37°C of 0 (R0), 6 (R6) or 24 (R24) hours in the presence or absence of 1µg/ml of actinomycin D. Actinomycin D was added to the culture medium 30 min before the beginning of the HS treatment. Equal amounts of whole cell protein extracts were analyzed in immunoblots probed with specific antibodies directed against LC3, Actin or Hsp70. The ratio between the intensity of LC3-II band vs. Actin band for each lane is indicated.

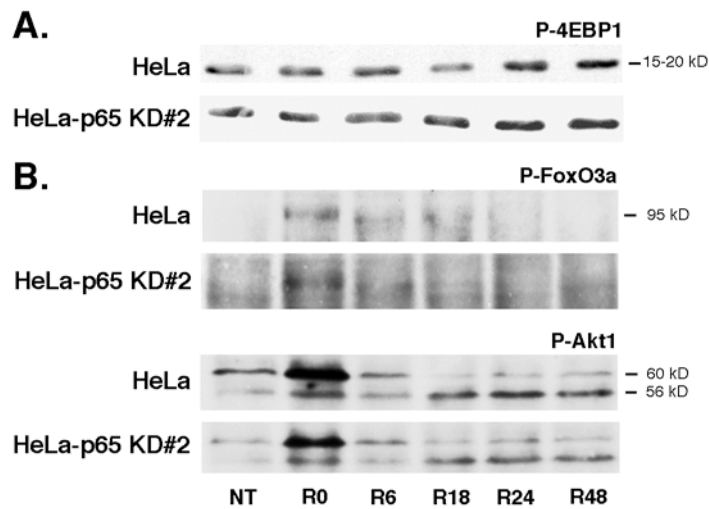


Figure S2: Analysis of mTOR substrates in control and p65-depleted cells after heat shock treatment

HeLa and HeLa-p65 KD#2 cell lines were submitted or not (NT) to a 90 min HS at 43°C followed by a recovery period at 37°C of 0 (R0), 6 (R6), 18 (R18), 24 (R24) or 48 (R48) hours. Equal amounts of whole cell protein extracts were analyzed in immunoblots probed with specific antibodies directed against (A) phospho-4EBP1 (mTORC1 substrate), (B) phospho-FoxO3a and phospho-Akt1 (mTORC2 substrates).

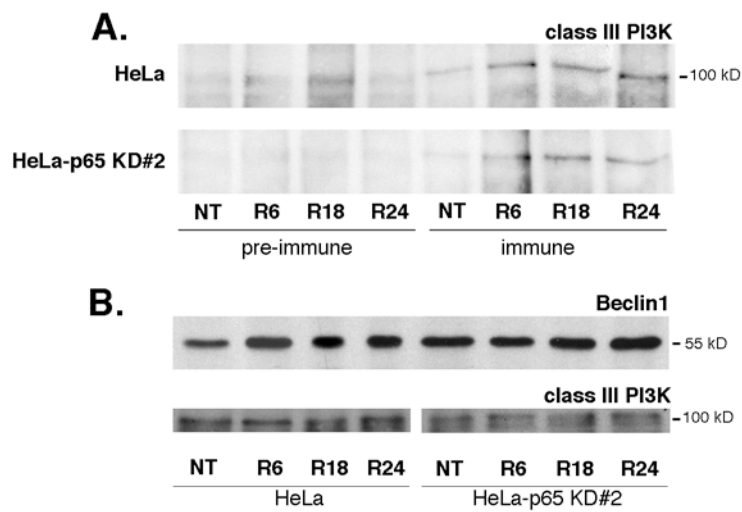


Figure S3 : levels of Beclin-1/class III PI3K complexes in control and p65-depleted cells during heat shock recovery

(A) HeLa and HeLa-p65 KD#2 cells were either left untreated (NT) or submitted to a 90 min HS at 43°C followed by 6 (R6), 18 (R18) or 24 (R24) hours of recovery at 37°C. Cells were then processed for co-immunoprecipitation with Beclin1 antibody as described under Materials and Methods. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-Page and immunoblotting with class III PI3K antibody. (B) Whole cell extracts from each conditions were also prepared and submitted to SDS-Page followed by immunoblots revealed with anti-Beclin 1 and anti-class III PI3K antibodies.

Nivon_Fig. S4

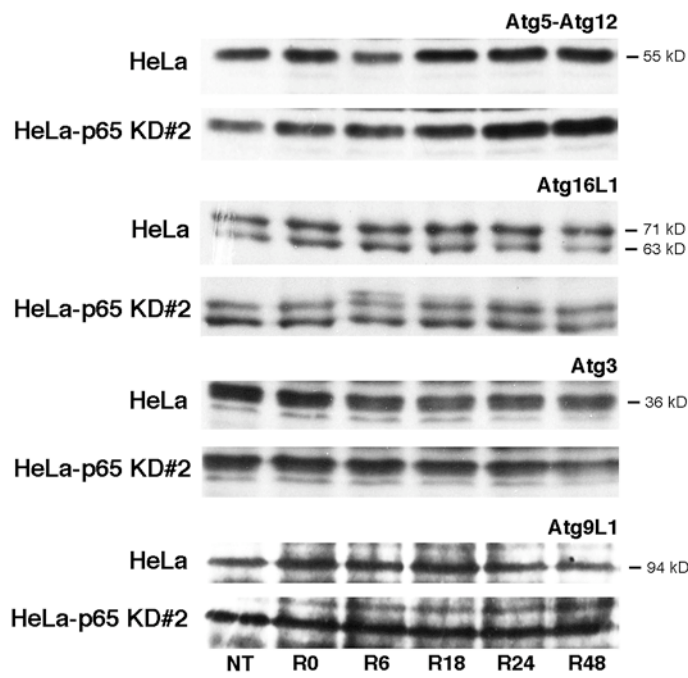


Figure S4: Analysis of Atg protein levels in control and p65-depleted cells after heat shock treatment

HeLa and HeLa-p65 KD#2 cell lines were submitted or not (NT) to a 90 min HS at 43°C followed by a recovery period at 37°C of 0 (R0), 6 (R6), 18 (R18), 24 (R24) or 48 (R48) hours. Equal amounts of whole cell protein extracts were analyzed in immunoblots probed with specific antibodies directed against Atg5, Atg16L1, Atg3 and Atg9L1.

Partie 2 : NFκB régule le contrôle qualité des protéines après choc thermique

Nos premiers résultats indiquent l'existence d'un lien entre stress thermique, agrégation protéique et autophagie dépendante de NFκB. Nous avons dès lors voulu déterminer si NFκB pouvait moduler d'autres mécanismes impliqués dans le contrôle qualité des protéines.

Dans la cellule, le contrôle qualité des protéines est exercé par plusieurs acteurs. Les protéines mal conformées ou agrégées sont tout d'abord prises en charge par les protéines de choc thermique (Hsp). Ces chaperons moléculaires soit reconforment les protéines soit, en cas d'échec, les adressent au protéasome 26S via la protéine CHIP. Cependant, lorsque le protéasome est saturé ou si les protéines à dégrader ne sont pas des cibles du protéasome, la cellule se défend en regroupant ces protéines agrégées en un agrégat unique : l'agrésome, situé au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC) (Garcia-Mata et al. 2002). L'agrésome est situé sur le lieu de formation des autophagosomes, facilitant ainsi leur ciblage vers une élimination par la voie autophagique (Yamamoto & Simonsen 2011).

Afin de déterminer le rôle de NFκB dans le contrôle qualité des protéines, nous avons analysé le fonctionnement de ces différentes voies de traitement des agrégats protéiques dans des cellules témoins et déplétées en NFκB, en condition de réponse à une hyperthermie ou en absence de stress.

Contrôle qualité des protéines en absence de stress :

Dans un premier temps, nous avons pu observer, par *Filter Trap Assay* et extraction des protéines solubles ou insolubles, une augmentation du taux d'agrégats protéiques dans les cellules déplétées en NFκB par rapport à des cellules témoins, en absence de stress. Nous avons alors analysé les différents éléments impliqués dans le contrôle qualité des protéines.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés aux chaperons moléculaires. Nous avons pu montrer que le taux basal des protéines Hsp majeures (Hsp27, Hsp40, Hsp/Hsc70, Hsp90) n'est pas modifié par l'absence de NFκB. De plus, comme démontré dans l'article précédent, leur capacité de reconformation n'est pas altérée. Il semble donc que l'accumulation de protéines agrégées dans les lignées déplétées en NFκB provienne d'un défaut de dégradation de ces protéines.

Nous avons ensuite mesuré les activités du protéasome 26S et avons pu observer une légère augmentation des activités du protéasome 26S (essentiellement l'activité de type

caspase) dans les cellules déplétées en NFκB, par rapport aux cellules témoins. Concernant l'autophagie basale, l'analyse du taux de la protéine LC3-II, montre un niveau d'autophagie légèrement plus important dans les cellules déplétées en NFκB que dans les cellules témoins. Donc, les activités du protéasome et de l'autophagie semblent légèrement plus activées en absence de NFκB, ce qui devrait augmenter l'élimination des protéines mal conformées. Or, ces dernières sont, d'après nos observations, en quantité plus importante. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait qu'une augmentation de LC3-II ne traduit pas forcément une induction d'autophagie plus importante mais peut-être expliqué par un défaut dans la maturation des autophagosomes ; les autophagosomes s'accumulant, le taux de la protéine LC3-II augmente (Mizushima & Yoshimori 2007). En effet, le taux d'activation de l'autophagie (augmentation du ratio LC3-II/Actine) par la Rapamycine reste inchangé en fonction des lignées, ce qui indique que l'induction de l'autophagie dans les cellules compétentes et incompétentes pour p65 est identique. En revanche, la Bafilomycine A1, un inhibiteur de la maturation des autophagosomes, a un effet moins important dans les cellules déplétées en p65 que dans les cellules contrôles, c'est-à-dire que l'absence de p65 semble induire une légère perturbation de la maturation des autophagosomes ainsi qu'une faible accumulation de protéines polyubiquitinées dans le cytoplasme des cellules déficientes pour NFκB. Cet effet est toutefois mineur puisque l'accumulation de LC3-II suite à un traitement par la Bafilomycine A1 est beaucoup plus importante que l'accumulation observée dans les cellules déficientes pour NFκB.

En condition basale, NFκB semble donc jouer un léger rôle dans le contrôle qualité des protéines, au niveau de la maturation des autophagosomes. En revanche, notre précédent article semble indiquer que NFκB pourrait être impliqué de manière importante dans le contrôle qualité lors de la phase de récupération suivant un stress thermique.

Contrôle qualité des protéines suite à un stress thermique :

A la suite d'une hyperthermie, une accumulation beaucoup plus intense d'agrégats protéiques est observée par *Filter Trap Assay* et extraction des protéines solubles ou insolubles dans les cellules dépourvues de NFκB ; cette accumulation est accompagnée d'un retard d'élimination de ces agrégats au cours de la récupération après choc thermique (contrairement à ce qui est observé dans les cellules témoins où les agrégats sont éliminés).

Afin de définir l'origine de cette accumulation, nous avons analysé les trois éléments majeurs du traitement des agrégats protéiques : les Hsp, le protéasome et l'autophagie.

En ce qui concerne les protéines Hsp majeures (Hsp27, Hsp40, Hsp/Hsc70, Hsp90), leur taux est augmenté de manière similaire dans les cellules témoins et déplétées en p65 traitées par hyperthermie. De plus, nous avons observé que cette induction n'est pas modulée par NFκB et que pendant la phase de récupération après une hyperthermie, l'activité globale de reformation des protéines est identique dans les lignées témoins et dépourvues de NFκB. L'accumulation de protéines mal conformées induite par l'hyperthermie dans les cellules déplétées en NFκB semble donc également provenir d'un défaut de dégradation plutôt que d'un défaut de reformation.

L'hyperthermie est connue pour bloquer le protéasome (Pajonk et al. 2005), ce que nous avons également pu vérifier. Alors que les activités du protéasome sont augmentées de manière similaire immédiatement après le stress thermique, elles sont réduites de plus en plus fortement au cours du temps de récupération, toujours de façon identique dans les cellules compétentes et incompétentes pour NFκB. De ce fait, les agrégats protéiques ne semblent pouvoir être éliminés que par une autophagie spécifique appelée agréphagie (Yamamoto & Simonsen 2011).

Au sein de la cellule, les agrégats sont regroupés de manière active au niveau du MTOC afin de former une structure unique appelée agrésome (Garcia-Mata et al. 1999). L'ajout d'une enveloppe de Vimentine autour de cet agrégat permet l'isolement des protéines dénaturées et réduit ainsi leur toxicité (Johnston et al. 1998). Nous avons observé l'apparition d'agrésomes au cours de la période de récupération suivant le choc thermique dans les cellules compétentes et incompétentes pour NFκB. En revanche, alors que dans les cellules témoins l'agrésome est résorbé 24h après le stress thermique, il est toujours visible même 72h après l'arrêt du stress dans les cellules déficientes pour NFκB. La déplétion en p65 bloque donc la dégradation de cette structure unique.

L'agrésome étant dégradé de manière spécifique par agréphagie (Yamamoto & Simonsen 2011), nous avons dès lors cherché à déterminer la voie de signalisation régulée par NFκB et pouvant aboutir à l'induction de cette autophagie spécifique. Nous nous sommes intéressés au complexe BAG3-HspB8 au sein duquel HspB8 reconnaît les protéines dénaturées et BAG3 induit l'autophagie (Carra et al. 2008a). Ce complexe a été décrit pour réguler l'autophagie spécifique des agrégats d'Huntingtine (Carra et al. 2008c). Michel Abou-

Samra, au laboratoire, a montré que *bag3* et *hspB8* sont exprimés différemment dans les cellules témoins et dépourvues de NFκB, soumises à une hyperthermie (résultats obtenus par l'analyse de *microarrays* et validés par PCR quantitative). NFκB régule directement l'expression de ces deux gènes ; toutefois, les expériences de CHIP, menées par Boris Guyot, n'ont pas permis de révéler les sites de fixation de NFκB sur leurs promoteurs. Au niveau protéique, l'analyse cinétique indique un pic d'accumulation de BAG3 et HspB8 6 heures après le choc thermique dans les lignées témoins, associé à une accumulation du complexe. Dans les cellules déficientes pour NFκB, le pic n'est que très faiblement détecté et le taux de complexes est très réduit. Le complexe BAG3-HspB8 étant un activateur de l'autophagie (Carra et al. 2009b), NFκB pourrait donc augmenter l'expression de ces protéines et accroître la survie des cellules, grâce à l'élimination des protéines agrégées.

Ces résultats indiquent donc que les cellules dépourvues de NFκB ne semblent pas capables de gérer et résorber les agrégats protéiques induits par l'hyperthermie, ce qui les rend plus sensibles à ce traitement. De plus, l'élimination de l'agrésome formé suite au stress thermique semble dépendante d'un mécanisme autophagique initié par la formation, dépendante de NFκB, du complexe BAG3/HspB8.

**NF- κ B regulates protein quality control after heat stress through modulation of
BAG3/HspB8 complex**

Mathieu Nivon¹, Michel Abou-Samra¹, Emma Richet², Boris Guyot¹, André-Patrick Arrigo¹,
Carole Kretz-Remy^{1*}

¹ Université de Lyon, F-69622, Lyon, France;

Université Lyon 1, Villeurbanne;

CNRS, UMR5534, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire.

² Division of Ocular biology and therapeutics (ORBIT), Institute of Ophthalmology, 11-43

Bath Street, London EC1V 9EL, United Kingdom.

7731 words

Short title: NF- κ B regulates protein quality control

Key words: NF- κ B, heat shock, autophagy, aggrephagy, protein quality control, protein aggregation, BAG3, HspB8.

Corresponding author*: Carole Kretz-Remy, CG ϕ MC, CNRS-UMR5534, Bât. G. Mendel, 16 Rue Dubois, Université Claude Bernard Lyon 1, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

Mailing address: Carole.Kretz@univ-lyon1.fr; Phone number: +33 4 72 44 79 57; Fax number: +33 4 72 43 26 85.

Summary

We have previously described that NF- κ B transcription factor is activated during the recovery period after heat shock; moreover, we demonstrated that NF- κ B is essential for cell survival after heat shock by activating autophagy, a mechanism that probably helps the cell to cope with hyperthermic stress through clearance of damaged proteins. In this study, we analyze NF- κ B involvement in basal and heat stress-induced protein quality control, by comparing the level of multiubiquitinated and/or aggregated proteins, proteasome and autophagic activities in NF- κ B-competent and -incompetent cells. We show that NF- κ B has only a minor role in basal protein quality control by modulating autophagosome maturation; in contrast, we show here and for the first time that NF- κ B is a key player of protein quality control after hyperthermia. Indeed, NF- κ B-incompetent cells show highly increased levels of multiubiquitinated and/or aggregated proteins and aggresome clearance defects; a phenotype that disappears when NF- κ B activity is restored to standard level. We demonstrate that, during heat shock recovery, NF- κ B activates selective removal of misfolded/aggregated proteins, a process also called “aggrephagy”, by controlling the expression of *bag3* and *hspB8* and by modulating the level of BAG3/HspB8 complex. Thus NF- κ B mediated increase in BAG3/HspB8 levels leads to aggrephagy up regulation and clearance of irreversibly damaged proteins and may increase cell survival to hyperthermia.

Introduction

To be functional, most proteins must adopt a defined three-dimensional structure called the native fold. Protein folding begins as soon as proteins are synthesized at ribosomes; newly made and partially folded polypeptides often expose hydrophobic domains that can lead to inappropriate protein association and/or aggregation (Cabrita et al., 2010; Harms et al., 2001; Saibil, 2008). Protein aggregation is dependent upon particular mutations (Wetzel, 1994) or errors during translation (Cabrita et al., 2010) but can also be promoted by environmental changes such as pH, ionic strength (Chi et al., 2003), UV irradiation (Borkman et al., 1996), oxidative (Norris and Giasson, 2005) or heat stresses (Pinto et al., 1991). Since aggregates can trap transcription factors and/or cytosolic signaling components, they are often toxic for the cell. Therefore, cells are equipped with various Protein Quality Control (PQC) mechanisms to minimize misfolding, mainly through chaperones machinery (Saibil, 2008), and eliminate misfolded and/or aggregated proteins, principally by Ubiquitin Proteasome System (UPS) (Goldberg, 2003) and lysosomal compartments (Clague and Urbe, 2010). When refolding and proteolytic processes are overwhelmed, misfolded proteins can form toxic aggregates (Garcia-Mata et al., 2002). Cells respond to the presence of aggregates by addressing them to the MicroTubule Organizing Center (MTOC) where they form a unique large “storage-bin” structure called aggresome (Garcia-Mata et al., 1999). Thanks to a Vimentin coat surrounding aggresome, non-native proteins are then unable to interact with well-functioning cell components (Johnston et al., 1998). The only known process that can lead to aggresome degradation is the autophagy-lysosomal pathway (Filimonenko et al., 2010).

Autophagy is a cellular process of self-eating (Mehrpour et al., 2010). It consists in forming double membrane vesicles called autophagosomes that engulf parts of the cytoplasm and then fuse with lysosomes, leading to the formation of autophagolysosomes where enclosed

material will be degraded by lysosomal proteases (Mehrpour et al., 2010). This phenomenon is regulated by *Atg* gene products and requires the interaction of class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) with the tumor suppressor Beclin 1 and two ubiquitin-like conjugation systems, Atg12-Atg5 plus LC3-phosphatidylethanolamine (Xie and Klionsky, 2007). Autophagy is under the control of various signal transduction pathways (Kamada et al., 2000; Pattingre et al., 2008). It is active at basal level in most cell types and regulates long-lived proteins and organelles turnover (Mehrpour et al., 2010). Autophagy is also induced to maintain cellular ATP energy during starvation (Kuma et al., 2004) or to degrade protein aggregates during proteinopathic diseases such as muscular disorders or neurodegenerations (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Recently, autophagy was reported to be activated by heat stress (Komata et al., 2004) and we demonstrated that this activation requires the activation of NF- κ B transcription factor (Nivon et al., 2009).

NF- κ B belongs to the Rel/NF- κ B transcription factor family. The most frequent heterodimer association, consisting of RelA (also known as p65) and p50 is called NF- κ B (Ghosh et al., 1998). It is an inducible transcription factor that is inactivated by binding to an inhibitory subunit of the I κ B family. Most of I κ B members inhibit NF- κ B by blocking both its DNA binding and transactivation abilities (Hayden and Ghosh, 2004). Hence, NF- κ B activation requires the dissociation of the NF- κ B/I κ B complex. Most inducers (Pahl, 1999) activate NF- κ B/I κ B dissociation through the “canonical” pathway consisting in IKK kinase phosphorylation, which in turn leads to I κ B phosphorylation and ubiquitination prior to its degradation by the 26S proteasome (Hayden and Ghosh, 2004). However, some inducers activate NF- κ B through non-canonical pathways. For instance, UV or amino acid analog treatments induce I κ B degradation without any prior phosphorylation (Kretz-Remy et al., 1998; Li and Karin, 1998). We also showed that NF- κ B activation by heat stress does not

require any IKK activation nor I κ B phosphorylation and degradation but is concomitant with a dissociation of the NF- κ B/I κ B complex (Kretz-Remy et al., 2001).

Heat shock (HS) induces many cellular alterations such as protein misfolding/aggregation (depending on heat stress severity) (Pinto et al., 1991), cell cycle arrest (Kuhl and Rensing, 2000), modulation of membrane fluidity (Balogh et al., 2005), redox state (Davidson and Schiestl, 2001) and transcription modulation (Park et al., 2005). Indeed, during heat stress, heat shock genes are preferentially transcribed (Morimoto and Santoro, 1998). The resulting heat shock proteins (Hsps) are molecular chaperones that help the cell to cope with misfolded proteins by either refolding them or addressing them to the degradative systems (Young et al., 2004). Recently, we have demonstrated that hyperthermia induces another survival pathway, the autophagy activation by NF- κ B (Nivon et al., 2009). Moreover, we observed that aberrantly folded/aggregated proteins play an essential role in triggering NF- κ B and autophagy activation during HS recovery. This suggests that NF- κ B may be involved in the cellular response to intracellular protein aggregation.

Here, we thus examined the involvement of NF- κ B in basal and heat stress-induced PQC, by comparing protein aggregation, proteasome and autophagic activities in NF- κ B-competent and p65/RelA-depleted cells. We observed that NF- κ B involvement in basal PQC was quite modest, as NF- κ B was observed to only partially modulate autophagosome fusion to lysosomes. In contrast, after heat stress, NF- κ B-depleted cells accumulated much more protein aggregates than NF- κ B competent cells, yet the kinetics of aggresome formation was similar in both cell types. However, we observed that aggresome clearance was greatly delayed/altered in NF- κ B-depleted cells. This impairment was not dependent on modification of the chaperone machinery or of proteasome activity but was the consequence of a lack of autophagy stimulation. Indeed, we demonstrated that in NF- κ B-depleted cells, the expression of *bag3* and *hspB8* genes and the formation of BAG3/HspB8 complex, which has been

described to selectively activate autophagic removal of misfolded proteins, are down regulated.

Results

NF- κ B involvement in basal protein quality control

We previously reported that autophagy activation by NF- κ B is essential for cell survival after HS and that aberrantly folded/aggregated proteins trigger HS-induced NF- κ B and autophagy (Nivon et al., 2009). We thus hypothesized that autophagy modulation by NF- κ B may help the cell to clear misfolded/aggregated proteins induced by HS and thus involving NF- κ B transcription factor in PQC. We first assessed whether NF- κ B could be involved in basal PQC. To this end, we measured the level of protein aggregates conjugated to Multiubiquitin in control (HeLa and Hela-cont#1) and p65-depleted HeLa cells (p65-KD#1 and -KD#2). As seen in figure 1A, under normal growth conditions, the level of multiubiquitinated proteins was higher in p65-depleted cells than in control cells (see total cell extracts). Moreover, restoring standard p65 level by transfecting p65-KD#2 cells with p65 expression vector (p65-KD#2 + p65FL) reversed this increased multiubiquitination of proteins (Fig. 1B). The distribution of multiubiquitinated proteins into Triton-soluble and -insoluble fractions was next analyzed. While in control cells most of multiubiquitinated proteins were soluble into Triton, in p65-depleted ones, multiubiquitinated proteins were predominantly Triton-insoluble (Fig. 1A). The same characteristics of accumulation and solubility were observed with the ubiquitin-binding protein p62/SQSTM1, a protein overexpressed in aggregate-prone conditions and which accumulation is described to be a good marker of protein aggregation (Tanida and Waguri, 2010). To confirm those results, filter trap analysis of protein aggregation in control and p65-depleted cells was performed (Fig. 1C and D). Four different dilutions of total protein extracts from each cell line were slot-blotted onto a nitrocellulose membrane. While soluble proteins passed through the membrane, protein aggregates were trapped on the membrane and were immunodetected with Multiubiquitin or p62 antibodies. In p65-depleted cells, we observed a 1.5 to 3 fold higher detection of protein aggregates

conjugated to Multiubiquitin or associated to p62 than in control cells (Fig. 1C). Moreover, this increase in SDS-insoluble aggregates was reversed when p65 level was restored to standard levels (Fig. 1D, see p65-KD#2 + p65FL). Hence, our results indicate that p65-depleted cells possess a higher content of protein aggregates under basal conditions than control cells.

Such a phenotype can be the consequence of any modification of the cellular refolding machinery or of protein degradation pathways. We previously reported that absence of p65 does not alter Hsps expression and global folding activity in HeLa cells (Nivon et al., 2009). Moreover, in this study, we observed that p65 depletion did not modulate main Hsps (Hsp27, 70 and 90) distribution into Triton-soluble and -insoluble fractions (supplementary Figure S1), suggesting that accumulation of multiubiquitinated and aggregated proteins is not a consequence of any alteration of Hsps levels and/or chaperone activity. We thus checked whether multiubiquitinated protein accumulation was a consequence of any impairment of protein degradation. To this end, we analyzed, in control and p65-depleted cell lines under basal growth conditions, proteasome and autophagy activities. As seen in figure 2A, p65 depletion only slightly increased chymotrypsin- (p65-KD#2) and caspase-like (p65-KD#1 and p65-KD#2) activities of 26S proteasome but did not significantly modify its trypsin-like activity. The distinct modulation observed, between p65-KD#1 and p65-KD#2 cell lines, may be related to the differences of p65 levels in those cells, as KD#1 cells show less depletion of p65 (50% depletion) than KD#2 ones (90% depletion) (Nivon et al., 2009). Then, we focused on autophagy and analyzed LC3 protein levels and more precisely LC3-II formation, which is formed upon autophagy activation (Tanida et al., 2004). We observed that the level of LC3-II protein was higher (1.5 to 2.2 fold more) in p65-KD cell lines, the highest increase being observed in cells with the most complete p65 depletion (p65-KD#2 cells) (Fig. 2B). Moreover, LC3-II increase was augmented (3.9 fold increase) when a more complete

knockdown of p65 was achieved, by expression of shRNAs directed against p65 mRNA in p65-KD#2 cell line (Fig. 2C, see p65-KD#2 + shp65). In contrast, restoring standard p65 level in p65-KD#2 cells reversed LC3-II increase (Fig. 2D, see p65-KD#2 + p65FL), confirming that effect on LC3-II level is specific to NF- κ B. An increase of LC3-II level can be explained by: (i) a higher induction of autophagic process or (ii) an inhibition of the maturation and degradation of autophagic vesicles. To distinguish between those two mechanisms, control and p65-depleted cells were treated with Rapamycin, an autophagy inducer, or Bafilomycin A1, an inhibitor of autophagosomes maturation (Fig. 2E). Rapamycin treatment increased LC3-II level to the same extent (3 fold) in the four cell lines studied, indicating that autophagy is inducible to the same extent in p65-depleted and control cells. As for Bafilomycin treatment, the increase of LC3-II level observed after blockade of autophagosomes maturation, in comparison to non-treated cells, was slightly less intense in p65-KD cell lines than in control cell lines. This suggests that a partial blockade of autophagosome maturation could be responsible for the slight increase of LC3-II level observed in p65-deficient cells. Taken together, our results suggest that under basal growth conditions NF- κ B is involved in a modest regulation of PQC, facilitating autophagosomes fusion to lysosomes and thus clearance of misfolded/aggregated proteins.

NF- κ B is involved in protein quality control during heat shock recovery

We then assessed whether and how NF- κ B was involved in PQC after a protein aggregation stress. Indeed, in our previous paper we showed that p65-depleted cells are more sensitive to hyperthermia treatment, a well-known inducer of protein aggregation; this sensitivity is linked to an impairment of autophagy induction after heat shock. In addition, we demonstrated that protein aggregation is necessary for induction of NF- κ B-dependent autophagy suggesting that NF- κ B may be an actor of PQC after HS (Nivon et al., 2009). We thus analyzed protein

aggregate formation after hyperthermia treatment, in control and p65-depleted HeLa cells. We observed that HS induced a transient accumulation of multiubiquitinated proteins in control cells (Fig. 3A). This accumulation started immediately after HS (R0), increased until 6h of recovery (R6) and decreased to reach basal levels 24h after heat shock (R24); thus multiubiquitinated protein accumulation was cleared 24h after the onset of the heat stress. In contrast, in p65-depleted cells, accumulation of multiubiquitinated proteins was still detected 24 hours after HS. The same observations were made with the ubiquitin-binding protein p62 (Fig. 3A). However, when p65 level was restored to standard level, accumulation of multiubiquitinated proteins was then nearly identical to the one observed in control HeLa cells (supplementary Figure S2). Hence our results suggest that p65-deficient cells have a decreased ability to cope with multi-ubiquitinated protein accumulation induced by HS treatment.

To confirm these results, we performed filter trap analysis with Multiubiquitin labeling (Fig. 3B). In control cell lines (HeLa and HeLa-Cont#1), the level of multiubiquitinated aggregates was increased by 8-fold during the first 6 hours of recovery after hyperthermia and then turned back to basal level after 24h of recovery. In p65-depleted cells, the global kinetics of accumulation of protein aggregates was similar. However, the increase was much more important and was only partially absorbed after 24h of recovery (4 fold more protein aggregates in p65-KD#2 cells than in HeLa cells). To describe more accurately this phenomenon, we analyzed the distribution of multiubiquitinated proteins and p62 protein in Triton-soluble and -insoluble fractions (Fig. 3C). Most of multiubiquitinated proteins, in untreated control HeLa cells, were soluble proteins and p62 was also mainly found in soluble fraction. Immediately after heat shock, p62 and almost all multiubiquitinated proteins shifted to insoluble fraction. After 6h of recovery, p62 and multiubiquitinated proteins were found rather equally in soluble and insoluble fractions and 24h after the heat treatment, most of p62

and multiubiquitinated proteins were back to soluble fraction. In contrast, in p65-depleted cells, the insolubilization induced by HS was much more intense; furthermore, after 24h of recovery post-HS, the vast majority of p62 and multiubiquitinated proteins was still found in insoluble fraction. Consequently, those results confirm that p65-depleted cells deal less efficiently with aggregated proteins induced by HS. Moreover, analysis of the distribution of main heat shock proteins in soluble and insoluble fractions, led to the observation of a small enrichment of Hsp90 and Hsp27 in insoluble fractions of p65-depleted cells submitted to HS in comparison to control cells (supplementary Figure S3). Thereby, these results are in favor of a delayed and/or altered clearance of protein aggregates in absence of NF- κ B.

As mentioned above, we demonstrated that p65-depletion inhibits heat-induced autophagy (Nivon et al., 2009). Interestingly, autophagy and UPS are interconnected; for instance, an autophagy blockade has been shown to inhibit proteasome activities due to proteasome saturation (Korolchuk et al., 2009). Subsequently, we quantified proteasome activities during HS recovery in control and p65-depleted cell lines. We observed an increase of proteasome activities in both cell lines immediately after HS (R0) and thereafter an inhibition of its three activities until 24h of recovery post-HS (supplementary Figure S4), indicating that proteasome modulation after HS is not dependent on NF- κ B. In conclusion, our results demonstrate that NF- κ B is involved in protein quality control and clearance of protein aggregates during heat shock recovery. Yet, this control does not seem to involve modulation of chaperone and proteasome activities but only impairment of autophagy induction by HS.

Since HS is known to induce misfolded/aggregated proteins and thus aggresome formation (French et al., 2001; Pinto et al., 1991), which was reported to activate autophagy (Gamerding et al., 2011; Garcia-Mata et al., 2002; Yamamoto and Simonsen, 2010), we analyzed the kinetics of aggresome formation during HS recovery. p62 is described to be associated with aggresome in a structure surrounded and isolated from the cytosol by a

Vimentin cage; the aggresome formation after hyperthermia was thus monitored by immunofluorescence analysis of p62 (Fig. 4) and Vimentin (supplementary Figure S5) in control and p65-depleted HeLa cells. As seen in Figure 4A and B, in untreated (NT) control cells, p62 distribution was diffused into the cytoplasm. Immediately after HS (R0), cells became rounded and p62 relocalized around the nucleus. At 6h of recovery, p62 antibodies labeled a unique structure near the nucleus and co-localized with Pericentrin (a component of the MTOC), indicating the formation of an aggresome. 24h after the heat stress, the aggresome was cleared and cells exhibited the same phenotype than untreated cells. In the first 6h of recovery after the heat stress, in p65-depleted cells, observations were very similar to those performed in control cells. However, at R24 recovery time point, aggresome structure was still present in a great number of cells (10 to 20 fold more p65-depleted cells containing aggresome structure than control cells) (Fig. 4B) and was still detectable 72h after heat shock (data not shown). Immunofluorescence experiments performed with Vimentin antibody showed similar results validating the aggresome-like structure of p62-containing aggregates (supplementary Figure S5). In contrast, when p65 level was restored in p65-KD#2 cells (p65-KD#2 + p65FL), clearance of aggresome became nearly identical to the one observed in control cells (Fig. 4A and B). Hence p65 depletion does not modify aggresome formation but its clearance; consequently, the inhibition of autophagy induction by HS, in absence of NF- κ B, does not seem to be caused by any disruption of aggresome formation; it rather seems that autophagy may not be activated by aggregates and/or aggresome formation or that aggregates/aggresomes targeting to autophagosomes is strongly delayed or deficient.

NF- κ B modulates *bag3* and *hspB8* levels and BAG3/HspB8 complex formation during heat shock recovery

The BAG3/HspB8 complex is known to selectively activate autophagic removal of misfolded proteins. Indeed, HspB8 was demonstrated to recognize and link to misfolded proteins and to interact with BAG3, which in turn induces engulfment of aggregates and aggresome by autophagosomes (Carra, 2009). Thereby, we wondered if NF- κ B was involved in the modulation of *hspb8* and *bag3* levels and/or BAG3/HspB8 complex.

We first analyzed *bag3* and *hspb8* mRNA levels in control and p65-deficient cells submitted or not to a HS treatment followed by a 3h recovery period at 37°C; this was performed by quantitative RT-PCR (Fig. 5A). We observed that *bag3* mRNA level was increased by more than 18-fold after HS treatment in control HeLa cells, whereas this increase was reduced by 37% in p65-depleted cells. A more complete knockdown of p65 level in p65-KD#2 cell line (p65-KD#2 +shp65), reduced the HS stimulation by 68%, whereas the rescue of p65 level (p65-KD#2 + p65FL) completely restored the induction of *bag3* by HS. As for *hspb8* mRNA level, the HS stimulation was of 8.5-fold in control cells and reduced by 40% in p65-deficient cells. This reduction was up to 72% in p65-KD#2 cells with a more efficient p65 knockdown and completely reversed when p65 level was set to standard value. This modulation of *bag3* and *hspb8* mRNA levels by p65 was confirmed by microarray analysis (data not shown). Hence, these results suggest an involvement of NF- κ B in the modulation of expression of *bag3* and *hspb8* genes after HS. Consequently, we checked by CHIP analysis if NF- κ B could activate transcription of *bag3* and/or *hspb8* genes by binding to putative NF- κ B binding sites in their promoters (supplementary Figure S6). We could not detect any specific binding of p65 to putative NF- κ B binding sites of *bag3* and *hspb8* promoters after HS (Fig. S6B). In contrast, an increased p65 binding to *IL-8* promoter after a TNF α treatment (positive control) was detected (Fig. S6A). However, we observed after HS an increased recruitment of RNApolIII to *bag3* and *hspb8* promoters, which contain putative NF- κ B binding sites. Furthermore, this increase was no more observed in p65-KD#2 cell line (Fig. S6C). These

results suggest that NF- κ B may regulate *bag3* and *hspB8* at transcriptional level; positioning of NF- κ B occupancy on *bag3* and *hspB8* promoter will have to be further elucidated.

Then, we checked if the modulation of expression of *bag3* and *hspB8* was still detectable at protein level (Fig. 5B and C). When analyzing the kinetics of BAG3 and HspB8 expression during HS recovery, we observed a gradual increase of BAG3 and HspB8 levels in control cells until 6h of recovery post-HS and then a decrease at the R24 recovery time point. In contrast, in p65-deficient cells, no increase could be detected for HspB8 and only a faint increase was detected for BAG3 (Fig. 5B). Moreover, by analyzing BAG3 and HspB8 levels 6 hours after a heat treatment in control, p65-KD#2 and p65-KD#2 + p65FL cells we could observe that reversing p65 level to standard level in p65-KD#2 cell line restored BAG3 and HspB8 induction by HS (Fig. 5C). Thus, our results indicate that the activation of *bag3* and *hspB8* expression in response to HS is dependent on NF- κ B activity.

We then investigated if the NF- κ B dependent-modulation of BAG3 and HspB8 expression after HS (Fig. 6A1) could interfere with the amount of BAG3/HspB8 complexes formed during the recovery period after the heat stress (Fig. 6A and B). This was assessed by co-immunoprecipitation analysis. Proteins from control and p65-depleted cells submitted to HS treatment followed by 6h of recovery were extracted and immunoprecipitated with BAG3 antibody (I) or control IgG (Pre-I) and revealed with HspB8 antibody. In untreated conditions, control and p65-depleted cell lines exhibited similar quantities of BAG3/HspB8 complexes (Fig. 6A). In contrast, after a heat stress, we observed an increased quantity of BAG3/HspB8 complex formed in control cells (2.2 fold increase) and a decreased quantity of this complex in p65-depleted cells (2.5 fold decrease) (Fig. 6A and quantification in 6B). Hence, NF- κ B regulates *bag3* and *hspB8* expression after HS; moreover this modulation has repercussion on the formation of BAG3/HspB8 complex, since the increase in the complex formation after HS is abrogated in p65-deficient cells. This result supports the observation of an absence of

autophagy induction in p65-depleted cells submitted to a HS treatment consequently to the down-regulation of the BAG3/HspB8 complex, which leads to an inhibition of the degradation of protein aggregates and aggresome-like structure.

Discussion

We have previously shown that NF- κ B mediates cell survival after HS by activating the autophagic process. Moreover, we demonstrated that heat shock-denatured proteins are key factors for NF- κ B and autophagy activation during heat shock recovery (Nivon et al., 2009). This let us hypothesize that NF- κ B-dependent autophagy may help the cell to clear protein aggregates generated by HS conditions. Here our interest was therefore to determine if NF- κ B is involved in PQC after a heat stress but also in basal growth conditions.

We first analyzed NF- κ B involvement in basal PQC by quantifying the level of misfolded/aggregated proteins in p65-depleted cells under basal growth conditions. Indeed, any alteration of PQC processes usually results in accumulation of misfolded/aggregated proteins (Hamano et al., 2008; Korolchuk et al., 2009; Latonen et al., 2011; Welch, 2004; Wilde et al., 2011). We observed that NF- κ B-deficient cells possess a higher content of multiubiquitinated and aggregated proteins than control cells. Moreover, restoring an identical p65 level to the one measured in control cells, by overexpressing p65 protein in p65-depleted cells, completely reversed the accumulation of aggregated proteins, demonstrating the specificity of the shRNA and of the phenotype observed toward NF- κ B. Our observations thus suggest that basal PQC is less efficient in NF- κ B-depleted cells. Major actors of PQC are the following: molecular chaperones, UPS and autophagy (Arrigo et al., 2007; Marques et al., 2006). We have shown here and in our previous paper that the expression and solubility of main Hsps and the overall folding capacity of the chaperone machinery are not modified by p65-depletion (Nivon et al., 2009). We thus addressed whether UPS is altered and observed a slight increase of chymotrypsin-like and caspase-like activities in p65-depleted cells. However, we suggest that this increase is more likely to be related to the small augmentation of the level of multiubiquitinated proteins observed in p65-depleted cells. We then measured autophagic activity. Indeed, an implication for autophagy in clearance of multiubiquitinated

and aggregated proteins came from the observation that the conditional knockout of genes essential for autophagy (*atg5* or *atg7*), in mouse liver and brain, led to hepatic dysfunction and neurodegeneration with accumulation of ubiquitin-positive-aggregates (Komatsu et al., 2006; Kuma et al., 2004). We observed a small but systematic and repeatable increase of the level of LC3-II in every NF- κ B-deficient cell line analyzed. Fluctuations of the increased LC3-II levels strictly reflected the intensity of the p65-depletion obtained in the various cell lines, the highest LC3-II increases being observed in the cells with the most complete p65 depletion. Thus NF- κ B seems to specifically modulate basal autophagy and more precisely to alter autophagosome maturation rather than autophagy induction as was shown with Bafilomycin A1 treatments. However, the modest effects observed highlight the only partial involvement of NF- κ B in the modulation of basal autophagy. But since this process is described to achieve cellular homeostasis by regulating long-lived protein turnover and eliminating protein aggregates (Mehrpour et al., 2010) a partial blockade of autophagosome maturation could nevertheless be responsible for the modest accumulation of aggregated proteins, such as what was observed in p65-depleted cells. p65 has already been described to modulate basal autophagy by regulating *beclin1* transcription in HEK293 and Jurkat cells (Copetti et al., 2009). However, by performing microarrays and qPCR experiments, we did not observe any differential expression of *beclin1* in control and p65-depleted HeLa cells, suggesting that *beclin1* is not, in our conditions, a target for basal autophagy modulation by NF- κ B. Our observation that NF- κ B may partially modulate autophagosome maturation could imply a role for NF- κ B in the modulation of lysosomal acidification or fusion to lysosomes. Indeed, Bafilomycin A1, a specific inhibitor of the V0 subunit of vacuolar proton ATPase is described to prevent maturation of autophagosomes (Klionsky et al., 2008); it was also recently demonstrated that a deficiency of the vacuolar proton ATPase homolog VMA21, which is responsible for X-linked myopathy, induces an accumulation of autophagic vacuoles

and interrupts autophagic flux (Ramachandran et al., 2009). Of interest, some preliminary results (microarrays and qPCR) suggested that ATP6V0D2, a subunit of the vacuolar proton ATPase, is differentially expressed between control and p65-depleted cells after HS. Whether a partial modulation of ATP6V0D2 by NF- κ B could be responsible for NF- κ B modulation of basal autophagy will be investigated.

Since HS induces protein misfolding/aggregation that is toxic for the cell and that NF- κ B-depleted cells are far more sensitive to hyperthermia treatments, we also assessed whether NF- κ B was involved in PQC after HS. We observed a higher increase of multiubiquitinated/aggregated proteins in NF- κ B-depleted cells and an important delay in the clearance of those aggregates. Hence, NF- κ B modulates clearance of misfolded/aggregated proteins. By measuring proteasome activities during HS recovery, we observed a similar proteasome blockade in control and NF- κ B-deficient cells. This blockade by hyperthermia is a commonly described process probably due to sequestering of proteasome by aggregated proteins that it cannot degrade (Pajonk et al., 2005) and thus is not part of NF- κ B modulation of PQC. In our previous paper, we demonstrated that autophagy induction by heat shock is drastically reduced in NF- κ B-depleted cells (Nivon et al., 2009), which may explain the altered elimination of protein aggregates in NF- κ B-depleted cells. Indeed, over the past several years it has become evident that autophagy is not only an unspecific but also a selective degradative pathway involved in the removing of misfolded/aggregated proteins in the cytosol, which is then called aggrephagy (Yamamoto and Simonsen, 2010). However, it is also known that cells respond to protein aggregation by gathering aggregates into a unique structure termed aggresome that can activate autophagy (Garcia-Mata et al., 1999). Thereby, we analyzed the kinetic of aggresome formation during HS recovery and observed that it is not altered in p65-depleted cells; in contrast, aggresome clearance is very importantly delayed/altered in NF- κ B-deficient cells, since 40% of those cells still contain an aggresome

24 hours after HS, compared to 3% of the control cells. Thus it seems that NF- κ B regulates PQC by either modulating autophagy induction by aggregates/aggresomes or by modulating aggresome targeting to autophagosomes. We consequently focused on BAG3, an Hsp70 co-chaperone, which gene transcription is activated by HS (through HSF1 transcription factor) (Pagliuca et al., 2003; Song et al., 2010). BAG3 was recently described to be a molecular switch that determines if proteins are degraded in a proteasomal or autophagic manner (Gamerding et al., 2009) and was found to increase autophagic activity (Carra, 2009). At last, when interacting with HspB8, BAG3 was described to selectively activate autophagic removal of misfolded proteins and aggresome (Carra et al., 2008b). We observed that HS increased *bag3* and *hspB8* mRNA levels in an NF- κ B-dependent manner. Moreover, the highest p65 depletion obtained led to a reduction of HS-stimulation of *bag3* and *hspB8* of 70% whereas the rescue of NF- κ B activity completely reversed the HS-stimulation to standard values; thus we conclude that NF- κ B is a major regulator of *bag3* and *hspB8* under HS recovery but also that other minor players may be involved in *bag3* and *hspB8* regulation after HS. CHIP analysis on putative NF- κ B binding sites of *bag3* and *hspB8* promoters did not allow us to detect any binding of p65; still, we could detect an NF- κ B-dependent recruitment of RNAPolIII to those promoters during HS recovery. Our results are therefore in favor of a transcriptional regulation of *bag3* and *hspB8* by NF- κ B. Furthermore, we observed that the HS-induction of *bag3* and *hspB8* mRNA levels was not suppressed in the presence of the translation inhibitor Cycloheximide (data not shown), suggesting a direct transcriptional regulation of *bag3* and *hspB8* by NF- κ B during HS recovery. Localization of NF- κ B binding sites in *bag3* and *hspB8* genes will be further investigated. At last, we demonstrated that the modulation of *bag3* and *hspB8* expression by NF- κ B was still detectable at protein level and interfered with the formation of BAG3/HspB8 complex. We suggest that this NF- κ B-dependent up-regulation of the formation of BAG3/HspB8 complex probably leads to an

increased clearance of protein aggregates and/or aggresome structures by autophagosomes. Indeed, BAG3/HspB8 was described to prevent aggregation of Htt43Q, a pathogenic form of Huntingtin polypeptide (Carra et al., 2008a). Furthermore, knocking down the endogenous BAG3/HspB8 complex resulted in decreased levels of LC3-II and increased Htt43Q aggregation, which strictly parallels our observations; indeed, we showed that NF- κ B deficiency induces a down-regulation of BAG3/HspB8 complex after HS, associated to a decreased autophagic process and an increase of protein aggregation. The involvement of BAG3/HspB8 in aggrephagy regulation is thought to take place at two levels: selectivity and induction. HspB8, as a molecular chaperone, is able to recognize aggregating proteins and to bind to BAG3 (Fuchs et al., 2009), thus presenting substrate protein to the autophagic machinery for degradation (Carra et al., 2008b). The BAG3/HspB8 complex can therefore mediate autophagy activation in close proximity to protein aggregates and aggresome, leading to aggrephagy (Gamerding et al., 2011). Of interest, mutants of HspB8 are responsible for neuropathies and neuromuscular disorders (Fontaine et al., 2006) and BAG3 mutants induce severe myopathies (Selcen et al., 2009). Here we demonstrate that this complex is regulated by NF- κ B after hyperthermia and thus regulates aggrephagy induction by HS. But induction of aggrephagy has also been described to be regulated by p62/SQSTM1, NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene) and Alfy (PIP3-binding autophagy-like FYVE domain protein) (Filimonenko et al., 2010; Kirkin et al., 2009; Pankiv et al., 2007). However, preliminary analysis of microarrays data did not allow us to see any differential expression of those genes in NF- κ B-competent and -incompetent cells submitted to a heat treatment.

To conclude, this study demonstrates that NF- κ B is a key player in PQC by modulating the autophagic process. This modulation is modest and partial for basal autophagy and may take place at the autophagosome maturation step. In contrast, NF- κ B seems to be a major regulator of aggrephagy after heat stress by up regulating expression of *bag3* and *hspB8* genes and the

amount of BAG3/HspB8 complex; this complex is described to be involved in selective removal of misfolded/aggregated proteins by autophagy and thus may be involved in the clearance of toxic protein aggregates induced by HS. Whether those new NF- κ B targets may be used for therapeutic modulation of autophagy during anti-cancer treatments by hyperthermia, in order to decrease cell survival to HS, will merit further investigations.

Materials and methods

Cell culture, cell lines and heat shock treatment

HeLa cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% decomplemented FCS, 1 µg/ml fungizone and 50 U/ml peni-streptomycin. p65-depleted HeLa cells expressing shRNA directed against the p65 subunit of NF-κB (p65-KD#1, p65-KD#2 and p65-KD#3) and control HeLa cells expressing scrambled shRNA (HeLa-cont#1) have been already described. p65-KD cell lines differ by their content of p65; in p65-KD#1 cell line a 50% depletion of p65 was quantified, in p65-KD#3 cell line a 60% depletion of p65 was measured, whereas a 90% depletion of p65 was observed in p65-KD#2 cell line (Nivon et al., 2009). HS treatments were performed at 43°C during 90 min.

Reagents and plasmids

Bafilomycin A1, Cycloheximide, Igepal, Hoechst and Triton X-100 are from Sigma. Rapamycin is from VWR International. MG132 is from Merck and Lactacystin from Calbiochem. The protease inhibitor Complete Mini, EDTA-free is from Roche. Fast flow Protein G Sepharose is from Amersham. Anti-HspB8 (Abnova) and anti-Hsp90, -Hsp70, -Hsp27 (Stressgen) are mouse monoclonal antibodies. Anti-actin is a mouse monoclonal antibody (Chemicon). Anti-p62/SQSTM1 is a mouse monoclonal antibody from Becton Dickinson Biosciences. Mouse monoclonal anti-multi-ubiquitin, clone FK1, is from MBL. Anti-Vimentin is a monoclonal antibody from Sigma. Anti-BAG3, anti-Pericentrin (Abcam) and anti-p65 (Upstate for western blots and Abcam anti-p65-ChIP grade for ChIP analysis) are rabbit polyclonal antibodies. Rabbit polyclonal anti-LC3 antibody has been already described (Chaumorcel et al., 2008). Rabbit immunoglobulins are commercialized by Santa Cruz. p65FL expression vector was a kind gift from Dr R. Dikstein and was described elsewhere (Yamit-Hezi and Dikstein, 1998). pSUPER RNAI vector generated with “25”

sequence has been already described (Nivon et al., 2009) and allows expression of p65-shRNA directed against mRNAs encoding the p65 subunit of NF- κ B.

Gel electrophoresis and immunoblotting

Briefly, 10 μ g of total protein extracts were submitted to SDS-Page. After electrophoresis, proteins were transferred to Protran BA85 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell). Blots were then incubated with primary and horse radish-conjugated secondary antibodies and revealed with the ECL detection kit (Amersham Biosciences). For HspB8 and BAG3 blotting, 20 μ g (HspB8) or 3 μ g (BAG3) of total protein extracts were used.

Triton-soluble and -insoluble protein fractionation

$2 \cdot 10^6$ cells were plated in 100 mm dishes. The day after, cells were submitted to various treatments. They were then lysed on ice during 30 min in 0.1% TritonX100-TEM Buffer (20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA), using a dounce homogenizer. Thereafter, total cell extracts were submitted to a 15 min centrifuge at 16,000g to separate soluble (supernatant) and insoluble (pellet) fractions. These fractions were submitted to SDS-Page and immunoblotting with either an anti-Multiubiquitin or an anti-p62 antibody as described above.

Filter trap assay

SDS-insoluble protein aggregates conjugated to Multiubiquitin or containing p62 protein were analyzed by filter trap assay as previously described (Carra et al., 2005; Nivon et al., 2009). Briefly, cells were scraped in FTA buffer (150 mM NaCl, 50 mM DTT, 10 mM Tris-HCl pH 8) supplemented with 2% SDS. Samples were then homogenized by three passages through 25-gauge needle. 2.5 μ g of protein extracts were then diluted (1, 1/2, 1/4 and 1/8) and

applied with mild suction into a slot blot apparatus, onto Protran BA83 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) pre-washed with 0.1% SDS-FTA buffer. The membrane was then washed with 0.1% SDS-FTA buffer and TBS-Tween 0.1% (TBS: 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl) and processed for immunoblotting with either an anti-Multiubiquitin or an anti-p62 antibody as described above.

Fluorescence microscopy analysis

Cells were grown on glass coverslips. Thereafter, they were submitted to hyperthermia treatments followed by various recovery periods at 37°C, rinsed in PBS, fixed for 10 min with 2% paraformaldehyde pH 7.4 and permeabilized for 10 min with ice-cold methanol. Cells were then stained with primary (anti-Pericentrin, anti-p62 or anti-Vimentin) and fluorescent secondary antibodies (goat anti-mouse AlexaFluor 568nm and goat anti-rabbit AlexaFluor 488 nm). Hoechst reagent was used to stain nuclei (5 min, 1 ng/ml). The stained cells were observed with 365/12 excitation band-397emission (Hoechst), 475/40 excitation band-530/50 emission band (Alexa488) and 545/25 excitation band-605/70 emission band (Alexa568) filters and 63x*10x objectives. They were photographed with a Zeiss axiovert 200M photomicroscope (Carl Zeiss, Inc.). Images were digitized with a camera (Coolsnap HQ2; Roper Scientific) and acquired with Metavue™ Imaging system; brightness and contrasts of images were adjusted using Photoshop CS2 (Macintosh version, Adobe).

Proteasome assay

Cells, grown in phenol red-free medium, were plated in 96-well-plates with 10,000 cells/well. The day after, they were submitted to various treatments. Proteasome inhibitors MG132 and Lactacystin (2h, 10 µM) were used as negative controls. Caspase-like, Trypsin-like and Chymotrypsin-like activities of the proteasome were quantified with fluorescent probes (Z-

nLPnLD-aminoluciferin, Z-LRR-aminoluciferin and Suc-LLVY-aminoluciferin respectively). The probes were used according to the Manufacturer's Instructions (Promega, Proteasome-Glo). Luminescence intensity was measured with a Victor³ Luminometer (Perkin Elmer). The relative light units produced were reported to 50 µg of total cellular proteins.

Real-time PCR

For expression analysis of *bag3* and *hspB8*, total RNA were isolated from $5 \cdot 10^6$ HeLa cells using Nucleospin[®] RNAII exaction kit, according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). For each condition, 1 µg of total RNA were reversed-transcribed using RevertAid[™] H Minus M-MuLV reverse transcriptase and random hexamers as per the manufacturer's recommendations (Fermentas). Real-time PCR was performed with Mx3000P[™] system (Stratagene) using Quantitect[®] SYBR Green PCR kit and Quantitect[®] primer assay (Qiagen) for *bag3*, *hspB8* and *GAPDH* transcripts. Data were normalized to the *GAPDH* internal standard. Fold differences were calculated with the mathematical model described by Pfaffl (Pfaffl, 2010).

ChiP

$4 \cdot 10^7$ cells were used and fixed for ChIP analysis as already described (Juban et al., 2009) and according to the manufacturer's instructions (Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay kit, Millipore). Immunoprecipitated and input DNA (prepared from aliquots taken before the immunoprecipitation step) were quantified by real-time PCR using a SYBR green PCR kit and the oligonucleotides used were as followed: *bag3* F: GGCGAGATGGTTTTGTTTG; *bag3* R: CGGCTTTCATAGTCGCTCTC; *hspB8* F: AGCATTTTCGGAAGCTGAAG; *hspB8* R: GCAGGAGAGGGCATCTGAC; *IL-8* F: AAGTGTGATGACTCAGGTTTGC; *IL-8* R: GAAGCTTGTGTGCTCTGCTG; *Actb* F: TTTGAGACCTTCAACACCCCAG; *Actb* R:

TTAATGTCACGCACCATTTC.

Co-Immunoprecipitation

Cells were lysed by three freezing/thawing cycles in IPP150 Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, NaCl 150 mM, Igepal 0.05%) supplemented with Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor. After centrifugation for 10 min at 10,000g, total proteins from the supernatant were pre-cleared during 1h at 4°C with Protein G Sepharose. After centrifugation for 3 min at 3,000g, the supernatant was incubated for 3h at 4°C with 2 µg of anti-BAG3 antibody (immune, I) or of rabbit immunoglobulins (Pre-immune, Pre-I). The immunocomplexes were precipitated with 80 µl of Protein G Sepharose under constant overnight agitation at 4°C. Thereafter, protein G-immunocomplexes were centrifuged, washed 4 times with IPP150 Buffer and boiled in SDS sample buffer before being analyzed by SDS-Page and immunoblotted with anti-HspB8 antibody.

Statistics

Unpaired student's *t* test was applied to compare results between two sample groups. One-way ANOVA test was also performed to test for differences among at least three groups. Differences between groups were considered statistically significant when Pvalues < 0.05. Pvalues codes were as follows: * P< 0.05, ** P< 0.01, ***P<0.001.

Acknowledgments

We wish to thank Dominique Guillet for excellent technical assistance. We thank Patrice Codogno for helpful discussion and critical analysis of our first experiments. This work was supported by the Ligue contre le Cancer, comité du Rhône (CK), the Région Rhône-Alpes, contrat Cible 2010 (CK) and BQR from Université Claude Bernard Lyon I (CK). Mathieu Nivon was supported by a doctoral fellowship from the French Department of Research and the french Medical Research Foundation (FRM).

References

Arrigo, A. P., Simon, S., Gibert, B., Kretz-Remy, C., Nivon, M., Czekalla, A., Guillet, D., Moulin, M., Diaz-Latoud, C. and Vicart, P. (2007). Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* **581**, 3665-74.

Balogh, G., Horvath, I., Nagy, E., Hoyk, Z., Benko, S., Bensaude, O. and Vigh, L. (2005). The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response. *Febs J* **272**, 6077-86.

Borkman, R. F., Knight, G. and Obi, B. (1996). The molecular chaperone alpha-crystallin inhibits UV-induced protein aggregation. *Exp Eye Res* **62**, 141-8.

Cabrita, L. D., Dobson, C. M. and Christodoulou, J. (2010). Protein folding on the ribosome. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 33-45.

Carra, S. (2009). The stress-inducible HspB8-Bag3 complex induces the eIF2alpha kinase pathway: implications for protein quality control and viral factory degradation? *Autophagy* **5**, 428-9.

Carra, S., Seguin, S. J., Lambert, H. and Landry, J. (2008a). HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem* **283**, 1437-44.

Carra, S., Seguin, S. J. and Landry, J. (2008b). HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy* **4**, 237-9.

Carra, S., Sivilotti, M., Chavez Zobel, A. T., Lambert, H. and Landry, J. (2005). HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells. *Hum Mol Genet* **14**, 1659-69.

Chaumorcel, M., Souquere, S., Pierron, G., Codogno, P. and Esclatine, A. (2008). Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy* **4**, 46-53.

Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W. and Carpenter, J. F. (2003). Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res* **20**, 1325-36.

Clague, M. J. and Urbe, S. (2010). Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* **143**, 682-5.

Copetti, T., Demarchi, F. and Schneider, C. (2009). p65/RelA binds and activates the beclin 1 promoter. *Autophagy* **5**, 858-9.

Davidson, J. F. and Schiestl, R. H. (2001). Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**, 8483-9.

Filimonenko, M., Isakson, P., Finley, K. D., Anderson, M., Jeong, H., Melia, T. J., Bartlett, B. J., Myers, K. M., Birkeland, H. C., Lamark, T. et al. (2010). The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol Cell* **38**, 265-79.

Fontaine, J. M., Sun, X., Hoppe, A. D., Simon, S., Vicart, P., Welsh, M. J. and Benndorf, R. (2006). Abnormal small heat shock protein interactions involving neuropathy-associated HSP22 (HSPB8) mutants. *FASEB J* **20**, 2168-70.

French, B. A., van Leeuwen, F., Riley, N. E., Yuan, Q. X., Bardag-Gorce, F., Gaal, K., Lue, Y. H., Marceau, N. and French, S. W. (2001). Aggresome formation in liver cells in response to different toxic mechanisms: role of the ubiquitin-proteasome pathway and the frameshift mutant of ubiquitin. *Exp Mol Pathol* **71**, 241-6.

Fuchs, M., Poirier, D. J., Seguin, S. J., Lambert, H., Carra, S., Charette, S. J. and Landry, J. (2009). Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J* **425**, 245-55.

Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Hartl, F. U. and Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *Embo J* **28**, 889-901.

Gamerding, M., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Clement, A. M. and Behl, C. (2011). BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep* **12**, 149-56.

Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E. J. and Sztul, E. S. (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* **146**, 1239-54.

Garcia-Mata, R., Gao, Y. S. and Sztul, E. (2002). Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic* **3**, 388-96.

Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225-60.

Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**, 895-9.

Hamano, T., Gendron, T. F., Causevic, E., Yen, S. H., Lin, W. L., Isidoro, C., Deture, M. and Ko, L. W. (2008). Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur J Neurosci* **27**, 1119-30.

Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. and Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**, 679-88.

Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**, 2195-224.

Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-98.

Juban, G., Giraud, G., Guyot, B., Belin, S., Diaz, J. J., Starck, J., Guillouf, C., Moreau-Gachelin, F. and Morle, F. (2009). Spi-1 and Fli-1 directly activate common target genes involved in ribosome biogenesis in Friend erythroleukemic cells. *Mol Cell Biol* **29**, 2852-64.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* **150**, 1507-13.

Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y. S., Bjorkoy, G., Nunn, J. L., Bruun, J. A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T. H., Wild, P. et al. (2009). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* **33**, 505-16.

Klionsky, D. J., Elazar, Z., Seglen, P. O. and Rubinsztein, D. C. (2008). Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* **4**, 849-950.

Komata, T., Kanzawa, T., Nashimoto, T., Aoki, H., Endo, S., Nameta, M., Takahashi, H., Yamamoto, T., Kondo, S. and Tanaka, R. (2004). Mild heat shock induces autophagic growth arrest, but not apoptosis in U251-MG and U87-MG human malignant glioma cells. *J Neurooncol* **68**, 101-11.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-4.

Korolchuk, V. I., Mansilla, A., Menzies, F. M. and Rubinsztein, D. C. (2009). Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell* **33**, 517-27.

Kretz-Remy, C., Bates, E. E. and Arrigo, A. P. (1998). Amino acid analogs activate NF-kappaB through redox-dependent IkappaB-alpha degradation by the proteasome without apparent IkappaB-alpha phosphorylation. Consequence on HIV-1 long terminal repeat activation. *J Biol Chem* **273**, 3180-91.

Kretz-Remy, C., Munsch, B. and Arrigo, A. P. (2001). NFkappa B-dependent transcriptional activation during heat shock recovery. Thermolability of the NF-kappaB.Ikappa B complex. *J Biol Chem* **276**, 43723-33.

Kuhl, N. M. and Rensing, L. (2000). Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell Mol Life Sci* **57**, 450-63.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhsa, T. and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-6.

Latonen, L., Moore, H. M., Bai, B., Jaamaa, S. and Laiho, M. (2011). Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene* **30**, 790-805.

Li, N. and Karin, M. (1998). Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13012-7.

Marques, C., Guo, W., Pereira, P., Taylor, A., Patterson, C., Evans, P. C. and Shang, F. (2006). The triage of damaged proteins: degradation by the ubiquitin-proteasome pathway or repair by molecular chaperones. *FASEB J* **20**, 741-3.

Martinez-Vicente, M. and Cuervo, A. M. (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* **6**, 352-61.

Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I. and Codogno, P. (2010). Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C776-85.

Morimoto, R. I. and Santoro, M. G. (1998). Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* **16**, 833-8.

Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Arrigo, A. P. and Kretz-Remy, C. (2009). Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy* **5**, 766-83.

Norris, E. H. and Giasson, B. I. (2005). Role of oxidative damage in protein aggregation associated with Parkinson's disease and related disorders. *Antioxid Redox Signal* **7**, 672-84.

Pagliuca, M. G., Lerosé, R., Cigliano, S. and Leone, A. (2003). Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, a modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett* **541**, 11-5.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-66.

Pajonk, F., van Ophoven, A. and McBride, W. H. (2005). Hyperthermia-induced proteasome inhibition and loss of androgen receptor expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **65**, 4836-43.

Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G. and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**, 24131-45.

Park, H. G., Han, S. I., Oh, S. Y. and Kang, H. S. (2005). Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci* **62**, 10-23.

Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M. and Codogno, P. (2008). Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* **90**, 313-23.

Pfaffl, M. W. (2010). The ongoing evolution of qPCR. *Methods* **50**, 215-6.

Pinto, M., Morange, M. and Bensaude, O. (1991). Denaturation of proteins during heat shock. In vivo recovery of solubility and activity of reporter enzymes. *J Biol Chem* **266**, 13941-6.

Ramachandran, N., Munteanu, I., Wang, P., Aubourg, P., Rilstone, J. J., Israelian, N., Naranian, T., Paroutis, P., Guo, R., Ren, Z. P. et al. (2009). VMA21

deficiency causes an autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification. *Cell* **137**, 235-46.

Saibil, H. R. (2008). Chaperone machines in action. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 35-42.

Selcen, D., Muntoni, F., Burton, B. K., Pegoraro, E., Sewry, C., Bite, A. V. and Engel, A. G. (2009). Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann Neurol* **65**, 83-9.

Song, S., Kole, S., Precht, P., Pazin, M. J. and Bernier, M. (2010). Activation of heat shock factor 1 plays a role in pyrrolidine dithiocarbamate-mediated expression of the co-chaperone BAG3. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1856-63.

Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2503-18.

Tanida, I. and Waguri, S. (2010). Measurement of autophagy in cells and tissues. *Methods Mol Biol* **648**, 193-214.

Welch, W. J. (2004). Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 31-8.

Wetzel, R. (1994). Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol* **12**, 193-8.

Wilde, I. B., Brack, M., Winget, J. M. and Mayor, T. (2011). Proteomic characterization of aggregating proteins after the inhibition of the ubiquitin proteasome system. *J Proteome Res* **10**, 1062-72.

Xie, Z. and Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**, 1102-9.

Yamamoto, A. and Simonsen, A. (2010). The elimination of accumulated and aggregated proteins: A role for aggrephagy in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.*

Yamit-Hezi, A. and Dikstein, R. (1998). TAFII105 mediates activation of anti-apoptotic genes by NF-kappaB. *Embo J* **17**, 5161-9.

Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K. and Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 781-91.

Figure legends

Fig. 1: p65 depletion increases basal protein aggregation and insolubilization.

A. Total, Triton-soluble and -insoluble protein fractions of HeLa, HeLa-Cont#1, p65-KD#1 and p65-KD#2 were separated by SDS-Page and analyzed in immunoblots probed with anti-Multiubiquitin, -p62 or -Actin (as a loading control) antibodies. B. Same as in (A) with total protein extracts from HeLa, p65-KD#2 and p65-KD#2 cells transfected with p65FL expression vector (p65-KD#2 + p65FL). Hybridization with p65 antibody was performed for controlling the restoring of p65 level. C and D. Total protein extracts of HeLa, HeLa-Cont#1, p65-KD#1, p65-KD#2 and p65-KD#2 + p65FL were prepared for filter trap assay as described in Materials and Methods. Samples were then slot-blotted at four different dilutions onto a nitrocellulose membrane and probed with anti-Multiubiquitin or -p62 antibodies.

Fig. 2: Characterization of proteasome and autophagic activities in p65-depleted HeLa cells under basal growth conditions.

A. Caspase-, chymotrypsin- and trypsin-like proteasome activities of non-treated HeLa, HeLa-Cont#1, p65-KD#1 and p65-KD#2 were quantified (see Materials and Methods). As a negative control, two proteasome inhibitors, MG132 (MG132) and Lactacystin (Lacta), were added to the cell culture medium (2h, 10 μ M). Relative luminescence is the ratio between luminescence measured in HeLa-cont or p65-KD cell lines and HeLa cells. Standard deviations of the means of three independent experiments are indicated. ANOVA test indicates statistically significant differences between control and p65-depleted cell lines for caspase-like proteasome activity and between p65-KD#2 cells and other cell lines for chymotrypsin-like activity. B. Immunoblot analysis of LC3-I and LC3-II in HeLa, HeLa-Cont#1, p65-KD#1, p65-KD#2 and p65-KD#3 protein extracts. LC3-II/Actin ratios were calculated from quantification of intensity of LC3-II and Actin bands, determined using

ImageJ (ratio was set at 1.0 for HeLa cells). C and D. Same analysis as in (B) but with protein extracts from p65-KD#2 cell lines expressing shRNA directed against p65 mRNA (p65-KD#2 + shp65) (C) or transfected with p65FL vector (p65-KD#2 + p65FL) (D). An immunoblot analysis of p65 level is also shown as a control for shRNA efficiency or restoring of p65 level. E. Same as in (B) but performed in non-treated cells (NT) or after 4h treatments with 50 nM of Rapamycin (Rap) or 10 μ M of Bafilomycin (Baf). LC3-II/Actin ratios were set at 1.0 for non-treated conditions in each cell line.

Fig. 3: p65-depleted HeLa cells show increased protein aggregation and insolubilization after HS treatment

HeLa, HeLa-Cont#1, p65-KD#1 and p65-KD#2 cell lines were submitted or not (NT) to a 90 min HS treatment at 43°C followed by 0 (R0), 6 (R6) or 24 hours (R24) of recovery at 37°C. A. Total protein extracts were analyzed in immunoblots probed with Multiubiquitin, p62 or Actin (as a loading control) antibodies. B. Total protein extracts were analyzed by filter trap assay as described in Figure 1B. Membrane was hybridized with Multiubiquitin antibody. C. Triton-soluble and -insoluble protein fractions from HeLa and p65-KD#2 cell lines were analyzed in immunoblots probed with Multiubiquitin or p62 antibodies.

Fig. 4: p65 depletion alters aggresome clearance during HS recovery.

HeLa, HeLa-Cont#1, p65-KD#1, p65-KD#2 and p65-KD#2 + p65FL cells were submitted or not (NT) to a 90 min HS treatment at 43°C followed by 0 (R0), 6 (R6) or 24 hours (R24) of recovery at 37°C. Then, cells were fixed, permeabilized and stained with Pericentrin and p62 antibodies (A). Nuclei were colored by Hoechst staining. Cells were observed with a fluorescence microscope. B. Quantification of the aggresome clearance by determination of

the percentage of cells containing an aggresome structure. Student's tests were performed between values from HeLa cells and values from other cell lines.

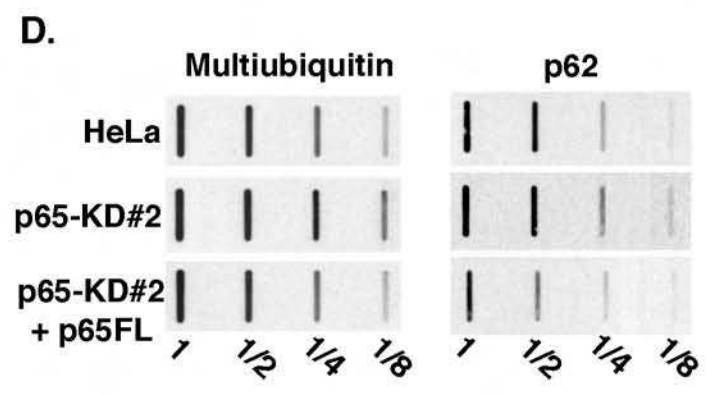
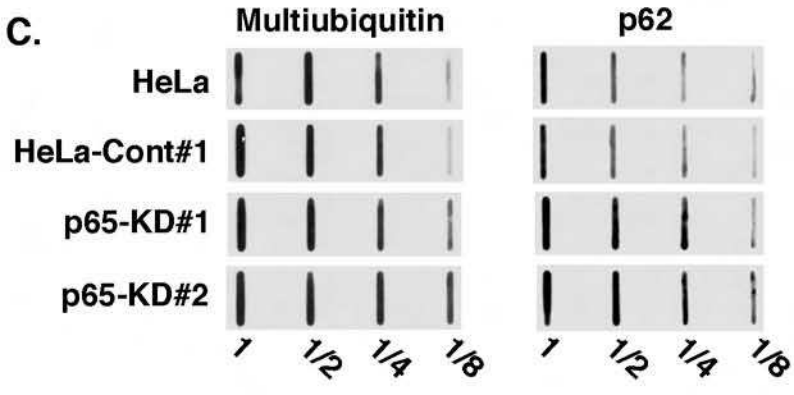
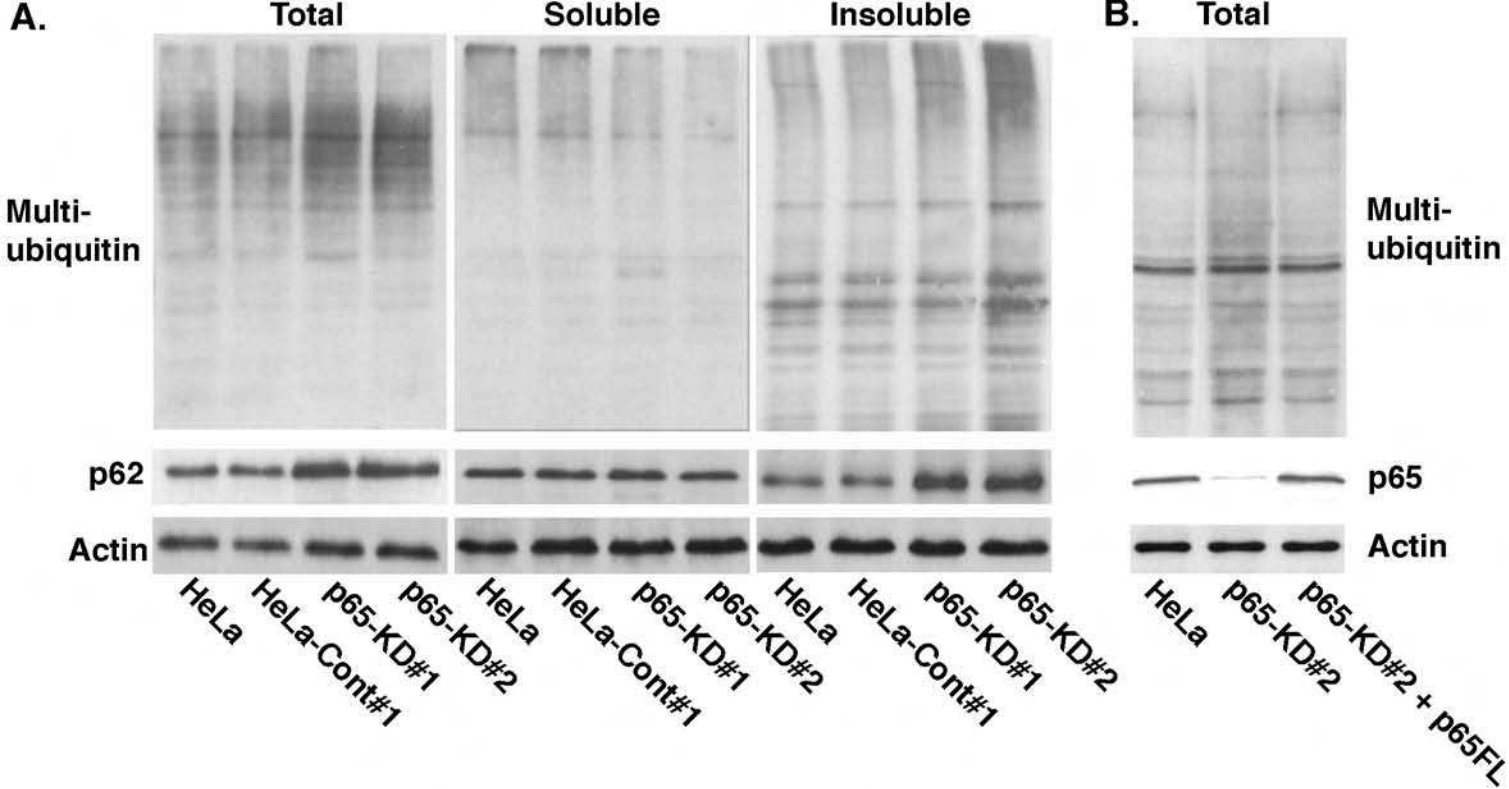
Fig. 5: NF- κ B modulates *bag3* and *hspB8* expression

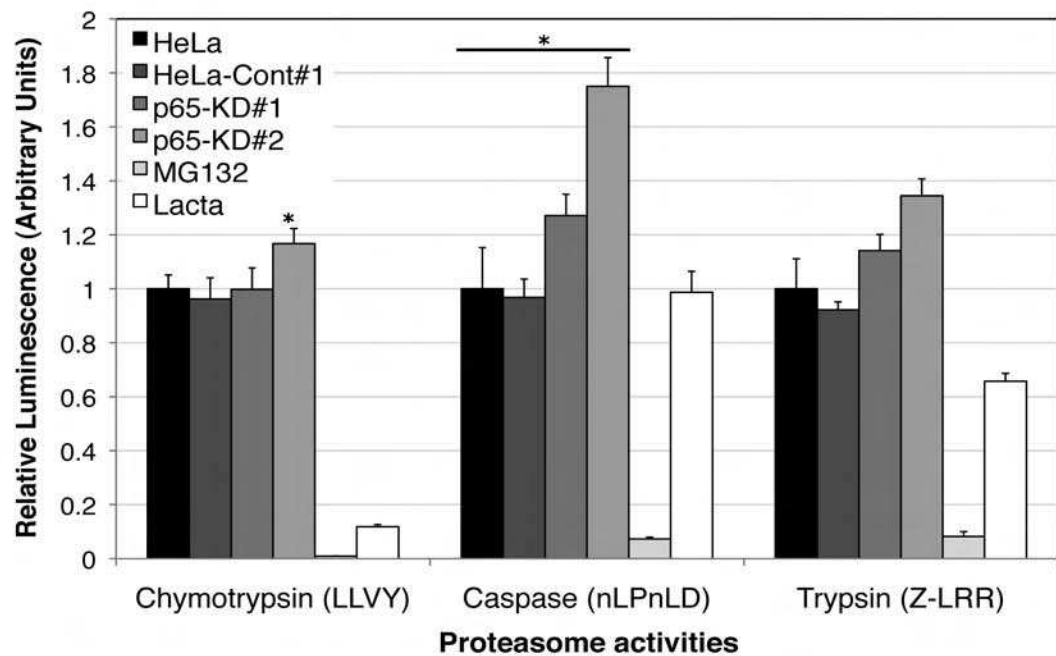
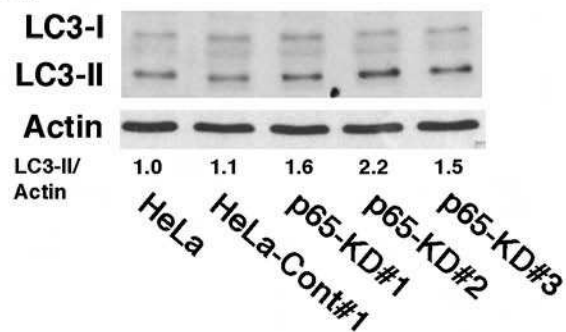
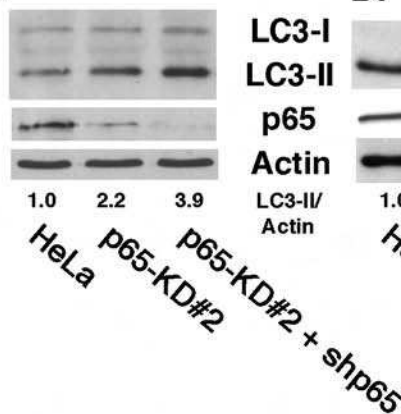
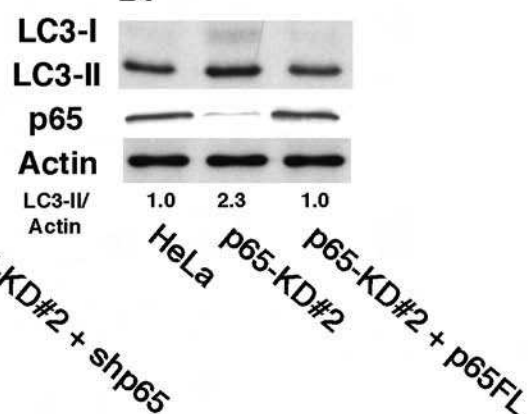
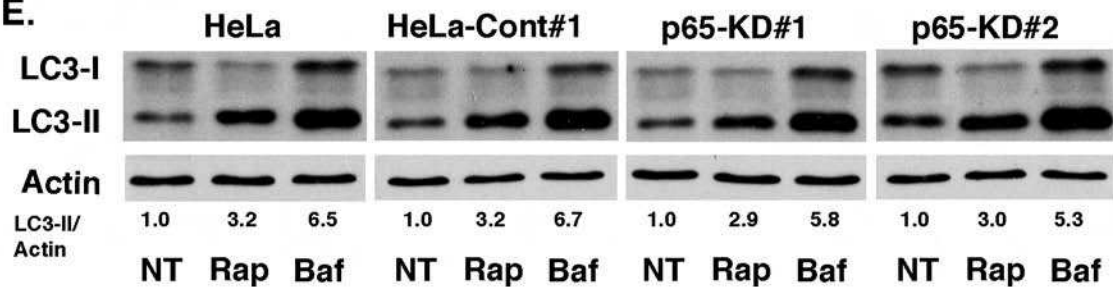
A. HeLa, p65-KD#2, p65-KD#2 + shp65 and p65-KD#2 + p65FL cells were submitted or not (NT) to a 90 min HS treatment at 43°C followed by a 3 hours recovery period at 37°C (R3). Then, quantitative RT-PCR analysis of *bag3* and *hspB8* mRNA levels was performed (see Material and Methods). Fold stimulation is the ratio between transcripts levels after HS treatment and transcripts levels in the corresponding non-treated cells. B. Total protein extracts of HeLa and p65-KD#2 cells submitted or not (NT) to a 90 min HS treatment at 43°C followed by 0 (R0), 6 (R6) or 24 hours (R24) of recovery at 37°C were analyzed in immunoblots probed with BAG3, HspB8 and Actin (as a loading control) antibodies. C. As in (B), Total protein extracts of HeLa, p65-KD#2 and p65-KD#2 + p65FL cells, submitted or not (NT) to a 90 min HS treatment at 43°C followed by 6 hours of recovery at 37°C (R6), were analyzed; an immunoblot analysis of p65 level is also shown as a control for the restoring of p65 level.

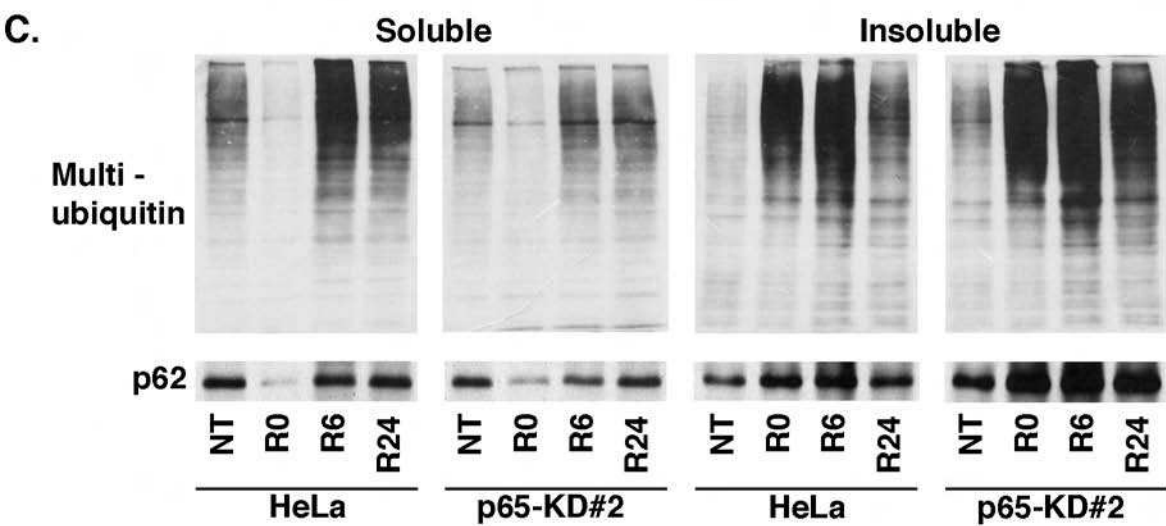
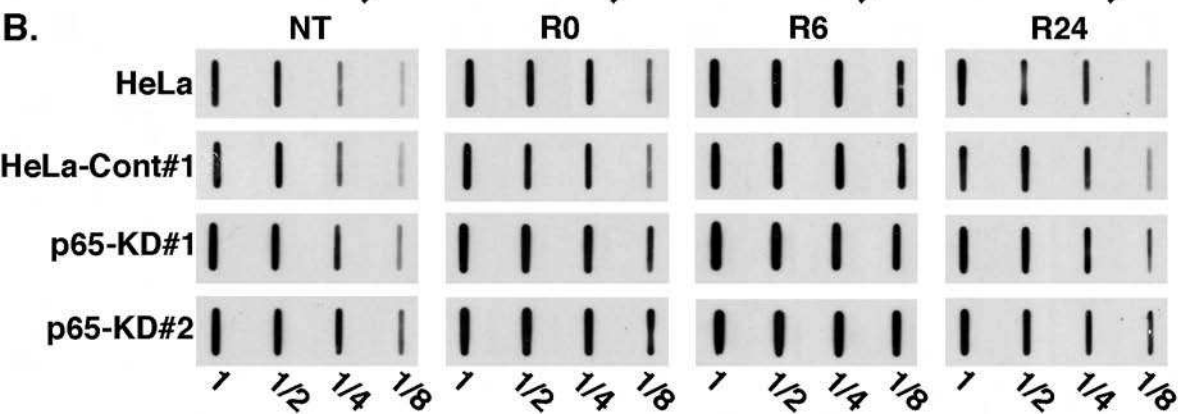
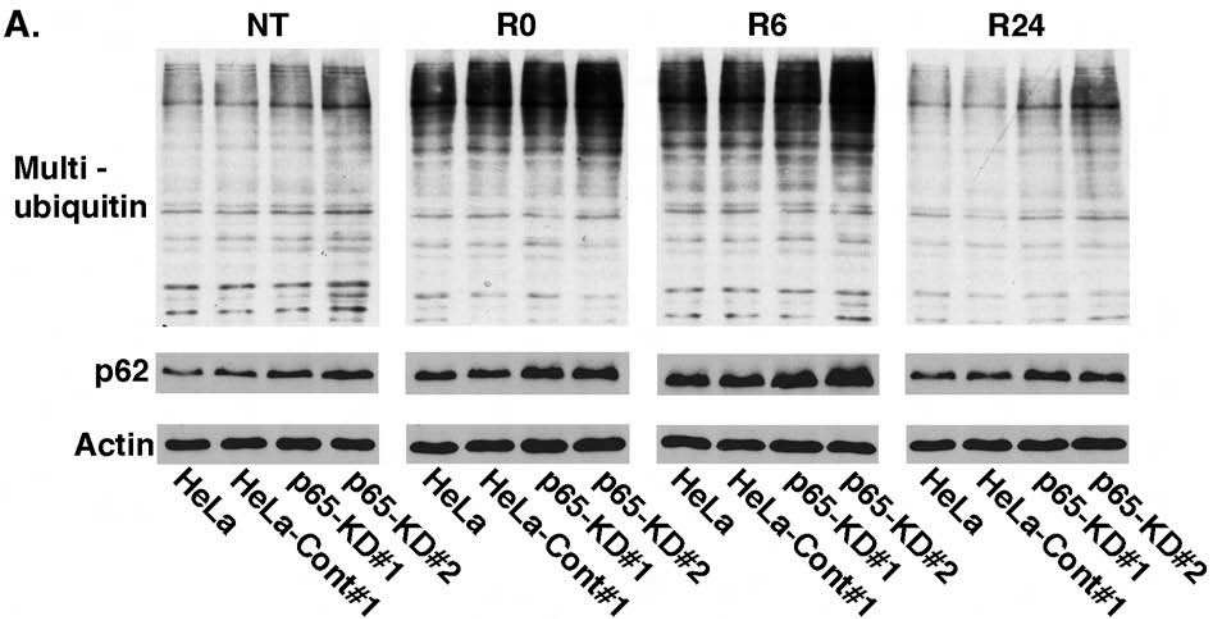
Fig. 6: NF- κ B modulates the level of BAG3/HspB8 complex

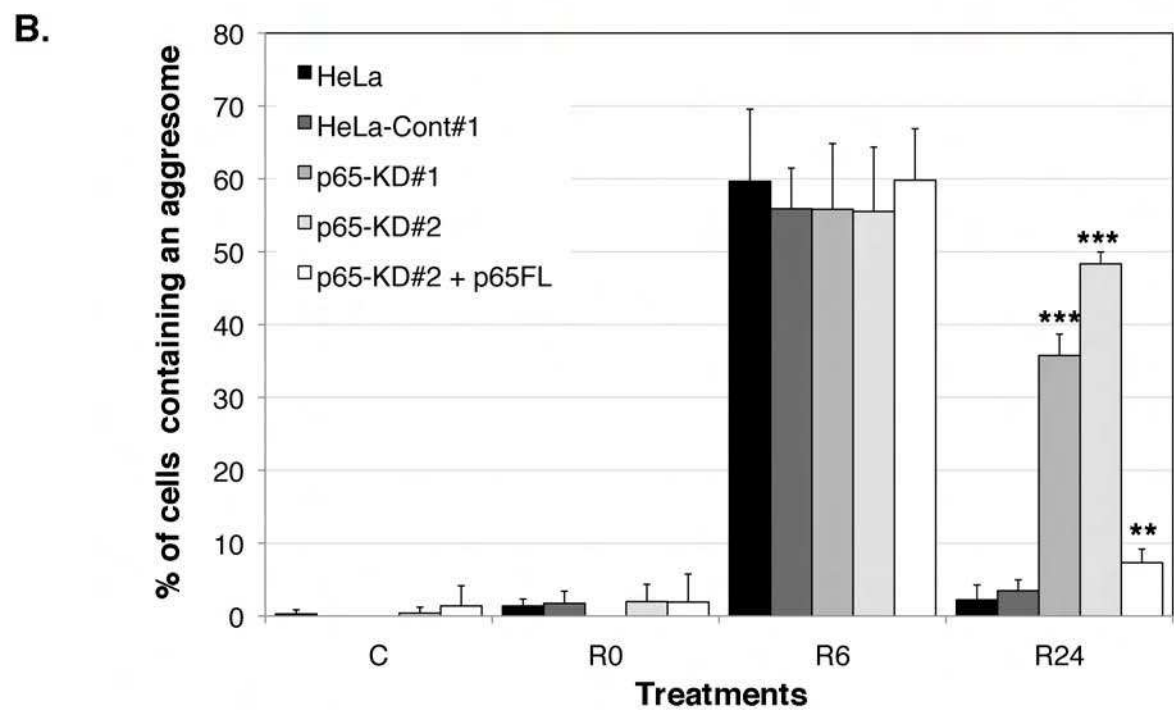
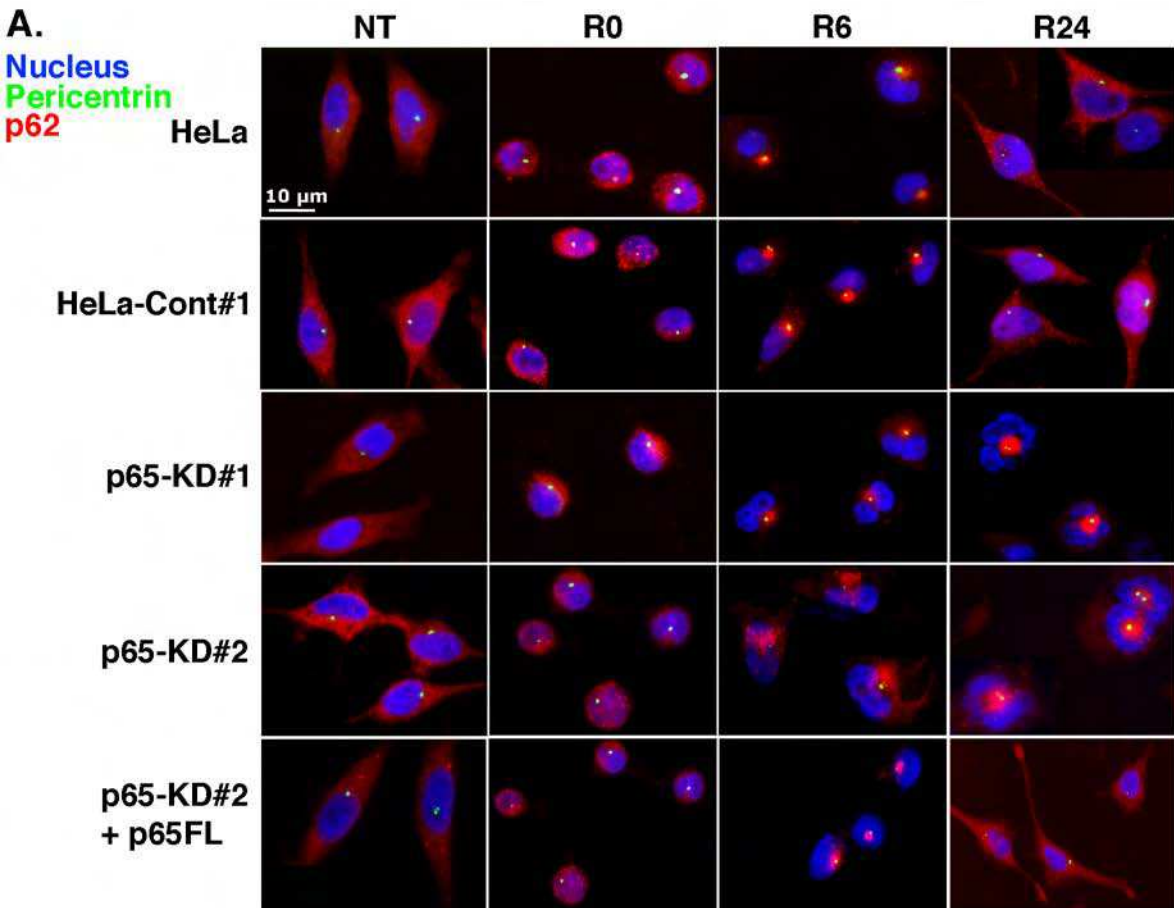
HeLa and p65-KD#2 cell lines were either left untreated (NT) or submitted to a 90 min HS treatment at 43°C followed by 6 hours of recovery at 37°C (R6). Cells were then processed for immunoprecipitation with BAG3 antibody as described in Materials and Methods. A. Lysates prior to immunoprecipitation (1) and immunocomplexes (immune (I) and pre-immune (Pre-I)) (2) were analyzed by SDS-Page and immunoblotted with anti-BAG3 and/or -HspB8 antibodies. (B) The level of BAG3/HspB8 complex was estimated from quantification of the intensities of the bands using ImageJ and reported on a graph. Level of BAG3/HspB8

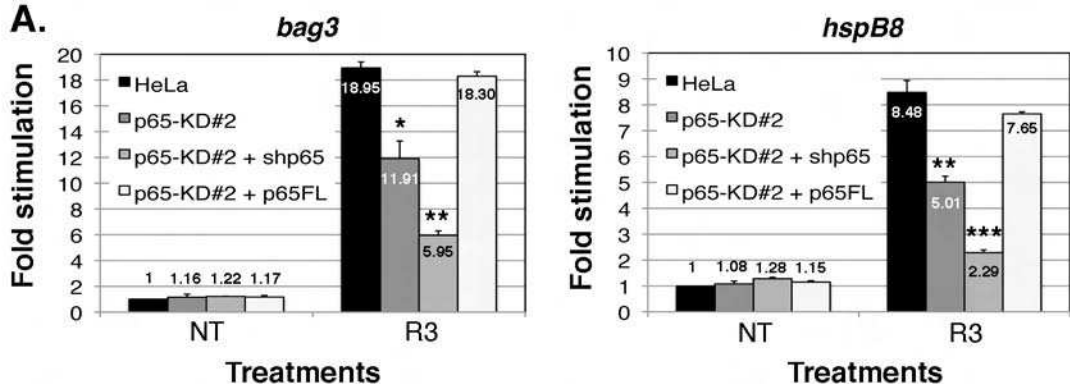
complex in non-treated HeLa cells was set at 1.0 arbitrary unit. Levels of BAG3/HspB8 complexes in other cells and conditions were reported to the level of BAG3/HspB8 complex in non-treated HeLa cells.



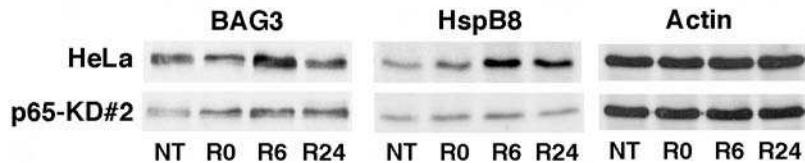
A.**B.****C.****D.****E.**



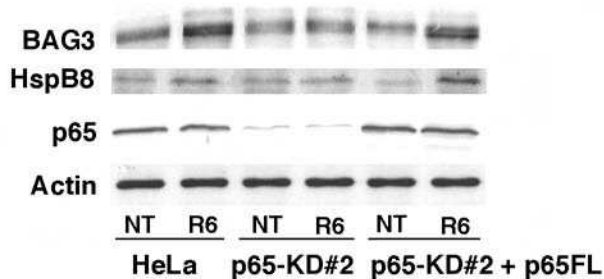




B.



C.



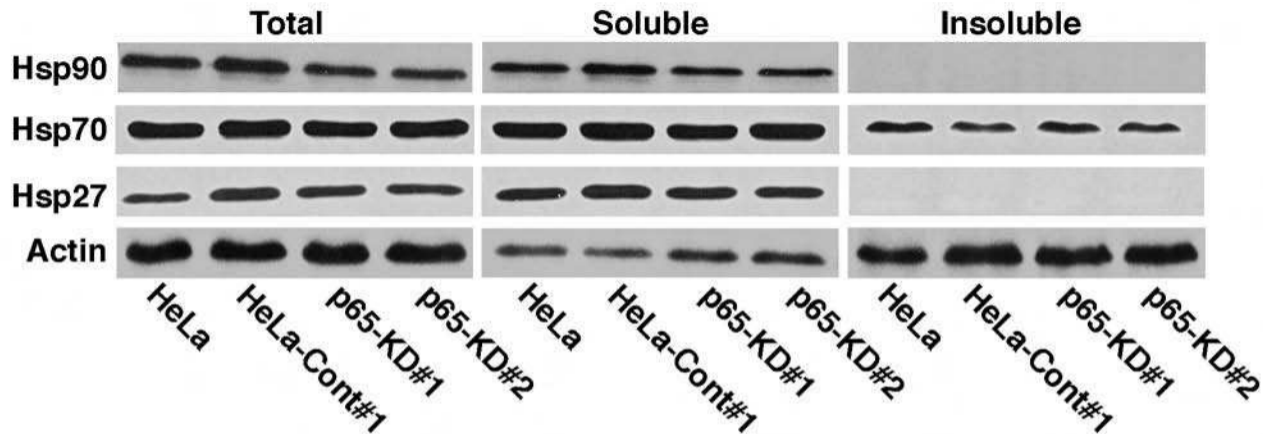


Figure S1: Levels and solubility of main Hsps are not modulated by p65 status.

Total, Triton-soluble and -insoluble protein fractions of HeLa, HeLa-Cont#1, p65-KD#1 and p65-KD#2 were separated by SDS-Page and analyzed by immunoblots probed with either Hsp90, Hsp70, Hsp27 or Actin (as a loading control) antibodies.

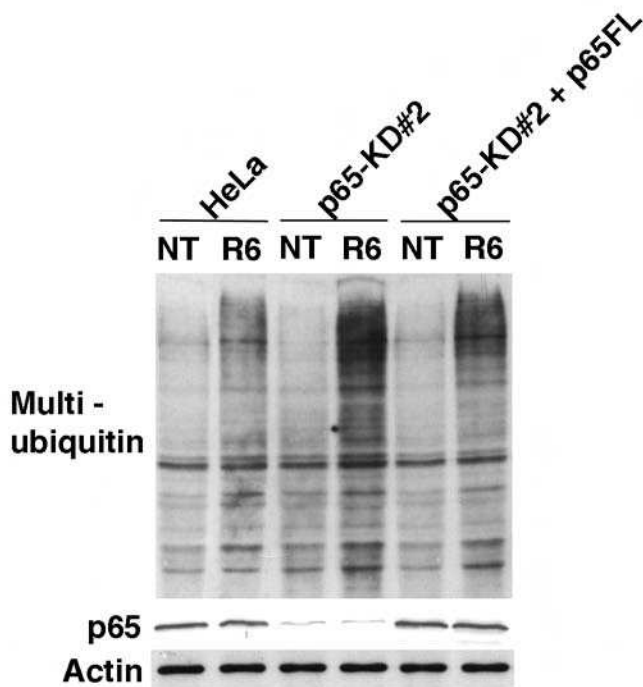


Figure S2: p65 depletion increased accumulation of protein aggregates after hyperthermia is reversed by restoring p65 level. HeLa, p65-KD#2 and p65-KD#2 transfected with p65FL expression vector (HeLa-KD#2 + p65FL) were submitted or not (NT) to a 90 min heat shock treatment at 43°C followed by a 6h recovery period at 37°C (R6). Total protein extracts were analyzed in immunoblots probed with Multiubiquitin, p65 and Actin (as a loading control) antibodies.

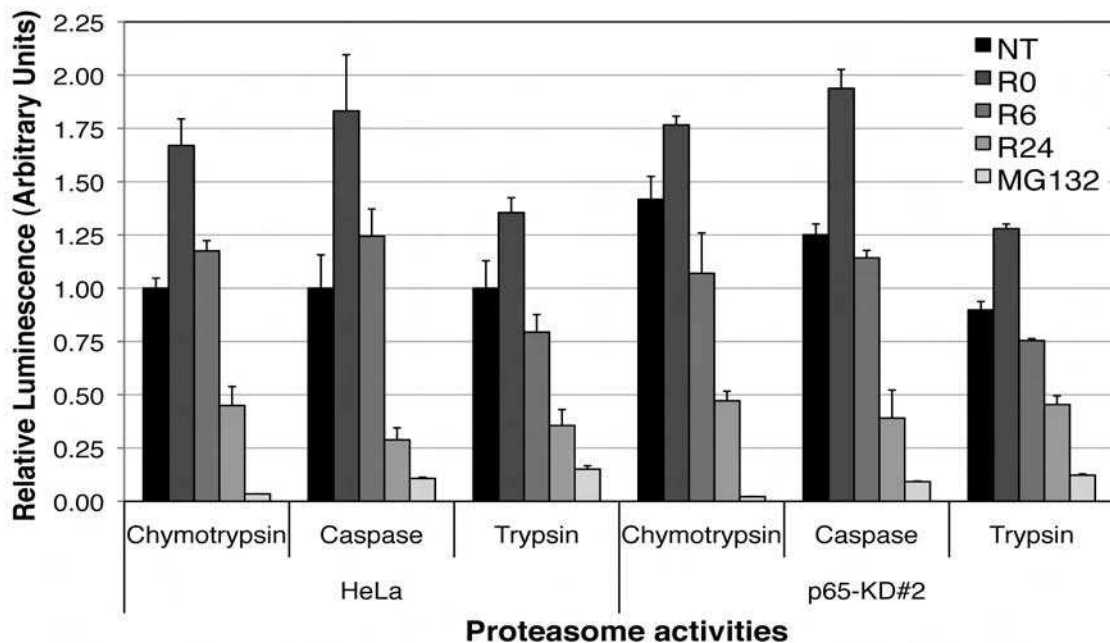


Figure S4: Proteasome activity is similarly inhibited in control and p65-deficient cells, during hyperthermia recovery.

HeLa and p65-KD#2 cell lines were submitted or not (NT) to a 90 min HS treatment at 43°C followed by 0 (R0), 6 (R6) or 24 hours (R24) of recovery at 37°C. As a negative control, proteasome inhibitor MG132 was added to the cell culture medium (10 μ M; 2h). Cells were stained with Proteasome-Glo Kit to quantify proteasome activities (see Materials and Methods). Relative luminescence is the ratio between luminescence in every conditions tested and luminescence in non-treated conditions.

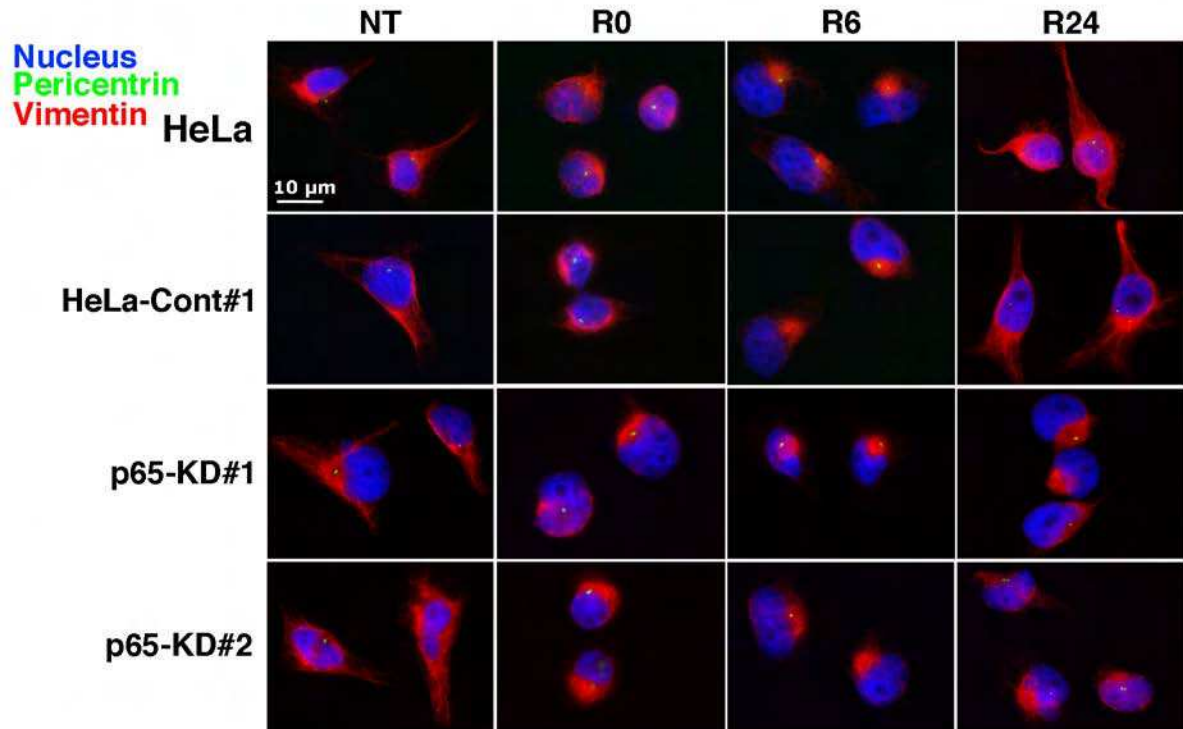


Figure S5: p65 depletion alters aggresome clearance during heat shock recovery.

HeLa, HeLa-Cont#1, p65-KD#1 and p65-KD#2 cell lines were submitted or not (NT) to a 90 min HS treatment at 43°C followed by 0 (R0), 6 (R6) or 24 hours (R24) of recovery at 37°C. Then, cells were fixed, permeabilized and stained with Pericentrin and Vimentin antibodies. Nuclei were colored by Hoechst staining. Cells were observed with a fluorescence microscope.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Le traitement hyperthermique active NFκB

Le mécanisme d'activation de NFκB par l'hyperthermie est très spécifique. En effet, ce mécanisme ne suit pas la voie classique d'activation puisqu'il est indépendant d'événements de phosphorylation ou de dégradation de la sous-unité inhibitrice IκB, son taux restant constant au cours de la phase de récupération suivant le stress thermique (Kretz-Remy et al. 2001).

A. Voies d'activation de NFκB :

Nous avons montré que l'induction de NFκB suite à une hyperthermie dépend de l'agrégation, il se pourrait donc que la dissociation du complexe NFκB-IκB soit réalisée par une protéine activée par l'agrégation. L'une de ces protéines pourrait être VCP/p97, impliquée dans la dégradation des protéines mal-conformées présentes dans la cellule et notamment au niveau du RE (Ye et al. 2005). Dans des conditions normales, VCP est retrouvé au sein d'un complexe protéique contenant HDAC6, Hsp90 et HSF1 (Boyault et al. 2007b). Dans ce complexe, HSF1 est séquestré par Hsp90, ce qui inhibe la transcription des gènes de choc thermique (Zou et al. 1998). La liaison d'HDAC6 à des protéines mal-conformées contenant une chaîne de polyubiquitines conduit à la dissociation, dépendante de VCP, de ce complexe et à l'activation de la réponse au choc thermique (Boyault et al. 2007b). Il a été montré qu'HDAC6 co-immunoprécipite avec NFκB (Zhang & Kone 2002). La reconnaissance par HDAC6 des protéines mal-conformées générées par le traitement hyperthermique pourrait alors induire la dissociation du complexe NFκB-IκB par VCP, sur le même modèle que la dissociation d'HSF1 et Hsp90.

NFκB pourrait également être activé par une autre voie de signalisation suite au stress thermique. Celle-ci serait initiée par TNFRS8 (*TNF Receptor Superfamily Member 8*), plus connu sous le nom d'antigène CD30. D'une part, l'hyperthermie induit une sur-expression de cette protéine (Yasumoto et al. 2004) et d'autre part, il a été montré qu'une telle sur-expression, dans des cellules HEK293, induit l'agrégation des protéines TRAF2 et TRAF5 impliquées dans l'activation de NFκB (Horie et al. 2002). Au niveau de ces agrégats, sont retrouvé également le complexe kinase IKK ainsi que l'inhibiteur IκB (Horie et al. 2002). Les détails de la séquestration d'IκB au sein des agrégats de protéines TRAF ne sont pas connus et les modifications post-traductionnelles d'IκB n'ont pas été étudiées mais il en résulte une

activation de NF κ B en absence de dégradation d'I κ B, comme lors d'un traitement hyperthermique.

Enfin, nous avons montré que l'activation de NF κ B suite à l'hyperthermie induit une accumulation de la protéine BAG3. Or, cette dernière est capable d'altérer la liaison entre Hsp70 et la sous-unité IKK γ , ce qui a pour conséquence l'induction de la voie classique d'activation de NF κ B (Ammirante et al. 2010). Cette boucle pourrait être activée suite au stress thermique, ce qui permettrait une amplification de la réponse apportée par NF κ B.

B. Arrêt de l'activation de NF κ B :

L'activation constitutive de NF κ B est un événement pathologique, souvent observé dans les maladies inflammatoires chroniques (Tak & Firestein 2001b) ainsi que dans les cellules cancéreuses, notamment dans les métastases (Baldwin 2001). Cette activation conduit à une forte expression de gènes cibles de NF κ B codant des protéines pro-inflammatoires, des protéines anti-apoptotiques, des métalloprotéinases ou encore des facteurs de croissance dont le VEGF (Baldwin 2001; Tak & Firestein 2001b). La reformation du complexe NF κ B-I κ B est donc de première importance pour limiter le développement de ces maladies.

Au niveau de la voie classique, l'activation de NF κ B est transitoire. En effet, I κ B est un gène cible de NF κ B ; I κ B néo-synthétisé se fixe alors sur NF κ B pour l'inhiber (Sun et al. 1993). En ce qui concerne les voies de signalisation présentées ci-dessus dans le cadre de l'hyperthermie, l'inactivation de NF κ B pourrait avoir pour origine la néo-synthèse d'I κ B et/ou la réassociation des sous-unités I κ B dissociées suite au stress thermique, puisque I κ B n'est pas dégradé. Ces dernières devront auparavant être libres. Ceci pourrait se faire suite à la reformation du complexe inhibiteur VCP-HDAC6-Hsp90-HSF1. Dans l'hypothèse faisant intervenir TNFRS8, la résolution de l'agrégation, sans doute par les Hsp, permettrait la dissociation du complexe TRAF-IKK-I κ B et ainsi la libération d'I κ B.

NF κ B étant un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'inflammation, de l'immunité ou encore de l'apoptose, nous avons cherché à déterminer quel pourrait être les conséquences de son activation au cours de la phase de récupération suivant le choc thermique. Pour cela, nous avons étudié le comportement de cellules témoins et déficientes pour NF κ B soumises à un traitement hyperthermique.

II. Le traitement hyperthermique induit la mort des cellules déficientes pour NFκB

Nous avons montré que le facteur de transcription NFκB est nécessaire à la survie et à la croissance des cellules après hyperthermie. Ce résultat, obtenu dans des cellules humaines HeLa exprimant de manière stable un shARN ciblant l'ARNm de p65, a été validé par transfection transitoire du shARN (*Small hairpin ARN*) dans deux autres modèles cellulaires : des cellules de rein embryonnaire humain HEK293 et des cellules de rein du singe vert africain COS et CV-1. Ces travaux sont concomitants avec ceux de Savion *et coll* qui ont montré une sensibilité accrue des fibroblastes embryonnaires murins au stress thermique lorsqu'ils sont dépourvus de la sous-unité p65 de NFκB (Savion et al. 2007).

La sensibilité observée est caractérisée par une augmentation du taux de mort cellulaire suite au stress. Le choc thermique, en fonction de sa sévérité, peut induire soit l'apoptose soit la nécrose (Han et al. 2008; Zhou et al. 2011). Afin de différencier ces deux types de mort, les cellules ont été marquées par l'Annexine V et l'iodure de propidium, des marqueurs spécifiques de l'apoptose et de la nécrose respectivement. L'augmentation du marquage par l'iodure de propidium couplée à l'absence de détection de l'Annexine V semble indiquer une mort nécrotique des cellules soumises au traitement thermique. Ceci est confirmé par le fait que l'activation globale des caspases, les protéines effectrices majeures de l'apoptose (Taylor et al. 2008), n'est pas modulée par NFκB et que leur inhibition par du z-vad-FMK ne modifie en rien la sensibilité accrue au stress thermique des cellules déplétées en p65. La fonction anti-apoptotique de NFκB (Dutta et al. 2006) n'est donc pas impliquée dans la survie des cellules soumises au stress thermique.

Avant de valider la mort par nécrose des cellules, nous avons analysé la troisième voie de mort possible, l'autophagie (Tsujimoto & Shimizu 2005). En effet, NFκB inhibant l'autophagie, son absence pourrait activer ce mécanisme (Djavaheri-Mergny et al. 2006b; Fabre et al. 2007). Curieusement, ce ne sont pas les cellules dépourvues de p65 qui présentent une activation de l'autophagie suite au traitement thermique mais les cellules compétentes pour NFκB. La déplétion de p65 inhibe donc l'activation de l'autophagie par le stress thermique.

L'ensemble de ces résultats indique que le traitement hyperthermique n'induit ni autophagie ni apoptose dans les cellules déplétées pour NFκB mais que leur sensibilité accrue est causée par l'induction d'une mort nécrotique. L'activation de cette voie de mort montre

que le choc thermique que nous appliquons sur les cellules est suffisamment violent pour qu'elles ne soient plus capables d'enclencher un programme apoptotique. La sensibilité accrue des cellules déficientes pour NFκB pourrait trouver son origine au niveau du blocage du processus autophagique dans ces cellules ; en effet, ce mécanisme peut également être considéré comme un processus de survie cellulaire et son inhibition pourrait sensibiliser les cellules au stress thermique.

III. L'autophagie dépendante de NFκB est impliquée dans la survie des cellules soumises à l'hyperthermie :

L'autophagie étant active dans les cellules compétentes pour NFκB, moins sensibles au stress thermique, ce mécanisme pourrait jouer un rôle de protection vis-à-vis de la mort des cellules. En effet, alors qu'une inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules au traitement thermique, nous avons montré que son activation les protège. Des résultats identiques ont été obtenus dans des cellules malignes de gliome humain, ce qui confirme le rôle protecteur de l'autophagie lors de l'hyperthermie (Komata et al. 2004). Ce mécanisme étant bloqué dans les cellules déplétées en NFκB, nous avons recherché à quel niveau NFκB est impliqué dans la régulation du processus autophagique. Dans les cellules déplétées en p65, le mécanisme autophagique est fonctionnel puisque des vésicules autophagiques sont observées suite à un traitement par la rapamycine, un activateur de l'autophagie. NFκB n'interviendrait donc pas dans le mécanisme en lui-même mais au niveau des voies de transduction du signal activant l'autophagie. Plusieurs études ont montré un rôle d'inhibiteur de l'autophagie pour NFκB. En cas de carence nutritive, de traitement par le TNFα ou encore dans des macrophages en présence de la bactérie *Escherichia coli*, l'inhibition de NFκB induit l'activation d'un mécanisme autophagique de survie (Djavaheri-Mergny et al. 2006a; Fabre et al. 2007; Schlottmann et al. 2008). Nous avons confirmé l'activation de l'autophagie par le TNFα dans les cellules déficientes pour NFκB, alors que dans les cellules témoins, l'autophagie est bloquée. Ces résultats indiquent qu'en fonction du stimulus, NFκB est capable d'activer ou d'inhiber l'autophagie et que ces modulations passent par des voies de signalisation différentes.

L'autophagie étant impliquée dans la dégradation des protéines agrégées (Ravikumar et al. 2004) et le choc thermique induisant une dénaturation des protéines cellulaires (Pinto et al. 1991), nous avons émis l'hypothèse que l'autophagie dépendante de NFκB pourrait être

induite en réponse à l'agrégation protéique provoquée par le choc thermique. L'utilisation du glycérol, un composé qui stabilise la conformation des protéines (Edington et al. 1989), nous a permis de confirmer notre hypothèse. En effet, utilisé en pré-traitement à l'hyperthermie, il induit une réduction de l'activation de NFκB et de l'autophagie. De plus, cette réduction est spécifique aux stress d'agrégation. Ainsi, sur trois traitements activant NFκB (hyperthermie, cadmium et TNFα), le traitement par le glycérol ne limite l'activation de NFκB que pour les deux traitements engendrant des agrégats protéiques (hyperthermie et cadmium), l'activation par le TNFα n'étant pas modifiée. Ces résultats confirment donc que c'est bien l'agrégation protéique générée par l'hyperthermie qui est responsable de l'activation de l'autophagie médiée par NFκB.

Nous avons de plus montré que le glycérol diminue la mort des cellules soumises à l'hyperthermie et, utilisé en combinaison avec la Rapamycine, qu'il restaure un phénotype sauvage pour les cellules déficientes en NFκB. Ceci semble indiquer que NFκB peut activer l'autophagie d'une façon différente de la Rapamycine et que cela pourrait donc avoir un effet synergique dans les cellules soumises à une hyperthermie pour l'élimination des protéines dénaturées/agrégées.

IV. NFκB intervient dans le contrôle qualité des protéines :

L'altération du contrôle qualité des protéines (ou PQC pour *Protein Quality Control*) conduit à l'accumulation de protéines mal-conformées voire agrégées (Hamano et al. 2008; Korolchuk et al. 2009; Latonen et al. 2011; Welch 2004; Wilde et al. 2011). Nous avons observé que l'absence de p65 conduit à une légère augmentation du taux de ces protéines altérées. Ceci indique que le PQC ne semble pas complètement fonctionnel.

Nous nous sommes intéressé aux composantes majeures de ce contrôle qualité dans les cellules cultivées en conditions normales, à savoir le système de renaturation constitué majoritairement par les Hsp et les systèmes de dégradation (ubiquitine-protéasome et autophagie).

A. NFκB intervient-il dans le système de repliement des protéines ?

Nous avons démontré que le taux des protéines Hsp majeures n'est pas modulé par NFκB en réponse au choc thermique et que la capacité de reconformation des Hsp reste intacte. Ainsi, le système de renaturation constitué par les protéines Hsp semble fonctionnel et indépendant de NFκB.

Cependant des études menées sur cellules cardiaques semblent révéler une implication de NFκB dans ce système de renaturation et plus particulièrement au niveau des protéines de choc thermique Hsp60 et Hsp72. En effet, lors d'un traitement de cellules musculaires cardiaques par des œstrogènes, l'expression d'Hsp72, induite par HSF1, est bloquée par l'inhibition de NFκB (Hamilton et al. 2004). Le promoteur d'Hsp72 ne possédant pas de site de fixation pour NFκB, ce dernier pourrait donc directement moduler HSF1 en réponse aux œstrogènes. En ce qui concerne Hsp60, NFκB se fixe sur des séquences κB dans le promoteur d'*hsp60* et induit fortement son expression suite à une insuffisance cardiaque (Wang et al. 2010).

Nous n'avons pas retrouvé ces régulateurs dans les cellules étudiées au cours de nos travaux. Il serait cependant intéressant de tester le mécanisme d'autophagie dépendante de NFκB dans le modèle de cellules musculaires cardiaques. En effet, ces cellules sont soumises à de fortes contraintes thermiques, notamment au cours d'efforts physiques, et sont décrites comme hypersensibles à une inhibition de l'autophagie. De plus, la protéine HspB5 est exprimée dans les cardiomyocytes et sa forme mutée, HspB5-R120G, s'agrège dans ce type cellulaire et provoque des cardiomyopathies (Vicart et al. 1998). De plus, il a été montré très récemment que la protéine BAG3 peut se lier directement à HspB5-R120G, ce qui solubilise la protéine mutante et inhibe donc son agrégation (Hishiya et al. 2011). Par ailleurs, l'expression du gène *bag3* suite à une agrégation protéique induite par hyperthermie est activée en présence de NFκB, ce qui induit l'autophagie. Il serait donc intéressant de déterminer si dans des cellules cardiaques, l'élimination du mutant R120G nécessite aussi l'induction d'une autophagie régulée par l'activation du gène *bag3* par le facteur de transcription NFκB.

Le système de renaturation des protéines étant fonctionnel dans notre modèle cellulaire, nous nous sommes tournés vers les systèmes de dégradation protéique. Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur le système ubiquitine-protéasome.

B. NFκB module-t-il les activités du protéasome ?

Le protéasome présente trois activités catalytiques principales : activités de type Caspase, Chymotrypsine et Trypsine (Gallastegui & Groll 2010). L'inhibition de ce mécanisme protéolytique, soit par défaut d'un des composants (Joshi et al. 2011; Liu et al. 2005a) soit par utilisation de drogues (Latonen et al. 2011), conduit à l'accumulation de protéines polyubiquitinées voire à leur agrégation. Dans un premier temps, nous avons vérifié que le protéasome est fonctionnel dans les cellules témoins et déplétées en p65. Pour cela, nous avons traité les cellules avec du MG132, un inhibiteur des trois activités catalytiques du protéasome, et de la Lactacystine qui inhibe spécifiquement l'activité catalytique de type Chymotrypsine. La forte réduction des activités catalytiques, observée suite à ces deux traitements, montre que le protéasome est fonctionnel en présence ou absence de NFκB.

En conditions non traitées, dans les cellules déplétées en p65, nous observons une légère augmentation de l'activité de type Caspase du protéasome. Malgré cette sur-activité, une légère accumulation de protéines polyubiquitinées est observée dans les cellules déficientes pour NFκB. Ces protéines pourraient soit être trop nombreuses et ainsi dépasser les capacités de dégradation du protéasome, soit tout simplement ne pas être des cibles du protéasome. En ce qui concerne la première hypothèse, il semble important de savoir si la sur-activation d'une seule activité du protéasome est suffisante pour augmenter la capacité globale de dégradation du protéasome. Il a été montré, dans des fibroblastes humains, que l'augmentation de l'expression de la sous-unité β1, qui porte l'activité de type Caspase, induit une sur-activation des capacités de dégradation du protéasome, ce qui protège les cellules d'un stress oxydant (Chondrogianni et al. 2003), stress connu pour générer des protéines ubiquitinées (Shang & Taylor 2011). Des résultats identiques ont été observés suite à la sur-expression de la sous-unité β5 (activité de type Chymotrypsine) (Liu et al. 2007). Ces résultats semblent donc indiquer que la sur-activation d'une seule activité du protéasome peut être suffisante pour augmenter la capacité de dégradation globale du protéasome. Il serait alors intéressant d'analyser le taux des sous-unités catalytiques du protéasome et surtout β1

pour voir si en absence de p65 il est plus élevé. NFκB pourrait alors être un inhibiteur de cette sous-unité, ce qui pourrait expliquer l'augmentation spécifique de cette activité de type Caspase dans les cellules déficientes pour NFκB.

Malgré la sur-activation de l'activité de type Caspase, nous observons une légère accumulation de protéines polyubiquitinées dans les cellules déplétées en p65, ce qui indique soit que la quantité de protéines à dégrader est supérieure à la capacité du protéasome, même sur-activé, soit que ces protéines pourraient simplement ne pas être des cibles du protéasome. Ainsi, il a été montré que les agrégats protéiques ainsi que certaines protéines, comme SQSTM1, ne sont pas dégradés par le protéasome mais exclusivement par autophagie (Myeku & Figueiredo-Pereira 2011). Ces protéines pourraient être celles accumulées dans les cellules déplétées en p65.

Concernant le traitement hyperthermique, il a été montré que l'accumulation très importante de protéines dénaturées voire agrégées induite par l'hyperthermie bloque le protéasome, notamment de part sa séquestration au sein des agrégats mais aussi parce que les agrégats saturent le protéasome (Pajonk et al. 2005). Nous avons montré que ce blocage est similaire en présence ou absence de NFκB, ce qui indique une absence de régulation par NFκB de l'activité du protéasome en réponse à l'hyperthermie.

Le protéasome n'étant plus fonctionnel lors de la récupération suivant le choc thermique, nous nous sommes alors tournés vers l'analyse de l'autophagie, deuxième voie protéolytique cellulaire.

C. A quel(s) niveau(x) NFκB régule-t-il l'autophagie ?

L'autophagie est un mécanisme conduisant à la dégradation, par le système lysosomal, d'une fraction du cytoplasme, séquestrée au sein d'une vésicule à double membrane nommée autophagosome. L'inhibition de l'autophagie conduit à l'accumulation de protéines polyubiquitinées et au développement de diverses pathologies telles que des myopathies ou des maladies neurodégénératives (Mehrpour et al. 2010).

1) *Quelle est l'implication de NFκB dans le contrôle de l'autophagie basale ?*

L'autophagie est basalement active dans les cellules ; elle permet la dégradation des protéines à longue demi-vie et des organelles cellulaires altérés. Des souris présentant un défaut de ce mécanisme montrent une accumulation de protéines polyubiquitinées ainsi que le développement de diverses pathologies dont des neurodégénéscences (Komatsu et al. 2006; Kuma et al. 2004). Nous avons observé une accumulation de protéines polyubiquitinées en absence de stress dans les cellules déficientes en p65, ce qui indique que NFκB pourrait être impliqué dans le contrôle qualité basal des protéines. La déficience ne provenant ni des Hsps ni du protéasome, nous avons émis l'hypothèse que le processus contrôlé par NFκB impliqué pourrait être l'autophagie basale.

Nous avons observé que les cellules déficientes pour NFκB présentent un taux légèrement plus élevé de la forme II de LC3 que les cellules témoins. Cette augmentation est proportionnelle au taux de p65 dans les cellules ; en effet, une déplétion encore plus importante du taux de p65 induit une augmentation plus forte de LC3-II alors qu'un retour au taux basal de p65 restaure un taux basal de LC3-II. Copetti *et coll.* ont mis en évidence un rôle de NFκB dans la régulation de l'autophagie basale dans des cellules HEK et Jurkat. Ainsi, dans ces cellules, NFκB induit l'expression basale du gène *bec1*, codant la Becline-1, ce qui a pour conséquence l'induction d'un processus autophagique basal (Copetti et al. 2009). Nous avons montré, par RT-PCR (Reverse *Transcriptase-PCR*) quantitative et western blot (données non montrées), que dans notre modèle, l'implication de NFκB dans la régulation de l'autophagie basale est indépendante de la modulation d'expression de *bec1*.

En revanche, le taux plus important de LC3-II dans les cellules déplétées en p65 ne semble pas provenir d'une sur-activation de l'autophagie (taux d'activation similaire entre les lignées cellulaires traitées par de la Rapamycine) mais plutôt d'un léger défaut de maturation des autophagosomes. En effet, l'accumulation de LC3-II engendrée par un traitement par la Bafilomycine A1 est plus faible dans les cellules déplétées en p65. Un tel défaut est décrit comme aboutissant à une accumulation de vésicules autophagiques immatures et à l'absence de dégradation du matériel encapsulé, qui est le plus souvent marquée par une augmentation du taux de protéines polyubiquitinées (Chévrier et al. 2010; Tresse et al. 2010).

Un défaut de maturation des autophagosomes peut trouver son origine au niveau de l'acidification des lysosomes, préalable à la fusion autophagosome-lysosome, ou au niveau

des mécanismes de fusion. L'acidification est réalisée par des pompes à protons membranaires. Leur inhibition, par un traitement à la Bafilomycine A1 par exemple (Klionsky et al. 2008b) ou par la mutation d'une des sous-unités de ce complexe (Ramachandran et al. 2009) aboutit à une acidification incomplète voire inexistante des lysosomes, ce qui bloque la fusion autophagosome-lysosome et donc inhibe la maturation des autophagosomes. La Bafilomycine A1 cible plus particulièrement la sous-unité ATP6V0D2 de la pompe à protons vacuolaire H⁺ V-ATPase. Au niveau protéique, les cellules déplétées en p65 présentent un taux légèrement plus faible de cette sous-unité, en conditions basales (travail préliminaire mené par Michel Abou-Samra dans l'équipe). Il serait dès lors possible que l'accumulation de protéines polyubiquitinées, observée dans ces cellules cultivées en conditions normales, soit le résultat d'un défaut d'acidification des lysosomes. Ainsi, le rôle de NFκB dans le contrôle qualité des protéines en condition basale pourrait passer par la régulation de l'expression de la sous-unité ATP6V0D2, nécessaire pour la maturation des autophagosomes. La déplétion en NFκB induirait alors une légère accumulation de protéines polyubiquitinées, ce qui pourrait expliquer la faible augmentation de l'activité de type Caspase du protéasome.

NFκB serait donc également impliqué dans le contrôle qualité des protéines en conditions basales. Cependant, les observations menées dans les cellules soumises à un traitement par hyperthermie montrent une absence quasi-totale de vésicules autophagiques dans les cellules déplétées pour p65, ce qui indique que NFκB jouerait également un rôle précoce dans l'induction du processus autophagique en réponse au stress thermique.

2) *Quel est le ou les rôle(s) de NFκB dans l'induction de l'autophagie par le stress thermique ?*

Les cellules déficientes en p65 sont hypersensibles à l'agrégation, les protéines agrégées n'y étant pas ou mal éliminées. Dans les cellules, les protéines agrégées suite au stress thermique sont rassemblées au niveau du centre organisateur des microtubules où elles forment un unique agrégat, l'agrésome. Cette structure isole les protéines dénaturées du reste de la cellule par la formation d'un manteau de vimentine (Garcia-Mata et al. 2002). Nous avons observé que dans les cellules témoins, 24 heures après l'arrêt du stress thermique, l'agrésome n'est plus visible, les cellules ayant réussi à l'éliminer par autophagie. En revanche, dans les cellules déficientes pour NFκB, la formation d'agrésome est également observée mais il n'est pas éliminé, même 48h ou 72h après choc thermique. De plus, bien que

l'agrésome soit détecté, il ne semble pas toujours localisé correctement. En effet, alors que dans les cellules témoins l'agrésome se trouve au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC), il est quelque fois décentré dans les cellules déplétées en p65.

- a) Quelle est l'influence de NF κ B sur le réseau de microtubules et sur leur centre organisateur ?

Un des éléments régulés par NF κ B après hyperthermie et pouvant réguler l'autophagie pourrait être le réseau de microtubules et son centre organisateur, le MTOC. Ces deux structures sont de première importance pour l'autophagie puisque les vésicules autophagiques se déplacent le long des microtubules, de façon bidirectionnelle, et tendent à se diriger et à s'accumuler au niveau du MTOC où se trouvent les lysosomes (Jahreiss et al. 2008).

L'influence de NF κ B sur la restauration du réseau de microtubules, collapsé par le choc thermique, pourrait s'exercer à trois niveaux : sur les microtubules labiles, sur les modifications post-traductionnelles des tubulines et/ou sur le MTOC.

- (i) *Quelle est l'influence de NF κ B sur les microtubules labiles ?*

Le réseau de microtubules est constitué de deux groupes distincts : un groupe labile, très dynamique, et un groupe stable. Ces deux groupes sont caractérisés par leur sensibilité différentielle à un traitement par des concentrations différentes de Taxol (Webster et al. 1987).

Il a été montré récemment que ces deux groupes de microtubules jouent un rôle différent dans la régulation de l'autophagie : la partie labile permet le recrutement de la machinerie autophagique (Atg5, Atg12, LC3-I, WIPI-I) alors que la partie stable intervient dans le transport des autophagosomes (par l'intermédiaire de LC3-II, enchâssé dans la membrane des autophagosomes) (Geeraert et al. 2010). En cas de carence nutritive, il a été décrit que l'inhibition de la partie labile est suffisante pour bloquer l'induction de l'autophagie (Geeraert et al. 2010). Une hypothèse pour expliquer l'inhibition de l'autophagie dans les cellules déplétées en NF κ B soumises à une hyperthermie pourrait donc être que la fraction labile ne soit pas restaurée ou soit éliminée suite au choc thermique. Ce défaut pourrait à la fois expliquer l'inhibition de l'autophagie et l'absence d'élimination de

l'agrésome dans les cellules déplétées en NFκB soumises à un stress thermique. En revanche, la fraction stable serait restaurée, ce qui est conforté par la formation correcte de l'agrésome dans les cellules déficientes en NFκB, traitées par hyperthermie. Il serait dès lors intéressant de suivre l'évolution de ces deux fractions de microtubules, au cours de la phase de récupération suivant le stress thermique, afin de déterminer si elles sont toutes les deux correctement remises en place. Un défaut dans la restauration de l'une des deux fractions impliquerait NFκB dans la remise en place du cytosquelette de tubuline, ce qui serait une nouvelle fonction pour ce facteur de transcription.

(ii) Quelle est l'influence de NFκB sur les modifications post-traductionnelles des tubulines ?

La plus importante des modifications post-traductionnelle des tubulines est l'acétylation des microtubules, qui intervient dans le dynamisme du réseau et le recrutement des protéines associées aux microtubules (Hammond et al. 2008). Ainsi, il a été montré récemment qu'une hyperacétylation des microtubules est essentielle au déroulement du processus autophagique (Geeraert et al. 2010). Elle intervient notamment dans le recrutement d'un complexe, contenant la Kinésine-1, responsable de l'activation de l'autophagie via la voie JNK1. De plus, elle joue également un rôle primordial au niveau du déplacement des autophagosomes, via le recrutement des complexes moteurs Dynéine et Kinésine (Geeraert et al. 2010). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent une augmentation du taux d'acétyl-tubulines pendant la phase de récupération après stress thermique, dans les cellules témoins, ce taux étant modulé par NFκB. Le choc thermique induirait donc une acétylation des tubulines dépendante de NFκB.

Le taux d'acétylation des tubulines résulte d'une balance entre l'acétylation par des acétyl-transférases, comme ELP3, et la déacétylation effectuée par des déacétylases (principalement HDAC6 et SIRT2) (Hammond et al. 2008). L'hyperacétylation peut aussi bien venir d'une sur-expression ou sur-activation d'acétyl-transférases que de la sous-expression ou inhibition des déacétylases. Le taux et l'activité de ces protéines modifiant le niveau d'acétylation des tubulines pourraient donc être régulés par NFκB en réponse à l'hyperthermie.

Une attention particulière devrait être portée à HDAC6. En effet, outre sa fonction de déacétylase, HDAC6 est aussi impliquée dans la formation des agrésomes (Rodriguez-Gonzalez et al. 2008). HDAC6 comporte un domaine de liaison à l'ubiquitine (permettant la reconnaissance des agrégats protéiques) et un domaine de fixation aux complexes moteurs Dynéine/Dynactine. Elle fixe les agrégats dans la cellule et les transporte le long des microtubules pour former l'agrésome au niveau du MTOC (Rodriguez-Gonzalez et al. 2008).

(iii) Quelle est l'influence de NFκB sur le centre organisateur des microtubules ?

Il a été montré que l'hyperthermie induit une désorganisation du MTOC (Nakahata et al. 2002). Une restauration anormale du MTOC peut engendrer plusieurs types de phénotypes altérés : (i) absence de MTOC, (ii) plusieurs MTOC ou encore (iii) un MTOC de taille anormalement petite (Nakahata et al. 2002). Ces défauts ont de graves conséquences sur la multiplication cellulaire, provoquant des catastrophes mitotiques fatales pour les cellules. Par exemple, la présence de plusieurs MTOC engendre la formation de plusieurs plans de division ; il en résulte la formation de cellules géantes présentant plusieurs micronoyaux, incapables de se diviser. Or, des observations préliminaires semblent montrer que lors de la récupération après hyperthermie, les cellules déplétées en NFκB présentent plus souvent ce phénotype de micronoyaux que les cellules témoins. NFκB pourrait donc jouer un rôle important dans la restauration du MTOC après un choc thermique. Cette structure étant primordiale pour le ciblage des agrésomes par les autophagosomes, l'altération de sa restauration suite au stress thermique, pourrait être à l'origine du défaut d'élimination de l'agrésome par l'autophagie dépendante de NFκB dans les cellules dépourvues de NFκB.

Une des protéines essentielles à la formation du MTOC est la Centrine. Cette protéine centrosomique est impliquée dans la duplication du centriole et est nécessaire au maintien de leur intégrité (Salisbury 2007). Il a été montré que l'inhibition de l'expression de la Centrine dans des cellules HeLa a pour conséquences le blocage de la duplication du centriole, la désorganisation du centrosome et une baisse de la viabilité cellulaire (Salisbury et al. 2002). Or, nous avons observé que le gène codant cette protéine est exprimé différemment entre les cellules témoins et dépourvues de NFκB traitées par hyperthermie (résultats obtenus suite à l'analyse de microarrays). D'autres gènes codant des protéines impliquées dans la restauration du MTOC ont également été retrouvés comme différemment exprimés dans

les analyses des microarrays. Parmi ces gènes, ceux codant la Tetkine, une protéine stabilisant les centrioles (Amos 2008), et la Protéine Phosphatase-1, impliquée dans l'assemblage et la stabilité des centrosomes (Meraldi & Nigg 2001), semblent également intéressants. NFκB pourrait donc induire l'expression de gènes cibles codant des protéines impliquées dans la restauration et l'intégrité du MTOC, élément essentiel à l'élimination de l'agrésome par le mécanisme d'autophagie dépendante de NFκB. Des expériences pourraient être menées afin de déterminer si l'expression de ces gènes ainsi que le taux des protéines qu'ils codent, pourraient être modulés par le choc thermique selon un mécanisme dépendant du facteur de transcription NFκB.

L'analyse de ces éléments permettra de mieux appréhender le rôle de NFκB dans la restauration du cytosquelette de tubuline, nécessaire à l'induction du processus autophagique de survie activé en réponse à l'hyperthermie.

- b) Quelle est l'influence de NFκB sur les voies de signalisation activant le mécanisme autophagique ?

L'induction de l'autophagie par un traitement thermique est bloquée par un traitement à l'Actinomycine D, un inhibiteur de la transcription. Cette observation semble indiquer que la fonction de facteur de transcription de NFκB est impliquée dans l'induction de l'autophagie, après un stress thermique.

Nous avons alors recherché quels pouvaient être les gènes dont l'expression serait induite, de façon dépendante de NFκB, lors de la période de récupération suivant le stress thermique. Un de ces gènes pourrait être le gène *bec1*. En effet, le promoteur *bec1* présente des sites de fixation pour NFκB et il a été montré que NFκB est impliqué dans la régulation de l'expression de ce gène en conditions basales (Copetti et al. 2009). Nous avons analysé le taux de la protéine Becline-1, codée par le gène *bec1*, au cours de la période de récupération suivant le stress thermique. Nous observons un pic d'accumulation de Becline-1 après 6h de récupération dans les cellules témoins alors que ce pic est absent dans les cellules déplétées en NFκB. Néanmoins, la quantité du complexe activateur Becline 1-PI3K de classe III reste identique dans les cellules témoins et déplétées en p65 au cours de la récupération. La différence d'induction d'autophagie après un traitement hyperthermique en absence ou

présence de NFκB n'est donc pas une conséquence de l'action de NFκB sur la transcription du gène *bec1*.

Nous nous sommes ensuite intéressé au deuxième régulateur de l'autophagie, la kinase mTOR. Cette kinase, active lorsqu'elle est phosphorylée, inhibe l'autophagie en hyperphosphorylant le complexe d'initiation (Pattingre et al. 2008). Nous avons observé que l'hyperthermie induit une déphosphorylation transitoire de mTOR au cours de la phase de récupération suivant le stress, levant ainsi l'inhibition de l'autophagie. Cette modification est observée dans les cellules témoins et déplétées en p65, où l'autophagie n'est pas induite. La voie de signalisation dans laquelle est impliqué NFκB serait donc soit située en aval de mTOR soit ne passerait pas par mTOR.

Dans un troisième temps, nous nous sommes focalisés sur la voie de transduction du signal située en aval de mTOR, la cascade de protéines Atg. Nous avons montré que les taux des principales protéines Atg ne sont pas modulés par NFκB en réponse au choc thermique.

Cette première approche ayant été peu concluante, nous avons décidé d'utiliser une méthode plus globale, l'hybridation de microarrays, pour déterminer les gènes cibles de NFκB dont l'expression est induite suite au traitement hyperthermique. Une hybridation différentielle de microarrays (Agilent) à partir d'ADNc de cellules HeLa témoins ou déficientes en NFκB, cultivées à 37°C ou soumises à une hyperthermie, a été réalisée et quantifiée (Miltenyi Biotec). Parmi l'ensemble des résultats, nous avons recherché les gènes exprimés suite au choc thermique dans les cellules contrôles et peu exprimés en absence de p65. Parmi ceux-ci, le gène codant la protéine BAG3, un co-chaperon d'Hsp70, a particulièrement attiré notre attention. Le gène *bag3* possède dans son promoteur un domaine de liaison pour le facteur HSF1, qui induit l'expression du gène au cours du choc thermique (Franceschelli et al. 2008). De plus, il a été décrit que la protéine BAG3 forme un complexe avec le chaperon HspB8 (Carra et al. 2008b), qui se lie sélectivement aux protéines agrégées. Ce complexe est impliqué dans l'élimination des agrégats protéiques, HspB8 reconnaissant les protéines dénaturées et BAG3 activant l'autophagie via eIF2α (Carra et al. 2009a). Le complexe BAG3/HspB8 a été décrit comme capable d'empêcher l'agrégation du mutant de l'Huntingtine Htt-43Q ; de plus, l'inhibition de ce complexe induit une baisse de l'autophagie, associée à une accumulation de protéines dénaturées voire agrégées (Carra et al. 2008b) ; ces analyses sont identiques à ce que nous observons dans les cellules déficientes pour NFκB en cas de choc thermique. Nous avons pu montrer que l'induction par hyperthermie de l'expression des gènes *bag3* et *hspB8* est diminuée en absence de la sous-unité p65 de NFκB.

Ceci indique donc que NFκB régule l'expression de ces gènes. Des expériences réalisées en présence de Cycloheximide nous laissent penser que cette régulation est directe mais nous n'avons pas pu mettre en évidence de sites de fixation de NFκB sur leurs promoteurs. Cette baisse d'expression des gènes *bag3* et *hspB8* se traduit par une réduction de l'accumulation, pendant la phase de récupération suivant le choc thermique, de ces deux protéines ainsi que du complexe BAG3/HspB8.

NFκB régule donc l'expression et la formation du complexe activateur de l'autophagie BAG3/HspB8 après un stress thermique. Ceci aboutirait à l'élimination des agrégats induits par le stress thermique et à la survie des cellules. Cette conclusion est renforcée par des expériences préliminaires réalisées au laboratoire. Ces études montrent que les cellules déplétées en p65 présentent une hypersensibilité à l'agrégation des mutants de l'Huntingtine. Contrairement aux cellules contrôles, des agrégats d'Htt-43Q sont visibles dans les cellules déficientes pour NFκB, comme observé dans les cellules déplétées pour BAG3 dans l'étude de Séréna Carra *et coll* (Carra et al. 2008b).

Au cours de notre étude, nous nous sommes focalisés sur ce qu'il se passait au niveau des protéines cytoplasmiques, les agrégats observés étant localisés au niveau du cytosol. Néanmoins, 30% des protéines cellulaires sont membranaires ou secrétées et sont susceptibles d'être mal conformées ou dénaturées après choc thermique. Ces protéines transitent par le réticulum endoplasmique (RE).

V. Que se passe-t-il pour les protéines membranaires ou secrétées qui transitent au niveau du réticulum endoplasmique ? NFκB est-il impliqué dans ce mécanisme ?

Les protéines membranaires ou secrétées acquièrent leur conformation définitive au sein du réticulum endoplasmique grâce à l'action de protéines chaperons spécialisées (Ellgaard & Helenius 2003). Il existe un équilibre entre la quantité de protéines entrantes et la capacité de repliement du RE. Un déséquilibre active une voie de signalisation appelée voie de l'UPR (*Unfolded Protein Response*) permettant de rétablir la balance (Rutkowski & Hegde 2010).

Chez les vertébrés, trois voies de signalisation différentes entrent en jeu pour activer l'UPR. Chaque voie est initiée par une protéine différente (IRE1-α, ATF6 et PERK) et aboutit

à l'activation d'un facteur de transcription différent : XBP1, ATF6f et ATF4 respectivement (Haze et al. 1999; Harding et al. 2003; Yoshida et al. 2006). Ces derniers se fixe sur le promoteur de gènes cibles impliqués dans la réponse au stress du RE.

Lorsque les polypeptides présents dans le RE ne peuvent pas être repliés correctement ou lorsqu'ils sont altérés, ils sont adressés soit au protéasome (voie appelée ERAD pour *ER-Associated Degradation*) (Lilley & Ploegh 2005) soit à l'autophagie (voie appelée ERAA pour *ER-Associated Autophagy*) (Yorimitsu et al. 2006). Lorsque les protéines sont sévèrement mal-conformées voire agrégées, elles sont éliminées par un processus autophagique spécifique appelée RE-phagie (Yorimitsu et al. 2006). Il a été montré que des drogues induisant spécifiquement un stress du RE, comme la Thapsigargine ou la Tunicamycine, activent l'autophagie. De plus, l'autophagie peut être activée directement par des membres des voies de l'UPR. Chez les mammifères, outre l'activation de XBP1, IRE1- α peut s'associer avec TRAF2 et ainsi activer la kinase JNK, responsable de l'induction de l'autophagie par la dissociation du complexe inhibiteur Becline-1/Bcl2 (Nishitoh et al. 2002; Urano et al. 2000). La protéine eIF2 α est aussi impliquée dans l'induction de l'autophagie puisque sa phosphorylation, induite par IRE1- α (Hiderou Yoshida et al. 2006), est nécessaire à l'expression d'*atg12* et donc à la lipidation de LC3 (Kouroku et al. 2007).

Toutes ces voies d'activation de l'autophagie ont également pour cible NF κ B. D'une part, le complexe IRE1- α /TRAF2, formé suite à un traitement par la Thapsigargine, conduit à l'activation de NF κ B (Hu et al. 2006) et de l'autophagie (Ding et al. 2007). D'autre part, la phosphorylation d'eIF2 α par IRE1 α inhibe la traduction de l'ARNm codant la sous-unité inhibitrice I κ B α , ce qui active NF κ B (Deng et al. 2004). Il serait donc intéressant de vérifier si l'activation de l'ER-phagie suite à un traitement hyperthermique est altérée par une déficience en NF κ B.

CONCLUSION GENERALE

Tout au long de leur vie, les organismes doivent s'adapter à divers changements environnementaux. Un des facteurs clés de cette adaptation est le facteur de transcription NFκB. Il intervient dans de très nombreux processus biologiques tels que l'immunité, l'inflammation ou l'apoptose. Différents activateurs de ce facteur de transcription laissent aussi à penser qu'il pourrait être impliqué dans la réponse au stress. Il a été montré au laboratoire que le stress thermique active NFκB. Les modalités de cette activation se sont avérées très particulières puisqu'indépendante du complexe kinase IKK et de la dégradation de la protéine inhibitrice IκB. L'hyperthermie pouvant être létale, nous avons recherché la signification de l'activation du facteur de transcription NFκB dans les cellules. Cette recherche a été le fil conducteur de mon travail de thèse.

Nous avons montré que NFκB est nécessaire à la survie des cellules soumises à un choc thermique. Cette nouvelle fonction du facteur de transcription est assurée par l'activation d'un processus autophagique de survie. Ce mécanisme, induit par NFκB en réponse à l'hyperthermie, est impliqué dans l'élimination des protéines dénaturées voire agrégées générées par ce stress. L'activation de l'autophagie par NFκB est dépendante de sa fonction de facteur de transcription. En effet, suite à un traitement hyperthermique, les gènes *bag3* et *hsb8* sont sur-exprimés d'une manière dépendante de NFκB. La formation du complexe BAG3-HspB8 qui en résulte active l'autophagie, ce qui induit la survie des cellules. L'inhibition de ce mécanisme d'autophagie dépendante de NFκB, par la déplétion de la sous-unité p65 de NFκB, conduit à la sensibilisation des cellules. Cette sensibilité accrue est observée suite à une agrégation protéique généralisée telle que le choc thermique mais également suite à une agrégation d'un seul type de protéine comme le mutant R120G d'HspB5 par exemple.

Ces résultats, obtenus au cours de ma thèse, révèlent l'existence d'un mécanisme, contrôlé par le facteur de transcription NFκB et impliqué dans la détoxification des cellules suite à un stress d'agrégation. Bien que des études complémentaires soient nécessaires à la compréhension globale de ce mécanisme de survie, sa découverte pourrait apporter de nouvelles pistes pour le traitement de certaines maladies, telles que certains cancers ou certaines protéinopathies. En effet, un traitement combinant hyperthermie et inhibition de l'autophagie dépendante de NFκB pourrait permettre de passer outre la thermotolérance de certaines cellules cancéreuses. A l'inverse, son activation spécifique pourrait permettre d'accroître la survie de cellules soumises à des stress d'agrégation, comme les neurones ou les cellules musculaires et ainsi de lutter contre certaines neuropathies ou myopathies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abedin, M.J. et al., 2007. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death and Differentiation*, 14(3), p.500-510.
- Agarraberes, F.A. & Dice, J.F., 2001. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 13), p.2491-2499.
- Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R. & Dice, J.F., 1997. An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *The Journal of Cell Biology*, 137(4), p.825-834.
- Ahn, S.G. & Thiele, D.J., 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev*, 17(4), p.516-28.
- Alcamo, E. et al., 2001. Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NFkappa B in leukocyte recruitment. *J Immunol*, 167(3), p.1592-600.
- Ammirante, M. et al., 2010. IKK γ protein is a target of BAG3 regulatory activity in human tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), p.7497-7502.
- Amos, L.A., 2008. The tektin family of microtubule-stabilizing proteins. *Genome Biology*, 9(7), p.229.
- Anest, V. et al., 2003. A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NFkappaB-dependent gene expression. *Nature*, 423(6940), p.659-63.
- Anfinsen, C.B., 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science (New York, N.Y.)*, 181(96), p.223-230.
- Arenzana-Seisdedos, F. et al., 1995. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NFkappa B. *Mol Cell Biol*, 15(5), p.2689-96.
- Arenzana-Seisdedos, F. et al., 1997. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NFkappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci*, 110 (Pt 3), p.369-78.
- Arico, S. et al., 2001. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(38), p.35243-35246.
- Arrasate, M. et al., 2004. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431(7010), p.805-810.
- Arrigo, A.-P., 2005. [Heat shock proteins as molecular chaperones]. *Médecine Sciences: M/S*, 21(6-7), p.619-625.
- Arrigo, A.-P. & Ducasse, C., 2002. Expression of the anti-apoptotic protein Hsp27 during both the keratinocyte differentiation and dedifferentiation of HaCat cells: expression linked to changes in intracellular protein organization? *Experimental Gerontology*, 37(10-11), p.1247-1255.
- Baeuerle, P.A. & Baichwal, V.R., 1997. NFkappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol*, 65, p.111-37.
- Bai, X. et al., 2007. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5852), p.977-980.

- Baldwin, A.S., 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NFkappaB. *J Clin Invest*, 107(3), p.241-6.
- Baler, R., Welch, W.J. & Voellmy, R., 1992. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *The Journal of Cell Biology*, 117(6), p.1151-1159.
- Ballinger, C.A. et al., 1999. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Molecular and Cellular Biology*, 19(6), p.4535-4545.
- Band, M. et al., 2009. Hypoxia-induced BNIP3 expression and mitophagy: in vivo comparison of the rat and the hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax ehrenbergi*. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(7), p.2327-2335.
- Bandyopadhyay, U. et al., 2008. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 28(18), p.5747-5763.
- Barnhart, M.M. & Chapman, M.R., 2006. Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, 60, p.131-147.
- Basso, M. et al., 2006. Insoluble mutant SOD1 is partly oligoubiquitinated in amyotrophic lateral sclerosis mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(44), p.33325-33335.
- Beg, A.A. et al., 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NFkappa B. *Nature*, 376(6536), p.167-70.
- Bennett, E.J. et al., 2007. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature*, 448(7154), p.704-708.
- Berry, D.L. & Baehrecke, E.H., 2007. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell*, 131(6), p.1137-1148.
- Bhak, G., Choe, Y.-J. & Paik, S.R., 2009. Mechanism of amyloidogenesis: nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation. *BMB Reports*, 42(9), p.541-551.
- Bhat, K.P. & Greer, S.F., 2011. Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1809(2), p.150-155.
- Bird, T.A. et al., 1997. Activation of nuclear transcription factor NFkappaB by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem*, 272(51), p.32606-12.
- Blair, W.S. et al., 1994. Mutational analysis of the transcription activation domain of RelA: identification of a highly synergistic minimal acidic activation module. *Mol Cell Biol*, 14(11), p.7226-34.
- Bohuslav, J. et al., 2004. p53 induces NFkappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), p.26115-26125.
- Boland, B. et al., 2008. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(27), p.6926-6937.

- Bonizzi, G. & Karin, M., 2004. The two NFkappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 25(6), p.280-8.
- Bowler, K., 1987. Cellular heat injury: are membranes involved? *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 41, p.157-185.
- Boyault, C. et al., 2007a. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*, 26(37), p.5468-5476.
- Boyault, C. et al., 2007b. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes & development*, 21(17), p.2172-81.
- Brown, D.R., 2010. Oligomeric alpha-synuclein and its role in neuronal death. *IUBMB Life*, 62(5), p.334-339.
- Brunk, U.T., Jones, C.B. & Sohal, R.S., 1992. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutation Research*, 275(3-6), p.395-403.
- Budanov, A.V. & Karin, M., 2008. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134(3), p.451-460.
- Burgman, P.W. & Konings, A.W., 1992. Heat induced protein denaturation in the particulate fraction of HeLa S3 cells: effect of thermotolerance. *J Cell Physiol*, 153(1), p.88-94.
- Burré, J. et al., 2010. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5999), p.1663-1667.
- Burstein, E. & Duckett, C.S., 2003. Dying for NFkappaB? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 15(6), p.732-7.
- Buss, H. et al., 2004. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF{kappa}B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I{kappa}B kinase (IKK)-{alpha}, IKK {beta}, IKK {epsilon}, TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(53), p.55633-55643.
- Cai, S.-L. et al., 2006. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *The Journal of Cell Biology*, 173(2), p.279-289.
- Carra, S. et al., 2009a. HspB8 participates in protein quality control by a non-chaperone-like mechanism that requires eIF2 {alpha} phosphorylation. *J Biol Chem*, 284(9), p.5523-32.
- Carra, S., Seguin, S.J. & Landry, J., 2008a. HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy*, 4(2), p.237-9.
- Carra, S. et al., 2008b. HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem*, 283(3), p.1437-44.
- Carra, S. et al., 2010. Identification of the Drosophila ortholog of HSPB8: implication of HSPB8 loss of function in protein folding diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(48), p.37811-37822.
- Carra, S. et al., 2009b. HspB8 participates in protein quality control by a non-chaperone-like mechanism that requires eIF2 {alpha} phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(9), p.5523-5532.

- Carra, S. et al., 2008c. HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(3), p.1437-1444.
- Cattaneo, E., Zuccato, C. & Tartari, M., 2005. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci*, 6(12), p.919-930.
- Chang, Y.-P. et al., 2010. Autophagy facilitates IFN-gamma-induced Jak2-STAT1 activation and cellular inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(37), p.28715-28722.
- Chaufour, S., Mehlen, P. & Arrigo, A.P., 1996. Transient accumulation, phosphorylation and changes in the oligomerization of Hsp27 during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells: possible role in the control of cellular growth and differentiation. *Cell Stress & Chaperones*, 1(4), p.225-235.
- Chen, F.E. & Ghosh, G., 1999. Regulation of DNA binding by Rel/NFkappaB transcription factors: structural views. *Oncogene*, 18(49), p.6845-52.
- Chen, G., Cao, P. & Goeddel, D.V., 2002a. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell*, 9(2), p.401-10.
- Chen, L.F. & Greene, W.C., 2004. Shaping the nuclear action of NFkappaB. *Nature reviews*, 5(5), p.392-401.
- Chen, L.F., Mu, Y. & Greene, W.C., 2002b. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NFkappaB. *Embo J*, 21(23), p.6539-48.
- Chen, L. et al., 2001. Duration of nuclear NFkappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*, 293(5535), p.1653-7.
- Chen, L.-F. et al., 2005. NFkappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(18), p.7966-7975.
- Chen, X., Kandasamy, K. & Srivastava, R.K., 2003. Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res*, 63(5), p.1059-66.
- Chen, Y. et al., 2007. Oncoprotein p28 GANK binds to RelA and retains NFkappaB in the cytoplasm through nuclear export. *Cell Research*, 17(12), p.1020-1029.
- Cheong, H. et al., 2008. The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 19(2), p.668-681.
- Chiang, H.L. et al., 1989. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4928), p.382-385.
- Chondrogianni, N. et al., 2003. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(30), p.28026-28037.
- Chávez Zobel, A.T. et al., 2003. Distinct chaperone mechanisms can delay the formation of aggregates by the myopathy-causing R120G alphaB-crystallin mutant. *Human Molecular Genetics*, 12(13), p.1609-1620.
- Chévrier, M. et al., 2010. Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. *Autophagy*, 6(5).
- Clague, M.J. & Urbe, S., Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*, 143(5), p.682-5.

- Clark, S.L., Jr, 1957. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(3), p.349-362.
- Clausen, T.H. et al., 2010. p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy*, 6(3), p.330-344.
- Coakley, W.T., 1987. Hyperthermia effects on the cytoskeleton and on cell morphology. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 41, p.187-211.
- Codogno, P. & Meijer, A.J., 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, p.1509-18.
- Cohen, S., Achbert-Weiner, H. & Ciechanover, A., 2004. Dual effects of I κ B kinase beta-mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF(beta-TrCP)-dependent degradation and SCF(beta-TrCP)-independent processing. *Mol Cell Biol*, 24(1), p.475-86.
- Connelly, M.A. & Marcu, K.B., 1995. CHUK, a new member of the helix-loop-helix and leucine zipper families of interacting proteins, contains a serine-threonine kinase catalytic domain. *Cell Mol Biol Res*, 41(6), p.537-49.
- Conway, K.A. et al., 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), p.571-576.
- Copetti, T. et al., 2009. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), p.2594-2608.
- Coppola, D. et al., 2008. Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer*, 113(10), p.2665-2670.
- Crichton, D. et al., 2006. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, 126(1), p.121-134.
- Crippa, V. et al., 2010. The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Human Molecular Genetics*, 19(17), p.3440-3456.
- Cuervo, A.M. & Dice, J.F., 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5274), p.501-503.
- Cuervo, A.M. & Dice, J.F., 2000. Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 1(7), p.570-583.
- Cuervo, A.M., 2008. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends in Genetics: TIG*, 24(12), p.604-612.
- Degenhardt, K. et al., 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10(1), p.51-64.
- Deng, J. et al., 2004. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Molecular and Cellular Biology*, 24(23), p.10161-10168.
- Denton, D. et al., 2009. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 19(20), p.1741-1746.
- Deretic, V. & Levine, B., 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*, 5(6), p.527-49.

- Desai, B.N., Myers, B.R. & Schreiber, S.L., 2002. FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), p.4319-4324.
- Dewey, W.C., 1989. Failla memorial lecture. The search for critical cellular targets damaged by heat. *Radiation Research*, 120(2), p.191-204.
- Di, Y. et al., 2008. Homeostatic interactions between MEKK3 and TAK1 involved in NFkappaB signaling. *Cellular Signalling*, 20(4), p.705-713.
- DiFiglia, M. et al., 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5334), p.1990-1993.
- Dice, J.F., 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(8), p.305-309.
- Ding, T.T. et al., 2002. Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry*, 41(32), p.10209-10217.
- Ding, W.-X. et al., 2007. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(7), p.4702-4710.
- Djavaheri-Mergny, M. et al., 2006a. NFkappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem*, 281(41), p.30373-82.
- Djavaheri-Mergny, M. et al., 2006b. NFkappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(41), p.30373-30382.
- Dobrowolny, G. et al., 2008. Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metabolism*, 8(5), p.425-436.
- Doelling, J.H. et al., 2002. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(36), p.33105-33114.
- Dompierre, J.P. et al., 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci*, 27(13), p.3571-83.
- Dong, J. et al., 2008. Repression of gene expression by unphosphorylated NFkappaB p65 through epigenetic mechanisms. *Genes & Development*, 22(9), p.1159-1173.
- Dutta, J. et al., 2006. Current insights into the regulation of programmed cell death by NFkappaB. *Oncogene*, 25(51), p.6800-6816.
- Ea, C.-K. et al., 2006. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular Cell*, 22(2), p.245-257.
- Edington, B.V., Whelan, S.A. & Hightower, L.E., 1989. Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *Journal of Cellular Physiology*, 139(2), p.219-228.
- Ehrnsperger, M. et al., 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO Journal*, 16(2), p.221-229.

- Ehrnsperger, M. et al., 1999. The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(21), p.14867-14874.
- Ellgaard, L. & Helenius, A., 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(3), p.181-191.
- Fabre, C. et al., 2007. NFkappaB inhibition sensitizes to starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 26(28), p.4071-4083.
- Fabunmi, R.P. et al., 2000. Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(1), p.409-413.
- Fan, Y. et al., 2010. Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NFkappaB and JNK/AP-1 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(8), p.5347-5360.
- Feng, Z. et al., 2007. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Research*, 67(7), p.3043-3053.
- Fernandes, M., Xiao, H. & Lis, J.T., 1994. Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor--heat shock element interactions. *Nucleic Acids Research*, 22(2), p.167-173.
- Ferreira, S.T., Vieira, M.N.N. & De Felice, F.G., 2007. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life*, 59(4-5), p.332-345.
- Ferrone, F., 1999. Analysis of protein aggregation kinetics. *Methods in Enzymology*, 309, p.256-274.
- Filimonenko, M. et al., 2010. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Molecular Cell*, 38(2), p.265-279.
- Fimia, G.M. et al., 2007. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 447(7148), p.1121-5.
- Font de Mora, J. et al., 1997. Biological activity of p27kip1 and its amino- and carboxy-terminal domains in G2/M transition of *Xenopus* oocytes. *Oncogene*, 15(21), p.2541-51.
- Fontanella, B. et al., 2010. The co-chaperone BAG3 interacts with the cytosolic chaperonin CCT: new hints for actin folding. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(5), p.641-650.
- Forgac, M., 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11), p.917-29.
- Fowler, D.M. et al., 2006. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biology*, 4(1), p.e6.
- Fowler, D.M. et al., 2007. Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(5), p.217-224.
- Franceschelli, S. et al., 2008. Bag3 gene expression is regulated by heat shock factor 1. *Journal of Cellular Physiology*, 215(3), p.575-577.
- Fuchs, M. et al., 2009. Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *The Biochemical Journal*, 425(1), p.245-255.

- Fujita, N. et al., 2008. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 19(5), p.2092-2100.
- Fung, C. et al., 2008. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Molecular Biology of the Cell*, 19(3), p.797-806.
- Gallastegui, N. & Groll, M., 2010. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(11), p.634-642.
- Garcia-Mata, R. et al., 1999. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol*, 146(6), p.1239-54.
- Garcia-Mata, R., Gao, Y.S. & Sztul, E., 2002. Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic*, 3(6), p.388-96.
- Gebbink, M.F.B.G. et al., 2005. Amyloids--a functional coat for microorganisms. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(4), p.333-341.
- Geeraert, C. et al., 2010. Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J Biol Chem*, 285(31), p.24184-94.
- Geisler, S. et al., 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, 12(2), p.119-131.
- Georgopoulos, C.P. & Hohn, B., 1978. Identification of a host protein necessary for bacteriophage morphogenesis (the groE gene product). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(1), p.131-135.
- Ghosh, S. & Karin, M., 2002. Missing pieces in the NFkappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, p.S81-96.
- Ghosh, S., May, M.J. & Kopp, E.B., 1998. NFkappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16, p.225-60.
- Giacinti, C. & Giordano, A., 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), p.5220-5227.
- Giusti, C. et al., 2009. Autophagic cell death: analysis in Dictyostelium. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(9), p.1422-1431.
- Glenn, J.R., Spangenberg, P. & Heptinstall, S., 1996. Actin polymerization and depolymerization in relation to platelet shape change, aggregation and disaggregation. *Platelets*, 7(1-2), p.23-27.
- Glickman, M.H. & Ciechanover, A., 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*, 82(2), p.373-428.
- Goker-Alpan, O. et al., 2010. Glucocerebrosidase is present in α -synuclein inclusions in Lewy body disorders. *Acta Neuropathologica*, 120(5), p.641-649.
- Groll, M. et al., 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 386(6624), p.463-471.
- Grzanka, D. et al., 2008. Hyperthermia-induced reorganization of microtubules and microfilaments and cell killing in CHO AA8 cell line. *Neoplasia*, 55(5), p.409-415.
- Guay, J. et al., 1997. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci*, 110 (Pt 3), p.357-68.

- Gupta, R.S., 1995. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*, 12(6), p.1063-1073.
- Guttridge, D.C. et al., 1999. NFkappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*, 19(8), p.5785-99.
- Gwinn, D.M. et al., 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30(2), p.214-26.
- Hamano, T. et al., 2008. Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *The European Journal of Neuroscience*, 27(5), p.1119-1130.
- Hamilton, K.L., Gupta, S. & Knowlton, A.A., 2004. Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NFkB signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(4), p.577-584.
- Hammond, J.W., Cai, D. & Verhey, K.J., 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol*, 20(1), p.71-6.
- Han, S.I. et al., 2008. Hyperthermia switches glucose depletion-induced necrosis to apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 32(4), p.851-860.
- Hara, T. et al., 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), p.885-889.
- Hara, T. et al., 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 181(3), p.497-510.
- Harding, H.P. et al., 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*, 11(3), p.619-633.
- Harhaj, E.W. & Sun, S.C., 1999. Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Mol Cell Biol*, 19(10), p.7088-95.
- Harms, J. et al., 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*, 107(5), p.679-88.
- Harris, J. et al., 2009. Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages. *Vet Immunol Immunopathol*, 128(1-3), p.37-43.
- Hartl, F.U. & Hayer-Hartl, M., 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), p.574-581.
- Hayden, M.S. & Ghosh, S., 2004. Signaling to NFkappaB. *Genes Dev*, 18(18), p.2195-224.
- Haze, K. et al., 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), p.3787-3799.
- He, C. et al., 2008. Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Mol Biol Cell*, 19(12), p.5506-16.
- He, C. & Levine, B., 2010. The Beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), p.140-149.
- Heine, U. et al., 1971. The behavior of HeLa-S3 cells under the influence of supranormal temperatures. *Journal of Ultrastructure Research*, 34(3), p.375-396.

- Heitman, J., Movva, N.R. & Hall, M.N., 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5022), p.905-909.
- Herrmann, H. & Aebi, U., 2000. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(1), p.79-90.
- Hildebrandt, B. et al., 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 43(1), p.33-56.
- Hinz, M. et al., 2007. Signal responsiveness of I κ B kinases is determined by Cdc37-assisted transient interaction with Hsp90. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(44), p.32311-32319.
- Hishiya, A. et al., 2011. BAG3 directly interacts with mutated alphaB-crystallin to suppress its aggregation and toxicity. *PloS One*, 6(3), p.e16828.
- Hoffmann, A. et al., 2002. The I κ B-NF κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5596), p.1241-1245.
- Homma, S. et al., 2006. BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *The American Journal of Pathology*, 169(3), p.761-773.
- Horie, R. et al., 2002. Cytoplasmic aggregation of TRAF2 and TRAF5 proteins in the Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *The American Journal of Pathology*, 160(5), p.1647-1654.
- Hosokawa, N. et al., 2009a. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), p.1981-1991.
- Hosokawa, N. et al., 2009b. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 5(7), p.973-979.
- Hu, P. et al., 2006. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 26(8), p.3071-3084.
- Huang, B. et al., 2010. Posttranslational modifications of NF κ B: another layer of regulation for NF κ B signaling pathway. *Cellular Signalling*, 22(9), p.1282-1290.
- Huang, B. et al., 2009. Brd4 coactivates transcriptional activation of NF κ B via specific binding to acetylated RelA. *Molecular and Cellular Biology*, 29(5), p.1375-1387.
- Huang, S.H. et al., 1999. Effects of hyperthermia on the cytoskeleton and focal adhesion proteins in a human thyroid carcinoma cell line. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(2), p.327-337.
- Huang, T.T. et al., 2000. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF κ B/I κ B α complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), p.1014-1019.
- Huxford, T. et al., 1998. The crystal structure of the I κ B α /NF κ B complex reveals mechanisms of NF κ B inactivation. *Cell*, 95(6), p.759-70.
- Ichimura, Y. et al., 2008. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(33), p.22847-22857.
- Iconomidou, V.A., Vriend, G. & Hamodrakas, S.J., 2000. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. *FEBS Letters*, 479(3), p.141-145.

- Ikeda, F. & Dikic, I., 2008. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. « Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects » review series. *EMBO Reports*, 9(6), p.536-542.
- Imbert, V. et al., 1996. Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NFkappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell*, 86(5), p.787-98.
- Inoki, K. et al., 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 17(15), p.1829-34.
- Ionov, Y. et al., 2004. Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability. *Oncogene*, 23(3), p.639-645.
- Iqbal, J. et al., 2009. Genomic analyses reveal global functional alterations that promote tumor growth and novel tumor suppressor genes in natural killer-cell malignancies. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 23(6), p.1139-1151.
- Israel, A., 1995. A role for phosphorylation and degradation in the control of NFkappa B activity. *Trends Genet*, 11(6), p.203-5.
- Iwagami, Y., 1996. Changes in the ultrastructure of human cells related to certain biological responses under hyperthermic culture conditions. *Human Cell: Official Journal of Human Cell Research Society*, 9(4), p.353-366.
- Jaattela, M. et al., 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J*, 17(21), p.6124-34.
- Jacobs, M.D. & Harrison, S.C., 1998. Structure of an IkappaBalpha/NFkappaB complex. *Cell*, 95(6), p.749-58.
- Jacquier-Sarlin, M.R. & Polla, B.S., 1996. Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem J*, 318 (Pt 1), p.187-93.
- Jaffray, E., Wood, K.M. & Hay, R.T., 1995. Domain organization of I kappa B alpha and sites of interaction with NFkappa B p65. *Mol Cell Biol*, 15(4), p.2166-72.
- Jager, S. et al., 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci*, 117(Pt 20), p.4837-48.
- Jahreiss, L., Menzies, F.M. & Rubinsztein, D.C., 2008. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic*, 9(4), p.574-87.
- Johnston, J.A. et al., 2000. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), p.12571-12576.
- Johnston, J.A., Ward, C.L. & Kopito, R.R., 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143(7), p.1883-98.
- Jono, H. et al., 2004. NFkappaB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NFkappaB: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), p.36171-36174.
- Joshi, K.K. et al., 2011. A Proteasome Assembly Defect in rpn3 Mutants Is Associated with Rpn11 Instability and Increased Sensitivity to Stress. *Journal of Molecular Biology*, 410(3), p.383-399.

- Ju, J.-S. et al., 2009. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *The Journal of Cell Biology*, 187(6), p.875-888.
- Juhász, G. et al., 2003. The Drosophila homolog of Atg1 is essential for autophagy and development. *FEBS Letters*, 543(1-3), p.154-158.
- Kabeya, Y. et al., 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 117(Pt 13), p.2805-12.
- Kametaka, S. et al., 1998. Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(35), p.22284-22291.
- Kampinga, H.H., Dynlacht, J.R. & Dikomey, E., 2004. Mechanism of radiosensitization by hyperthermia (≥ 43 degrees C) as derived from studies with DNA repair defective mutant cell lines. *International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 20(2), p.131-139.
- Kampinga, H.H., 1993. Thermotolerance in mammalian cells. Protein denaturation and aggregation, and stress proteins. *J Cell Sci*, 104 (Pt 1), p.11-7.
- Kamradt, M.C. et al., 2002. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), p.38731-38736.
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y., 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF[κ]B activity. *Annu Rev Immunol*, 18, p.621-63.
- Karin, M. & Delhase, M., 2000. The I kappa B kinase (IKK) and NFkappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol*, 12(1), p.85-98.
- Karin, M., Yamamoto, Y. & Wang, Q.M., 2004. The IKK NFkappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 3(1), p.17-26.
- Karzai, A.W. & McMacken, R., 1996. A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(19), p.11236-11246.
- Kegel, K.B. et al., 2000. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(19), p.7268-7278.
- Khandjian, E.W., 1995. Heat treatment induces dephosphorylation of pRb and dissociation of T-antigen/pRb complex during transforming infection with SV40. *Oncogene*, 10(2), p.359-367.
- Kiernan, R. et al., 2003. Post-activation turn-off of NFkappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(4), p.2758-2766.
- Kiffin, R. et al., 2004. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Molecular Biology of the Cell*, 15(11), p.4829-4840.
- Kihara, A. et al., 2001. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO reports*, 2(4), p.330-5.
- Kim, D.W. et al., 2000. The RelA NFkappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene*, 19(48), p.5498-5506.

- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. & Lemasters, J.J., 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2), p.245-253.
- Kim, M.S. et al., 2008. Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Human Pathology*, 39(7), p.1059-1063.
- Kirkin, V. et al., 2009a. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*, 33(4), p.505-16.
- Kirkin, V. et al., 2009b. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy*, 5(5), p.732-733.
- Kleijnen, M.F. et al., 2000. The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Molecular Cell*, 6(2), p.409-419.
- Klionsky, D.J. et al., 2008a. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4(2), p.151-75.
- Klionsky, D.J. et al., 2008b. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy*, 4(7), p.849-950.
- Kodali, R. & Wetzel, R., 2007. Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(1), p.48-57.
- Komata, T. et al., 2004. Mild heat shock induces autophagic growth arrest, but not apoptosis in U251-MG and U87-MG human malignant glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 68(2), p.101-111.
- Komatsu, M. et al., 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095), p.880-4.
- Komatsu, M. et al., 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 169(3), p.425-434.
- Koong, A.C., Chen, E.Y. & Giaccia, A.J., 1994. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res*, 54(6), p.1425-30.
- Korolchuk, V.I. et al., 2009. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell*, 33(4), p.517-27.
- Kouroku, Y. et al., 2007. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death and Differentiation*, 14(2), p.230-239.
- Kovalenko, A. et al., 2003. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NFkappaB signalling by deubiquitination. *Nature*, 424(6950), p.801-805.
- Kramer, G. et al., 2009. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), p.589-597.
- Kretz-Remy, C. et al., 1996. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NFkappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *The Journal of Cell Biology*, 133(5), p.1083-1093.
- Kretz-Remy, C., Bates, E.E. & Arrigo, A.P., 1998. Amino acid analogs activate NFkappaB through redox-dependent IkappaB-alpha degradation by the proteasome without apparent IkappaB-alpha phosphorylation. Consequence on HIV-1 long terminal repeat activation. *J Biol Chem*, 273(6), p.3180-91.

- Kretz-Remy, C., Munsch, B. & Arrigo, A.P., 2001. NFkappa B-dependent transcriptional activation during heat shock recovery. Thermolability of the NFkappaB.Ikappa B complex. *J Biol Chem*, 276(47), p.43723-33.
- Kretz-Remy, C. & Arrigo, A.-P., 2002. Gene expression and thiol redox state. *Methods in Enzymology*, 348, p.200-215.
- Krobitch, S. & Kazantsev, A.G., 2011. Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(1), p.20-24.
- Kucharczak, J. et al., 2003. To be, or not to be: NFkappaB is the answer--role of Rel/NFkappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 22(56), p.8961-82.
- Kuhl, N.M. & Rensing, L., 2000. Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell Mol Life Sci*, 57(3), p.450-63.
- Kuma, A. et al., 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432(7020), p.1032-6.
- Kuma, A. et al., 2002. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5.Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), p.18619-18625.
- Kyei, G.B. et al., 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol*, 186(2), p.255-68.
- Lamphear, B.J. & Panniers, R., 1991. Heat shock impairs the interaction of cap-binding protein complex with 5' mRNA cap. *J Biol Chem*, 266(5), p.2789-94.
- Latonen, L. et al., 2011. Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene*, 30(7), p.790-805.
- Laufen, T. et al., 1999. Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), p.5452-5457.
- Lee, E.G. et al., 2000. Failure to regulate TNF-induced NFkappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5488), p.2350-2354.
- Lee, J.S. et al., 2009. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol*, 11(11), p.1355-62.
- Lee, J.Y. et al., 2010. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J*, 29(5), p.969-80.
- Lee, J.-A. & Gao, F.-B., 2009. Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(26), p.8506-8511.
- Lepock, J.R. et al., 2001. The nuclear matrix is a thermolabile cellular structure. *Cell Stress & Chaperones*, 6(2), p.136-147.
- Levine, B. & Klionsky, D.J., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6(4), p.463-77.
- Levine, B. & Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), p.27-42.

- Levy, Y. & Onuchic, J.N., 2006. Water mediation in protein folding and molecular recognition. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35, p.389-415.
- Li, C.C. et al., 1994. Phosphorylation of NFkB1-p50 is involved in NFkB activation and stable DNA binding. *J Biol Chem*, 269(48), p.30089-92.
- Li, J.-Y., Plomann, M. & Brundin, P., 2003. Huntington's disease: a synaptopathy? *Trends in Molecular Medicine*, 9(10), p.414-420.
- Li, L., Zhang, X. & Le, W., 2008. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy*, 4(3), p.290-293.
- Li, N. & Karin, M., 1998. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NFkB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(22), p.13012-7.
- Li, Q. & Verma, I.M., 2002. NFkB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2(10), p.725-34.
- Li, Z.W. et al., 1999. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med*, 189(11), p.1839-45.
- Liang, C. et al., 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature Cell Biology*, 8(7), p.688-699.
- Liang, X.H. et al., 1998. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of Virology*, 72(11), p.8586-8596.
- Liang, X.H. et al., 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), p.672-6.
- Liberek, K. et al., 1991. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(7), p.2874-2878.
- Liberek, K., Lewandowska, A. & Zietkiewicz, S., 2008. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J*, 27(2), p.328-35.
- Lilley, B.N. & Ploegh, H.L., 2005. Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), p.14296-14301.
- Lin, L., DeMartino, G.N. & Greene, W.C., 1998. Cotranslational biogenesis of NFkB p50 by the 26S proteasome. *Cell*, 92(6), p.819-828.
- Lin, R.Z. et al., 1997. Heat shock activates c-Src tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in NIH3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 272(49), p.31196-202.
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, 55, p.1151-91.
- Liu, J. et al., 2005a. Impairment of the ubiquitin-proteasome system in desminopathy mouse hearts. *The FASEB Journal*.
- Liu, L. et al., 2009. Nucling interacts with nuclear factor-kappaB, regulating its cellular distribution. *The FEBS Journal*, 276(5), p.1459-1470.
- Liu, Y. et al., 2005b. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121(4), p.567-77.
- Liu, Y. et al., 2007. Cytoprotective effects of proteasome beta5 subunit overexpression in lens epithelial cells. *Molecular Vision*, 13, p.31-38.

- Liu, Y., Smith, P.W. & Jones, D.R., 2006. Breast cancer metastasis suppressor 1 functions as a corepressor by enhancing histone deacetylase 1-mediated deacetylation of RelA/p65 and promoting apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 26(23), p.8683-8696.
- Lu, Z. et al., 2008. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(12), p.3917-3929.
- Lüders, J., Demand, J. & Höhfeld, J., 2000. The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(7), p.4613-4617.
- Mabb, A.M., Wuerzberger-Davis, S.M. & Miyamoto, S., 2006. PIASy mediates NEMO sumoylation and NFkappaB activation in response to genotoxic stress. *Nature Cell Biology*, 8(9), p.986-993.
- MacDonald, M.E. et al., 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), p.971-983.
- De Maio, A., 1999. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock (Augusta, Ga.)*, 11(1), p.1-12.
- Maiuri, M.C. et al., 2007. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *Embo J*, 26(10), p.2527-2539.
- Mammucari, C. et al., 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism*, 6(6), p.458-471.
- Mao, Y.-W. et al., 2004. Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 11(5), p.512-526.
- Mariño, G. et al., 2007. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(25), p.18573-18583.
- Martens, S. & McMahon, H.T., 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), p.543-56.
- Masiero, E. et al., 2009. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metabolism*, 10(6), p.507-515.
- Mathew, R. et al., 2009. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*, 137(6), p.1062-1075.
- Mathew, R. et al., 2007. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes & Development*, 21(11), p.1367-1381.
- Matsunaga, K. et al., 2009. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol*, 11(4), p.385-96.
- Matsunaga, K. et al., 2010. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of Cell Biology*, 190(4), p.511-521.
- Mauro, C. et al., 2006. ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NFkappaB. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(27), p.18482-18488.
- Mayer, M.P. & Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 62(6), p.670-684.

- Mayhew, M. et al., 1996. Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature*, 379(6564), p.420-426.
- McCarty, J.S. et al., 1995. The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *Journal of Molecular Biology*, 249(1), p.126-137.
- McDonough, H. & Patterson, C., 2003. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress & Chaperones*, 8(4), p.303-308.
- Meek, D.W., 2009. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature Reviews. Cancer*, 9(10), p.714-723.
- Mehrpour, M. et al., 2010. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 298(4), p.C776-785.
- Meléndez, A. et al., 2003. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5638), p.1387-1391.
- Meraldi, P. & Nigg, E.A., 2001. Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 20), p.3749-3757.
- Mercurio, F. et al., 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NFkappaB activation. *Science*, 278(5339), p.860-6.
- Michiorri, S. et al., 2010. The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 17(6), p.962-974.
- Miller, B.C. et al., 2008. The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy*, 4(3), p.309-14.
- Mizushima, N., 2010. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), p.132-139.
- Mizushima, N. & Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), p.542-545.
- Mizzen, L.A. & Welch, W.J., 1988. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *The Journal of Cell Biology*, 106(4), p.1105-1116.
- Morimoto, R.I., 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, 12(24), p.3788-96.
- Mosialos, G. & Gilmore, T.D., 1993. v-Rel and c-Rel are differentially affected by mutations at a consensus protein kinase recognition sequence. *Oncogene*, 8(3), p.721-30.
- Mukaiyama, H. et al., 2004. Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure. *Molecular Biology of the Cell*, 15(1), p.58-70.
- Murata, S. et al., 2001. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Reports*, 2(12), p.1133-1138.
- Murata, S., Yashiroda, H. & Tanaka, K., 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(2), p.104-115.

- Murtha-Riel, P. et al., 1993. Expression of a phosphorylation-resistant eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit mitigates heat shock inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem*, 268(17), p.12946-51.
- Myeku, N. & Figueiredo-Pereira, M.E., 2011. Dynamics of the Degradation of Ubiquitinated Proteins by Proteasomes and Autophagy: ASSOCIATION WITH SEQUESTOSOME 1/p62. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(25), p.22426-22440.
- Nakahata, K. et al., 2002. Heat shock induces centrosomal dysfunction, and causes non-apoptotic mitotic catastrophe in human tumour cells. *International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 18(4), p.332-343.
- Nakai, A. et al., 2007. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature Medicine*, 13(5), p.619-624.
- Nara, A. et al., 2002. SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell Struct Funct*, 27(1), p.29-37.
- Narendra, D.P. et al., 2010. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biology*, 8(1), p.e1000298.
- Narendra, D. et al., 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 183(5), p.795-803.
- Niculescu, A.B. et al., 1998. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*, 18(1), p.629-43.
- Nishitoh, H. et al., 2002. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Development*, 16(11), p.1345-1355.
- Nitta, M. et al., 1997. Heat shock induces transient p53-dependent cell cycle arrest at G1/S. *Oncogene*, 15(5), p.561-568.
- Nixon, R.A. et al., 2005. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(2), p.113-122.
- Noda, T., Fujita, N. & Yoshimori, T., 2009. The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell Death Differ*, 16(7), p.984-90.
- Notterpek, L. et al., 1999. PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiology of Disease*, 6(5), p.450-460.
- Novak, I. et al., 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Reports*, 11(1), p.45-51.
- Nover, L. & Scharf, K.D., 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci*, 53(1), p.80-103.
- Nowak, D.E. et al., 2008. RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NFkappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 28(11), p.3623-3638.
- Nowak, J. et al., 2009. The TP53INP2 protein is required for autophagy in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 20(3), p.870-881.

- Nussbaum, A.K. et al., 1998. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), p.12504-12509.
- N'Diaye, E.N., Debnath, J. & Brown, E.J., 2009. Ubiquilins accelerate autophagosome maturation and promote cell survival during nutrient starvation. *Autophagy*, 5(4), p.573-5.
- Oberstein, A., Jeffrey, P.D. & Shi, Y., 2007. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem*, 282(17), p.13123-32.
- Olshina, M.A. et al., 2010. Tracking mutant huntingtin aggregation kinetics in cells reveals three major populations that include an invariant oligomer pool. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(28), p.21807-21816.
- Orian, A. et al., 1999. Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NFkappaB precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Molecular and Cellular Biology*, 19(5), p.3664-3673.
- Orvedahl, A. et al., 2010. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe*, 7(2), p.115-27.
- Oshima, S. et al., 2009. ABIN-1 is a ubiquitin sensor that restricts cell death and sustains embryonic development. *Nature*, 457(7231), p.906-909.
- Otto, G.P. et al., 2003. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(20), p.17636-17645.
- Pahl, H.L. & Baeuerle, P.A., 1997. The ER-overload response: activation of NFkappa B. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(2), p.63-67.
- Pahl, H.L., 1999. Activators and target genes of Rel/NFkappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49), p.6853-66.
- Pajonk, F., van Ophoven, A. & McBride, W.H., 2005. Hyperthermia-induced proteasome inhibition and loss of androgen receptor expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 65(11), p.4836-43.
- Paludan, C. et al., 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, 307(5709), p.593-6.
- Pan, X. et al., 2000. Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Molecular Biology of the Cell*, 11(7), p.2445-2457.
- Pankiv, S. et al., 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), p.24131-24145.
- Park, H.G. et al., 2005. Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci*, 62(1), p.10-23.
- Pattingre, S. et al., 2008. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie*, 90(2), p.313-23.
- Pattingre, S. et al., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), p.927-39.
- Paul, C. et al., 2002. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Molecular and Cellular Biology*, 22(3), p.816-834.

- Pearl, L.H. & Prodromou, C., 2000. Structure and in vivo function of Hsp90. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(1), p.46-51.
- Perkins, N.D., 2004. NFkappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol*, 14(2), p.64-9.
- Perkins, N.D. et al., 1997. Regulation of NFkappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science*, 275(5299), p.523-7.
- Picard, D., 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 59(10), p.1640-8.
- Pickart, C.M., 2004. Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 116(2), p.181-190.
- Pinto, M., Morange, M. & Bensaude, O., 1991. Denaturation of proteins during heat shock. In vivo recovery of solubility and activity of reporter enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(21), p.13941-13946.
- Pirkkala, L., Nykanen, P. & Sistonen, L., 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J*, 15(7), p.1118-31.
- Pi etri-Rouxel, F. et al., 2010. DHPR alpha1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *The EMBO Journal*, 29(3), p.643-654.
- Pockley, A.G., 2001. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 3(23), p.1-21.
- Pouchelet, M. et al., 1983. Localization of the 70 000 dalton heat-induced protein in the nuclear matrix of BHK cells. *Experimental Cell Research*, 149(2), p.451-459.
- Pua, H.H. et al., 2007. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med*, 204(1), p.25-31.
- Qin, J. et al., 2006. TLR8-mediated NFkappaB and JNK activation are TAK1-independent and MEKK3-dependent. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(30), p.21013-21021.
- Qin, L. et al., 2010. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy*, 6(2), p.239-247.
- Qing, G., Yan, P. & Xiao, G., 2006. Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasome-independent degradation of IkappaB kinase (IKK). *Cell Research*, 16(11), p.895-901.
- Raben, N. et al., 2008. Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Human Molecular Genetics*, 17(24), p.3897-3908.
- Ramachandran, N. et al., 2009. VMA21 deficiency causes an autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification. *Cell*, 137(2), p.235-46.
- Ramaekers, C.H.M.A. & Wouters, B.G., 2011. Regulatory functions of ubiquitin in diverse DNA damage responses. *Current Molecular Medicine*, 11(2), p.152-169.
- Ran, R. et al., 2004. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NFkappa B survival signaling. *Genes & Development*, 18(12), p.1466-1481.
- Rashmi, R. et al., 2008. BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene*, 27(10), p.1366-1375.

- Ravikumar, B., Duden, R. & Rubinsztein, D.C., 2002. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human Molecular Genetics*, 11(9), p.1107-1117.
- Ravikumar, B. et al., 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics*, 36(6), p.585-595.
- Rayet, B. & Gelinas, C., 1999. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18(49), p.6938-47.
- Renner, F., Moreno, R. & Schmitz, M.L., 2010. SUMOylation-dependent localization of IKKepsilon in PML nuclear bodies is essential for protection against DNA-damage-triggered cell death. *Molecular Cell*, 37(4), p.503-515.
- Ritossa, F., 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress & Chaperones*, 1(2), p.97-98.
- Roberts, C.J., 2007. Non-native protein aggregation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(5), p.927-938.
- Rodriguez-Gonzalez, A. et al., 2008. Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation. *Cancer Research*, 68(8), p.2557-2560.
- Ropolo, A. et al., 2007. The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(51), p.37124-37133.
- Rothwarf, D.M. & Karin, M., 1999. The NFkappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE*, 1999(5), p.RE1.
- Rothwarf, D.M. et al., 1998. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, 395(6699), p.297-300.
- Roti Roti, J.L. et al., 1998. Nuclear matrix as a target for hyperthermic killing of cancer cells. *Cell Stress & Chaperones*, 3(4), p.245-255.
- Rudolph, D. et al., 2000. Severe liver degeneration and lack of NFkappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev*, 14(7), p.854-62.
- Rudolph, M.G. et al., 2001. Thermodynamics of Ras/effector and Cdc42/effector interactions probed by isothermal titration calorimetry. *J Biol Chem*, 276(26), p.23914-21.
- Rutherford, S.L. & Lindquist, S., 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396(6709), p.336-342.
- Rutkowski, D.T. & Hegde, R.S., 2010. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *The Journal of Cell Biology*, 189(5), p.783-794.
- Saccani, S., Pantano, S. & Natoli, G., 2003. Modulation of NFkappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell*, 11(6), p.1563-74.
- Saftig, P. et al., 2001. Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease. *Trends in Molecular Medicine*, 7(1), p.37-39.
- Saftig, P. & Klumperman, J., 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(9), p.623-35.
- Saftig, P., Beertsen, W. & Eskelinen, E.L., 2008. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*, 4(4), p.510-2.

- Saibil, H.R., 2008. Chaperone machines in action. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(1), p.35-42.
- Saitoh, T. et al., 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*, 456(7219), p.264-8.
- Sakono, M. & Zako, T., 2010. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *The FEBS Journal*, 277(6), p.1348-1358.
- Salisbury, J.L., 2007. A mechanistic view on the evolutionary origin for centrin-based control of centriole duplication. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), p.420-428.
- Salisbury, J.L. et al., 2002. Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Current Biology: CB*, 12(15), p.1287-1292.
- Salvador, N. et al., 2000. Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(35), p.27447-27456.
- Samali, A. et al., 1999. Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins. *FEBS Lett*, 461(3), p.306-10.
- Sanbe, A. et al., 2005. Reversal of amyloid-induced heart disease in desmin-related cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), p.13592-13597.
- Saraiva, M.J., 2001. Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. *FEBS Letters*, 498(2-3), p.201-203.
- Sarbassov, D.D. et al., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5712), p.1098-1101.
- Satyal, S.H. et al., 1998. Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes & Development*, 12(13), p.1962-1974.
- Savion, S. et al., 2007. NFkappaB regulates the response of embryonic cells to heat shock. *International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 23(3), p.277-286.
- Scharf, K.D. & Nover, L., 1982. Heat-shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell*, 30(2), p.427-37.
- Scherzinger, E. et al., 1999. Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), p.4604-4609.
- Schlottmann, S. et al., 2008. Prolonged classical NFkappaB activation prevents autophagy upon E. coli stimulation in vitro: a potential resolving mechanism of inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2008, p.725854.
- Schmid, D. & Munz, C., 2007. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*, 27(1), p.11-21.
- Schmidt-Ullrich, R. et al., 2001. Requirement of NFkappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development*, 128(19), p.3843-53.
- Schmitz, M.L. et al., 1995. Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NFkappa B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators. *J Biol Chem*, 270(13), p.7219-26.

- Sen, R. & Baltimore, D., 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nfkappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47(6), p.921-928.
- Senftleben, U. et al., 2001. IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity*, 14(3), p.217-30.
- Shang, F. & Taylor, A., 2011. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(1), p.5-16.
- Sharp, P.M. & Li, W.H., 1987. Ubiquitin genes as a paradigm of concerted evolution of tandem repeats. *Journal of Molecular Evolution*, 25(1), p.58-64.
- Sigler, P.B. et al., 1998. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annual Review of Biochemistry*, 67, p.581-608.
- Simon, S. et al., 2007. Residue R120 is essential for the quaternary structure and functional integrity of human alphaB-crystallin. *Biochemistry*, 46(33), p.9605-9614.
- Simonsen, A. et al., 2008. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult Drosophila. *Autophagy*, 4(2), p.176-184.
- Singleton, A.B. et al., 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5646), p.841.
- Smahi, A. et al., 2000. Genomic rearrangement in NEMO impairs NFkappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature*, 405(6785), p.466-472.
- Sofer, A. et al., 2005. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), p.5834-5845.
- Solan, N.J. et al., 2002. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem*, 277(2), p.1405-18.
- Sun, S.C. et al., 1993. NFkappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5103), p.1912-1915.
- Sun, S.-C., 2011. Non-canonical NFκB signaling pathway. *Cell Research*, 21(1), p.71-85.
- Suzuki, K. & Ohsumi, Y., 2010. Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS Letters*, 584(7), p.1280-1286.
- Tak, P.P. & Firestein, G.S., 2001a. NFkappaB: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation*, 107(1), p.7-11.
- Tak, P.P. & Firestein, G.S., 2001b. NFkappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 107(1), p.7-11.
- Takada, Y. et al., 2003. Hydrogen peroxide activates NFkappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(26), p.24233-24241.
- Takahashi, Y. et al., 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology*, 9(10), p.1142-51.
- Takeda, K. et al., 1999. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science*, 284(5412), p.313-6.
- Talbot, N.J., 2003. Aerial morphogenesis: enter the chaplins. *Current Biology: CB*, 13(18), p.R696-698.

- Tamai, K. et al., 2007. Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 360(4), p.721-7.
- Tanaka, K., 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(1), p.12-36.
- Tanaka, M. et al., 1999. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NFkappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity*, 10(4), p.421-9.
- Tang, E.D. et al., 2003. Roles for homotypic interactions and transautophosphorylation in IkappaB kinase beta (IKKbeta) activation [corrected]. *J Biol Chem*, 278(40), p.38566-70.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. & Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(3), p.231-241.
- Tergaonkar, V. et al., 2002. p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell*, 1(5), p.493-503.
- Tergaonkar, V. et al., 2005. Distinct roles of I[kappa]B proteins in regulating constitutive NF[kappa]B activity. *Nat Cell Biol*, 7(9), p.921-923.
- Terman, A., Gustafsson, B. & Brunk, U.T., 2007. Autophagy, organelles and ageing. *The Journal of Pathology*, 211(2), p.134-143.
- Thompson, J.E. et al., 1995. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NFkappa B. *Cell*, 80(4), p.573-82.
- Traenckner, E.B. et al., 1995. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NFkappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J*, 14(12), p.2876-83.
- Tresse, E. et al., 2010. VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. *Autophagy*, 6(2), p.217-27.
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S., 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 12 Suppl 2, p.1528-1534.
- Tsukada, M. & Ohsumi, Y., 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 333(1-2), p.169-174.
- Urano, F. et al., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5453), p.664-666.
- Urushitani, M. et al., 2004. CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. *Journal of Neurochemistry*, 90(1), p.231-244.
- Uversky, V.N., 2010. Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *The FEBS Journal*, 277(14), p.2940-2953.
- Uversky, V.N., 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), p.17-37.
- Verdone, G. et al., 2002. The solution structure of human beta2-microglobulin reveals the prodromes of its amyloid transition. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 11(3), p.487-499.
- Vermeulen, L. et al., 2003. Transcriptional activation of the NFkappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J*, 22(6), p.1313-24.

- Vicart, P. et al., 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature Genetics*, 20(1), p.92-95.
- Vingtdeux, V. et al., 2011. Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid- β peptide degradation. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(1), p.219-231.
- Wang, X. et al., 2005. Runx1 prevents wasting, myofibrillar disorganization, and autophagy of skeletal muscle. *Genes & Development*, 19(14), p.1715-1722.
- Wang, Y. et al., 2010. Regulation of heat shock protein 60 and 72 expression in the failing heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(2), p.360-366.
- Ward, W.F., 2002. Protein degradation in the aging organism. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 29, p.35-42.
- Webber, J.L. & Tooze, S.A., 2010. Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *The EMBO Journal*, 29(1), p.27-40.
- Webster, D.R. et al., 1987. Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(24), p.9040-9044.
- Wei, Y. et al., 2008. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell*, 30(6), p.678-88.
- Weidberg, H. et al., 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J*, 29(11), p.1792-802.
- Welch, W.J., 2004. Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(1), p.31-38.
- Wiech, H. et al., 1992. Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature*, 358(6382), p.169-170.
- Wigley, W.C. et al., 1999. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *The Journal of Cell Biology*, 145(3), p.481-490.
- Wilde, I.B. et al., 2011. Proteomic characterization of aggregating proteins after the inhibition of the ubiquitin proteasome system. *Journal of Proteome Research*, 10(3), p.1062-1072.
- Winslow, A.R. & Rubinsztein, D.C., 2008. Autophagy in neurodegeneration and development. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1782(12), p.723-729.
- Wong, E.S.P. et al., 2008. Autophagy-mediated clearance of aggresomes is not a universal phenomenon. *Human Molecular Genetics*, 17(16), p.2570-2582.
- Wu, M. et al., 1996. Inhibition of NFkappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *Embo J*, 15(17), p.4682-90.
- Wu, Z.H. et al., 2006. Molecular linkage between the kinase ATM and NFkappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*, 311(5764), p.1141-6.
- Xia, Z. et al., 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270(5240), p.1326-31.
- Xiao, G., Fong, A. & Sun, S.-C., 2004. Induction of p100 processing by NFkappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), p.30099-30105.

- Xiao, G., Harhaj, E.W. & Sun, S.C., 2001. NFkappaB-inducing kinase regulates the processing of NFkappaB2 p100. *Mol Cell*, 7(2), p.401-9.
- Xie, Z. & Klionsky, D.J., 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 9(10), p.1102-9.
- Yamamoto, A. & Simonsen, A., 2011. The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for aggrephagy in neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 43(1), p.17-28.
- Yamamoto, Y. et al., 2003. Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*, 423(6940), p.655-9.
- Yamaoka, S. et al., 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NFkappaB activation. *Cell*, 93(7), p.1231-40.
- Yamazaki, K. et al., 2009. Two mechanistically and temporally distinct NFkappaB activation pathways in IL-1 signaling. *Science Signaling*, 2(93), p.ra66.
- Yang, X. et al., 2008. The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. *Journal of Animal Science*, 86(14 Suppl), p.E36-50.
- Yaron, A. et al., 1998. Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature*, 396(6711), p.590-4.
- Yasumoto, J.-ichi et al., 2004. Apoptosis-related gene expression after hyperthermia in human tongue squamous cell carcinoma cells harboring wild-type or mutated-type p53. *Cancer Letters*, 204(1), p.41-51.
- Ye, Y. et al., 2005. Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), p.14132-14138.
- Yecies, J.L. & Manning, B.D., 2011. mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 89(3), p.221-228.
- Yeung, F. et al., 2004. Modulation of NFkappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO Journal*, 23(12), p.2369-2380.
- Yorimitsu, T. et al., 2006. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(40), p.30299-30304.
- Yoshida, H. et al., 2006. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of Cell Biology*, 172(4), p.565-575.
- Yoshikawa, Y. et al., 2009. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol*, 11(10), p.1233-40.
- Yost, H.J. & Lindquist, S., 1991. Heat shock proteins affect RNA processing during the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 11(2), p.1062-8.
- Yost, H.J. & Lindquist, S., 1986. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell*, 45(2), p.185-93.
- Young, A.R. et al., 2006. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*, 119(Pt 18), p.3888-900.
- Yu, W.H. et al., 2005. Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *The Journal of Cell Biology*, 171(1), p.87-98.

- Yue, Z. et al., 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), p.15077-15082.
- Zalckvar, E. et al., 2009. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep*, 10(3), p.285-92.
- Zandi, E. et al., 1997. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NFkappaB activation. *Cell*, 91(2), p.243-52.
- Zerfaoui, M. et al., 2010. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a determining factor in Crm1-mediated nuclear export and retention of p65 NFkappa B upon TLR4 stimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(3), p.1894-1902.
- Zhang, C. & Cuervo, A.M., 2008. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nature Medicine*, 14(9), p.959-965.
- Zhang, H. et al., 2008. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(16), p.10892-10903.
- Zhang, J. & Ney, P.A., 2009. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death and Differentiation*, 16(7), p.939-946.
- Zhang, J. et al., 2006. Impaired regulation of NFkappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(11), p.3042-3049.
- Zhang, W. & Kone, B.C., 2002. NFkappaB inhibits transcription of the H(+)-K(+)-ATPase alpha(2)-subunit gene: role of histone deacetylases. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 283(5), p.F904-911.
- Zhao, J. et al., 2007. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism*, 6(6), p.472-483.
- Zhong, H., Voll, R.E. & Ghosh, S., 1998. Phosphorylation of NFkappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*, 1(5), p.661-71.
- Zhou, J. et al., 2011. Effect of hyperthermia on the apoptosis and proliferation of CaSki cells. *Molecular Medicine Reports*, 4(1), p.187-191.
- Zimmerman, S.B. & Trach, S.O., 1991. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*, 222(3), p.599-620.
- Zou, J. et al., 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, 94(4), p.471-480.

**ANNEXE : HspB1 et HspB5 comme cibles
thérapeutiques**

Minireview

Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets

André-Patrick Arrigo^{a,*}, Stéphanie Simon^{a,b}, Benjamin Gibert^a, Carole Kretz-Remy^a,
Mathieu Nivon^a, Anna Czekalla^a, Dominique Guillet^a, Maryline Moulin^a,
Chantal Diaz-Latoud^a, Patrick Vicart^b

^a *Laboratoire Stress, Chaperons et Mort Cellulaire, CNRS, UMR5534, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université Lyon 1, Bat. Gregor Mendel, 16 Rue Dubois, F-69622, Villeurbanne Cedex, France*

^b *EA 300 Stress et Pathologies du Cytosquelette, UFR de Biochimie, Université Paris 7, Paris, France*

Received 16 February 2007; revised 11 April 2007; accepted 15 April 2007

Available online 24 April 2007

Edited by Robert Barouki

Abstract Hsp27 and α B-crystallin are molecular chaperones that are constitutively expressed in several mammalian cells, particularly in pathological conditions. These proteins share functions as diverse as protection against toxicity mediated by aberrantly folded proteins or oxidative-inflammation conditions. In addition, these proteins share anti-apoptotic properties and are tumorigenic when expressed in cancer cells. This review summarizes the current knowledge about Hsp27 and α B-crystallin and the implications, either positive or deleterious, of these proteins in pathologies such as neurodegenerative diseases, myopathies, asthma, cataracts and cancers. Approaches towards therapeutic strategies aimed at modulating the expression and/or the activities of Hsp27 and α B-crystallin are presented.

© 2007 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Hsp27; α B-crystallin; Neurodegenerative diseases; Myopathies; Cancers

1. Hsp27 and α B-crystallin: old and new

Heat shock proteins (Hsps) or stress proteins have in common a stimulated synthesis in response to heat shock or when the environment of a cell becomes deleterious and alters protein folding. In cells exposed to heat shock, Hsps act as molecular chaperones that counteract the formation of aberrantly folded polypeptides and allow their correct refolding during stress recovery. In addition of being expressed in stressed cells, some Hsps show a basal level of constitutive expression and act as in-house chaperone towards several fundamental cellular processes, such as protein intracellular transport, cytoskeletal architecture, mutations masking, translation regulation, intracellular redox homeostasis or protection against spontaneous or stimulated programmed cell death.

Mammalian Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) belong to the family of small heat shock proteins (sHsps). In human, 10 different sHsps have been characterized but only few of them, as Hsp27, Hsp22 and α B-crystallin, are true heat shock proteins that display an enhanced synthesis in response

to stress. Up until now, the more studied sHsps have been mammalian Hsp27 and α B-crystallin. sHsps are characterized by low molecular masses (12–43 kDa) and a conserved C-terminal domain (the α -crystallin domain, see Fig. 1). sHsps also contain a WDPF domain in their N-terminal part and a non conserved flexible domain which constitutes the C-terminal part of the proteins. sHsps share the property to form globular oligomeric structures that are characterized, in mammalian cells, by molecular masses ranging from 50 to about 700–800 kDa. The dynamic organization of sHsps oligomers appears to be a crucial factor which controls the activity of these proteins. We still do not have a good knowledge of the structural organization of sHsps. This is mainly due to the heterogeneous size and dynamic properties of sHsps oligomers and of their ability to form hetero-complexes with other members of the sHsps family. An intriguing property of some sHsps, such as Hsp27 and α B-crystallin, concerns their ability to be phosphorylated and therefore under the control of several transduction pathways. Indeed, both proteins show rapid phosphorylation that modulates their activities in response to a wide variety of stimuli [1,2]. Both proteins have phosphorylated serine sites in the N-terminal part of the polypeptides, in the WDPF domain [2] and close to the α -crystallin domain. Hsp27 is phosphorylated at serines 15, 78 and 82 by mitogen-activated protein kinases associated protein kinases (MAPKAP kinases 2,3) which are themselves activated by phosphorylation by MAP p38 protein kinase [3,4] (see Fig. 1). As Hsp27, α B-crystallin is phosphorylated at three serine site corresponding to residues 19, 45 and 59. At least two pathways are implicated in the α B-crystallin phosphorylation: the MAPKAPK2 kinases are responsible of the phosphorylation of serine 59 while serine 45 appears under the control of p42/p44 MAPKinase. The kinase responsible of the phosphorylation of serine 19 is still not known. Hence, Hsp27 phosphorylation can be modulated by signals as diverse as those mediated by growth factors, differentiating agents, tumor necrosis factor, oxidative stress or heat shock [5,6]. In the case of α -crystallin, a recent study has shown that disorganization of microfilaments or microtubules networks results in the activation of convergent pathways to MAPK p38 [1]. At least in the case of Hsp27, phosphorylation was demonstrated to result in a decrease size of the oligomers [7].

In addition of being overexpressed in stress conditions, Hsp27 and α B-crystallin share the ability of having a tissue/cell

*Corresponding author. Fax: +33 4 72432685.

E-mail address: arrigo@univ-lyon1.fr (A.-P. Arrigo).

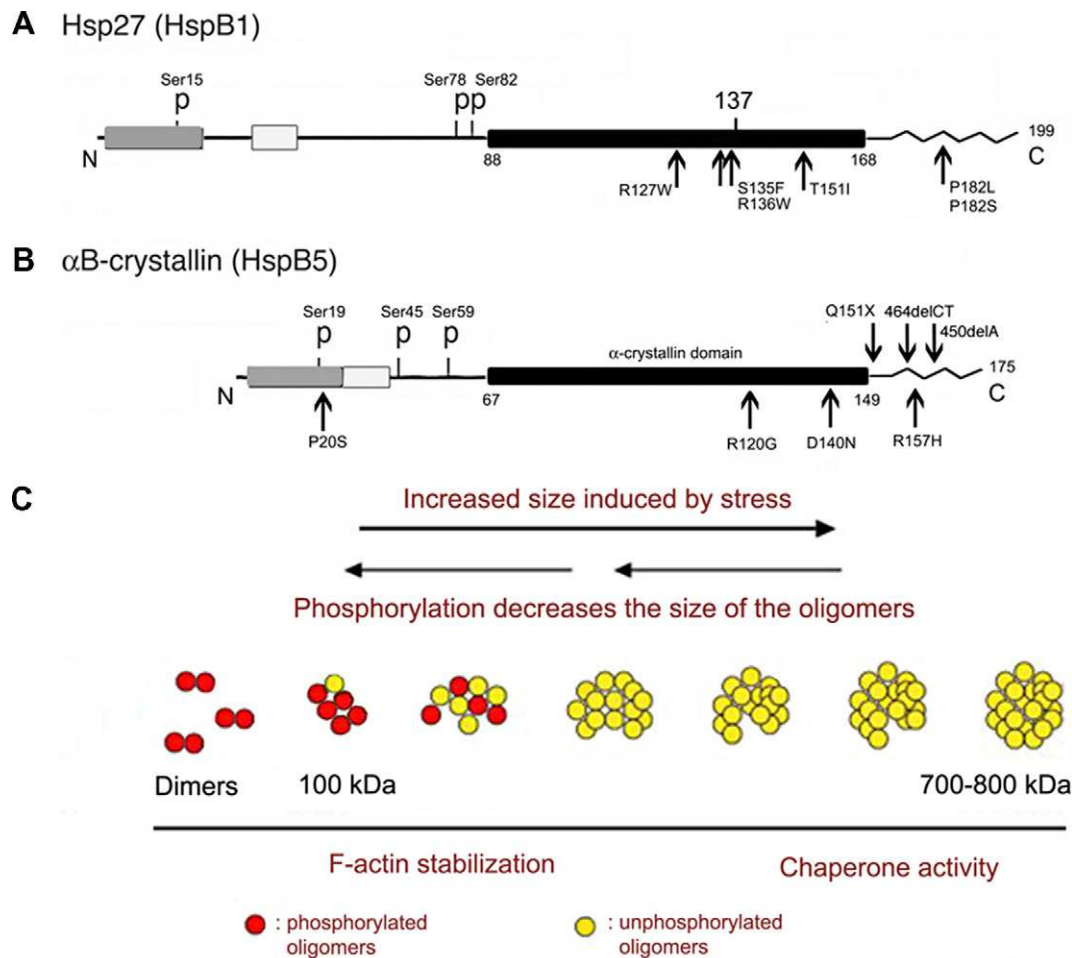


Fig. 1. Properties of human Hsp27 and α B-crystallin. (A) Organization of human Hsp27 and α B-crystallin protein sequences. Light box: conserved region; black box: alpha crystallin domain; gray box: WDPF domain; $\wedge\wedge\wedge\wedge\wedge$: flexible domain; P: phosphorylated serine residues. Amino acids are indicated. Position 137 in Hsp27 sequence corresponds to the only cysteine residue in the protein sequence. Its deletion abolishes dimer formation and knocks out Hsp27 protective activity. Positions of point mutations that are responsible of pathologies (see Table 2) are indicated by arrows. 464delCT: frame-shift mutant. The resulting mutant is modified from aa 155 and is truncated of 13 residues compared to wild type protein. 450delA: frame-shift mutant. The resulting mutant is modified from aa160 to aa184. This protein is larger than wild type polypeptide (175aa). (B) Biochemical properties of Hsp27. Stress favors the formation of large oligomers associated with unfolded polypeptides while phosphorylation does the reverse. The system is therefore in equilibrium. The formation of small oligomers may be required to bind unfolded proteins that are then stored at the level of the large oligomers. Phosphorylation may also favor the recycling of the large oligomers. Yellow circles indicate nonphosphorylated Hsp27 and red circle phosphorylated Hsp27. Large non-phosphorylated oligomers of sHsp (>300 kDa) have greater potentiality to protect the cell through their ability to display chaperone activity [6]. In contrast, small unphosphorylated oligomers of Hsp27 may act at the level of F-actin polymerization/depolymerization [32].

specific expression in the absence of stress which can be detected in the healthy adults as well as during the development of the organisms. In mammals, α B-crystallin is a major polypeptide of the eye lens where it is associated with the closely related α A-crystallin (HspB4) to form large hetero-oligomeric structures. In mice and rats, α B-crystallin is also constitutively expressed in tissues with high rates of oxidative metabolism, including, the heart, type I and type IIa skeletal muscle fibers, brain and oxidative regions of the kidney. Hsp27 tissue-specific expression resembles that of α B-crystallin. However, different levels of expression of these two proteins are often detected. The significance of the constitutive expression of these Hsps is probably linked to protection of the cells against stress or to a specific function in a particular tissue. This review summarizes the current knowledge about Hsp27 and α B-crystallin as well as the significance of the overexpression of these polypeptides in several pathological situations. Collectively, these

observations lead to the conclusion that Hsp27 and α B-crystallin are major targets for the development of future therapeutic strategies against pathologies as diverse as neurodegenerative diseases, myopathies, asthma, cataracts and cancers.

Analysis of Hsp27 and α B-crystallin oligomers has revealed that these structures are in a dynamic equilibrium. It was then shown that the high molecular weight oligomeric structures formed by Hsp27 and α B-crystallin bear an ATP-independent chaperone activity and that phosphorylation induces modifications in oligomer size and chaperone-like activity [8]. For example, in heat shock treated cells which are prone to accumulate misfolded proteins, the large unphosphorylated oligomers of Hsp27 act as tanks that store misfolded polypeptides until they are either processed for refolding by ATP-dependent chaperones (i.e. Hsp70 and co-chaperones) [9] or degraded by the proteasome [10]. Recent studies of α B-crystallin have revealed that the β 3 sequence of the α -crystallin domain (aa

Table 1
Multiple functions of α B-crystallin and/or Hsp27 and the corresponding interactions with (or functional modulation of) protein or peptide targets

Function(s)	Targets
Lens transparency and protection	α A-crystallin and other crystallin proteins
Heart protection	Titin, Hsp20
Cytoskeletal architecture and protection	F-actin Intermediate filament proteins (desmin, vimentin, GFAP, neurofilaments, filensin, phakinin, lamin) Microtubules and microtubule-associated proteins
Apoptosis resistance	Pro-caspase 3, cytochrome <i>c</i> , Smac/Diablo, Akt, DAXX, STAT3, Bcl-xs, Bax, P53
Ubiquitin–proteasome system	Fbx4, C8/ α 7 subunit of 20S proteasome, eIF4F and eIF4G complex, ubiquitin
Cell cycle regulation	Cyclin D1, p27kip1, P53
Redox homeostasis	Glutathione, G6PDH
Protein intracellular transport	Microtubule, SMN, neurofilaments
Stress signalling pathway	P38 cascade, I Kappa B kinase
Hormone signalling pathway	ERb (Estrogen cascade), hGMEB1 (glucocorticoid hormones cascade)
Unknown nuclear function(s)	SMN, SC35
Unknown cytosolic function(s)	α B-crystallin, Hsp20, Hsp22, Hsp27
Pathological-related misfolded proteins	Desmin, GFAP, neurofilaments, ZASP, filamin C, myotiline, parkin, α -synuclein, prion protein, tau, β -amyloid, huntingtin, serpin, SOD, P150 dynactin, α A-crystallin, α B-crystallin, Hsp20, Hsp22, Hsp27
Virus	NS5A protein from Hepatitis C
Immune response	CD10, β 2-microbulin
Unknown function in Sertoli cells	PASS 1
Golgi architecture	GM130

GFAP, glial fibrillary acidic protein; DAXX, death domain-associated protein 6; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; Fbx4, F-box only protein 4; eIF4F, eukaryotic translation initiation factor 4F; eIF4G, eukaryotic translation initiation factor 4G; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; SMN, survival motor neuron protein; SOD, superoxide dismutase; ER, estrogen receptor; SC35, splicing factor; hGMEB1, human glucocorticoid modulatory element-binding protein 1; NS5A, non-structural protein 5A; ZASP, LIM domain-binding protein 3; PASS 1, protein associated with small stress protein 1. GM130, golgi matrix-protein 130.

73–85) [11] may represent the interacting site with unfolded polypeptide targets and the β 3– β 8– β 9 surface of the alpha crystallin core domain may be an interface for complex assembly and chaperone activity [12]. Moreover, the N- and C-termini of human α B-crystallin appear important for the recognition, selection, and solubility of substrate proteins [13]. Hsp27 and α B-crystallin also share the ability to participate in the so-called “protein triage” that occurs in cells recovering from stress or committed to differentiate. Indeed, Hsp27 and α B-crystallin modulate the ubiquitin–proteasome pathway [14,15] (see Table 1) and are essential for proper disassembly–assembly of protein complexes to prevent undesirable interactions and aggregation [16,17]. In this respect, the lack of Hsp27 expression during early differentiation induces aberrant cell differentiation [16] or massive apoptosis [18–20]. Moreover, tissue-specific hetero-oligomeric structures of sHsps have been described [16] suggesting structurally independent sHsps chaperone complexes with distinct molecular targets [21]. Hence, these observations favor the hypothesis that highly modulable sHsp structural networks exist in the cell that rapidly react to cope with tissue-specific stress- or differentiation-induced protein damages and/or protein complexes reorganization.

An intriguing function of Hsp27 and α B-crystallin is the ability to increase the resistance of cells to oxidative injuries [22]. The phenomenon is not restricted to cell cultures and has been observed in whole animals [23]. Hsp27 and α B-crystallin expression correlates with decreased levels of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO \cdot) [6,24–26]. Consequently, in cells exposed to oxidative challenges, sHsps expression reduces lipid peroxidation, protein oxidation and F-actin architecture disruption [24–27]. These Hsps also uphold the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ m) level [24,28]; a phenomenon which provides the stressed cells with abundant ATP production that favors the activity of chaperones. The antiox-

idant activity of Hsp27 and α B-crystallin was found to depend on reduced glutathione [25]. The phenomenon probably depends on the upregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) [23,24] (Table 1), the key enzyme that provides the reducing power of the cell by reducing NADP $^{+}$ in NaDPH(H) $^{+}$. In addition, recent results have shown that Hsp27 [29,30] or α B-crystallin (our unpublished information) expression decreases iron intracellular levels; a phenomenon which subsequently interferes with the formation, through iron-dependent Fenton reaction, of the potent macromolecules oxidizing hydroxyl radical (OH $^{\circ}$) [26]. As in the case of cells exposed to heat shock, the active form of Hsp27 appears associated with the large unphosphorylated oligomers of the protein [6,31].

Other functions have been assigned to Hsp27 and α B-crystallin that depend on the structural organization of these polypeptides. One example is the control of F-actin cytoskeletal integrity mediated by the small oligomers of Hsp27 [32,33]. This activity plays a crucial role in cells exposed to heat shock or oxidative stress because of the well-known ability of these stress to collapse F-actin cytoskeleton. Hsp27 was also found to regulate neutrophil chemotaxis and exocytosis through actin reorganization [34,35]. Moreover, a decrease in the level of expression of Hsp27 impairs growth and cytoskeletal organization [36]. These observations confirm that these polypeptides are major regulators of actin polymerization-depolymerization process. Moreover, Hsp27 and α B-crystallin also appear to bind and stabilize microtubules [1,37–39]. Taken together with the fact that α B-crystallin is a well known stabilizer of intermediate filaments [40,41], these observations enlighten the major role played by these Hsps in cytoskeletal architecture homeostasis.

Increased cellular resistance to several pro-apoptotic agents or conditions is observed in cells expressing high loads of Hsp27 [42–44]. On the opposite, inhibition of Hsp27 expression

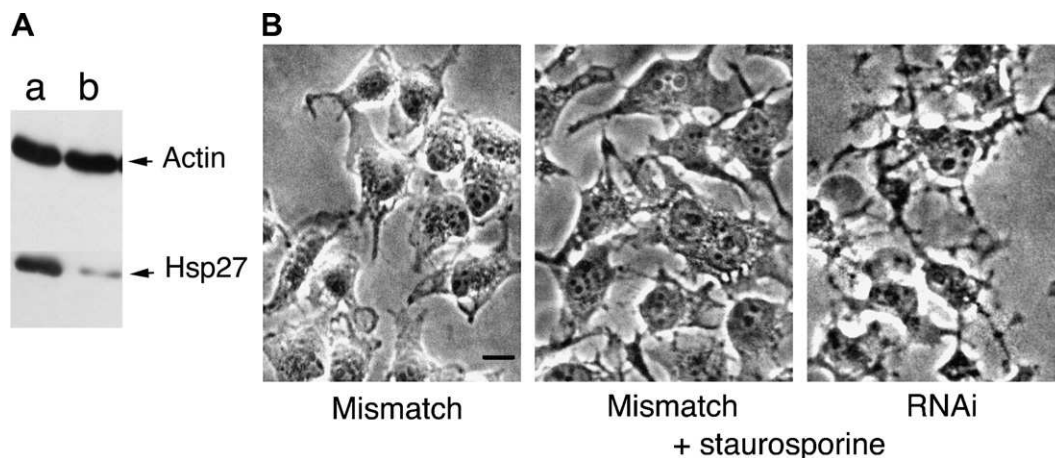


Fig. 2. Anti-apoptotic protective activity of constitutively expressed Hsp27 in HeLa cells. HeLa cells are human cancerous cells of the cervix that constitutively express high levels of Hsp27. These cells were transiently transfected with DNA vectors encoding either mismatch RNA (a) or RNAi Hsp27 sequences (b) (according to [104]). Two days after transfection, cells were either kept untreated or treated for 4 h with 0.2 μ M of the kinase inhibitor and apoptosis inducer staurosporine. Hsp27 immunoblots (A) and phase contrast pictures (B) are presented. Note the drastic increase in cell death morphology induced by Hsp27 withdrawal. This leads to the conclusion that Hsp27 enhances the deleterious apoptotic resistance of these cancer cells. Bar: 15 μ m.

sensitizes cells to apoptosis [45–48] (see Fig. 2). These phenomena result of the interaction of Hsp27 with several crucial apoptotic factors (see Table 1). For example, towards the intrinsic apoptotic pathway, Hsp27 acts upstream of mitochondria towards the signals that trigger the release of cytochrome *c* [45] or Smac/DIABLO [49] from mitochondria. In this respect, the ability of Hsp27 to protect F-actin network integrity [45] may play a crucial role. Hsp27 also acts down-stream of mitochondria at the level of cytochrome *c* and apoptosome [50]. The third site of action of this protein is at the level of pro-caspase 3 activation [51]. At the level of the Fas receptor pathway, Hsp27 was described to negatively interfere through an interaction with DAXX [52]. Hsp27 also binds and inhibits cellular factors involved in oncogenic signaling pathways, such as signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) [53]. This transcription factor is constitutively active in most tumors and controls the expression of key genes involved in cell transformation or apoptosis inhibition, such as those encoding Bcl-xL and survivin. An other important factor modulated by Hsp27 is Akt [54]. In vivo, Hsp27 anti-apoptotic property has been demonstrated [55,56]. Moreover, the transient expression of Hsp27 during cell differentiation is also related to a protection against apoptosis [18,43,57]. Concerning the structural organization of Hsp27 in cells exposed to apoptotic stimuli, the major information available today is that the large oligomers of Hsp27 inhibit in vitro caspase activation [58], hence suggesting a link with the chaperone activity of the protein.

Concerning α B-crystallin, its overexpression confers protection against a large panel of apoptotic stimuli while its silencing sensitizes cells to apoptosis [20,42,59,60]. Moreover, α B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation [20]. Several steps in the apoptotic pathway are modulated by α B-crystallin. This protein has been shown to bind pro-apoptotic Bax, Bcl-x_S and P53 polypeptides (see Table 1) and to prevent their translocation to the mitochondria [61,62]. Downstream of mitochondria, α B-crystallin counteracts the activation of pro-caspase-3. Interestingly, phosphory-

lation of α B-crystallin at the level of serine 59 appears sufficient to provide maximal protection of cardiomyocytes against apoptosis [63].

2. Protein conformation and inflammation related diseases

In vivo, Hsp27 and α B-crystallin are abundantly produced in response to various types of stress in cardiac and skeletal muscles as well as in the brain. This suggests that, in these organs, these sHsps act as molecular chaperones suppressing the aggregation of specific client polypeptides. For example, transgenic mice overexpressing Hsp27 are strongly protected against myocardial infarction and cerebral ischemia [56,64]. Moreover, α B-crystallin and Hsp27 are often upregulated and accumulate into inclusion bodies in many protein conformation diseases. For instance, α B-crystallin and/or Hsp27 accumulate in Rosenthal fibers of Alexander disease, cortical Lewy bodies, Alzheimer disease plaques, neurofibrillary tangles as well as in synuclein deposit associated to Parkinson disease or myopathy-associated inclusion body [65]. The exact reason for the frequent association of Hsp27 and/or α B-crystallin with these structures is probably linked to the chaperone activity of these sHsps. Indeed, molecular chaperones are known to provide a first line of defence against misfolded, aggregation-prone proteins probably because of their ability to modulate the earliest aberrant protein interactions that trigger pathogenic cascades. For example, it has been reported that sHsps protect against alpha-synuclein [66], huntingtin [26,67,68], amyloid and desmin mutants induced aggregation and/or toxicity.

Other studies have reported that α B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease and a high prevalence of anti-alpha-crystallin antibodies has been described in multiple sclerosis which correlates with severity and activity of the disease. Upregulation of Hsp27 has also been observed in a transgenic model of ALS. The importance of Hsp27 in neuropathologies was further confirmed by the discovery of

Table 2
Mutations in α B-crystallin and Hsp27 and the corresponding pathologies

sHsps	Mutations	Associated pathologies	Ref.
α B-crystallin	R120G	Myofibrillar myopathy, cardiomyopathy, cataract	(1)
	Q151X	Myofibrillar myopathy	(2)
	464delCT	Myofibrillar myopathy	(2)
	R157H	Cardiomyopathy	(3)
	P20S	Cataract	(4)
	D140N	Cataract	(5)
	450delA	Cataract	(6)
Hsp27	R127W	Distal hereditary motor neuropathy	(7)
		Charcot-Marie-Tooth type 2F	(9)
	S135F	Distal hereditary motor neuropathy Charcot-Marie-Tooth type 2F	(7)
	R136W	Charcot-Marie-Tooth type 2F	(7)
	T151I	Distal hereditary motor neuropathy	(7)
	P182L	Distal hereditary motor neuropathy	(7)
	P182S	Distal hereditary motor neuropathy	(10)

Refs: (1) [71]. (2) [72]. (3) [78]. (4) [77] (5) Berry, V. et al. (2001) *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1141–5. (6) Liu, Y. et al. (2006) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1069–1075. (7) Evgrafov, O.V. et al. (2004) *Nat. Genet.* 36, 602–606. (8) Tang, B. et al. (2005) *Arch. Neurol.* 62, 1201–1207. (9) Liu, X.M. et al. (2005) *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 22, 510–513. (10) Kijima, K., Numakura, C., Goto, T., Takahashi, T., Otogiri, T., Umetsu, K. and Hayasaka, K. (2005) *J. Hum. Genet.* 50, 473–476.

human mutations in the Hsp27 encoding gene in families associated with inherited peripheral neuropathies [69] and axonal Charcot-Marie-Tooth disease [70] (see Table 2). These motor neuropathies are caused by premature axonal loss, neuronal death and subsequent degeneration. Moreover, the mutations are associated with a decreased ability of Hsp27 to promote neuronal survival compared to the wild type protein. Taken together, these studies suggest that, in animal models of human diseases, Hsp27 and α B-crystallin are potent suppressors of neurodegeneration.

Other protein conformation diseases associated to Hsp27 and/or α B-crystallin expression are myopathies and alcoholic liver diseases characterized by the presence of Mallory bodies. Concerning the myopathies, recent studies have revealed the importance of α B-crystallin towards desmin network (see Table 2). Indeed, one major target of the chaperone activity associated to α B-crystallin appears to be type III intermediate filaments [40,41]. The discovery in 1998 of a missense mutation in α B-crystallin gene, changing arginine 120 to glycine (R120G), responsive of a myofibrillar myopathy associated with cardiomyopathy and cataract [71], confirmed the importance of α B-crystallin in these diseases. Recently, two novel mutations leading to myofibrillar myopathies (Q151X and 464delCT) have been identified in the terminal part of the α B-crystallin coding sequence [72]. At the exception of the report describing the identification of these new mutants, the published studies on α B-crystallinopathies concern the R120G mutant. It is now accepted that α B-crystallinopathies result from the misfolding and progressive aggregation of mutated α B-crystallin to which subsequently associate desmin filaments to form α B-crystallin/desmin/amyloid positive aggregates [73,74]. These aggregates can by themselves be toxic, inhibiting the ubiquitin–proteasomal system of protein degradation [75] and causing deficits in mitochondrial function [76]. α B-crystallinopathies are a special case of protein conformation disease in which the destabilizing mutations at the origin of the disorder occurs in a molecular chaperone which is itself potentially involved in the protein quality control of the cell. Three mutations in α B-crystallin gene (P20S, 464delCT and D140N) are also responsive for dominant

cataract [77] and two mutations (R157H and G154S) for cardiomyopathy [78]. At the biochemical level, mutations in α B-crystallin have been found to modify the properties of α B-crystallin such as its oligomerization and in vitro chaperone-like activity [79] and to increase its affinity to desmin [80]. Moreover, the ability of α B-crystallin to interact with members of the apoptotic cascade, cytoskeletal polypeptides or with the other sHsps may also be modified.

Hsp27 and α B-crystallin are also involved in inflammation diseases. For example, these proteins interferes with TNF α signaling pathway through their ability to protect against oxidative stress [81] and through modulation of TAK-1 activity [82]. An other example is given by the absence of colonic inflammation seen in the majority of individuals infected with the parasite *Entamoeba histolytica* which is related to the ability of Hsp27 to suppress NF- κ B activation through an interaction with IKK- α and IKK- β [83]. Moreover, recent reports have shown that Hsp27 is needed for the activation by interleukin (IL)-1 of TAK1 and downstream signalling by p38 MAPK, JNK and their activators (MKK-3, -4, -6, -7) and IKK β [82]. These observations suggest crucial roles of Hsp27 and α B-crystallin in the control of inflammatory processes. Among pathologies where the anti-oxidative potential of Hsp27 is crucial, one can cite airway inflammation associated with asthma which is characterized by the damage of the bronchial epithelium. In this respect, we have observed that an increased Hsp27 expression in the epithelium of asthmatic subjects generates a protection against the oxidative stress induced by the chronic inflammatory state of this tissue (see Fig. 3) [84].

3. Cancer

High levels of Hsp27 constitutive expression have been detected in several cancer cells, particularly those of carcinoma origin [85,86]. Recently, the number of reports dealing with Hsp27 in cancer pathologies has grown exponentially. In addition to its presence in breast, ovary and colon cancers, Hsp27 has recently been detected in liver, kidney, lung (non-small

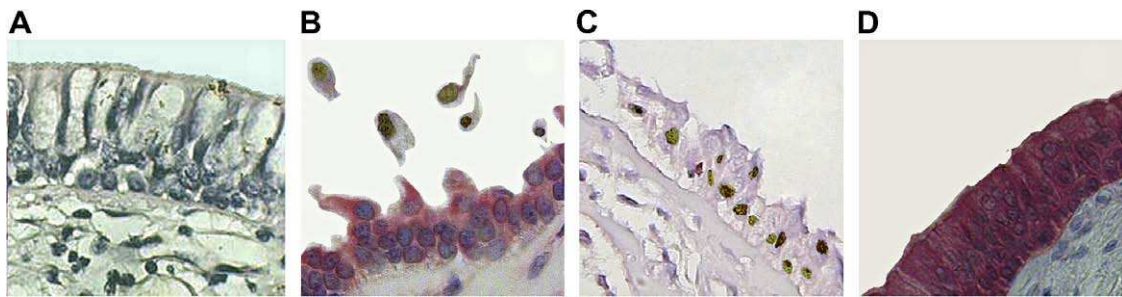


Fig. 3. Beneficial protective effect of Hsp27 expression in bronchial epithelial cells from asthmatic patients. Hsp27 expression and TUNEL immunoreactivity in bronchial epithelial cells of a normal (A) subject and an asthmatic (B–D) patient. Cells that express Hsp27 show a red immunostaining as the result of the Hsp27 immunoreactivity. TUNEL-positive cells are characterized by a brown staining of the nuclei. (A) Area of intact epithelium of a bronchial biopsy taken from a normal subject showing no immunoreactivity for Hsp27 and for TUNEL. (B) Area of damaged epithelium of a bronchial biopsy taken from an asthmatic subject with desquamated epithelial cells which are not immunoreactive for Hsp27 but show a positivity for the TUNEL technique. (C) Wide area of fragile epithelium not immunoreactive for Hsp27 showing a nuclear TUNEL staining of many bronchial epithelial cells. (D) Area of intact epithelium showing a strong immunostaining for Hsp27, and a complete lack of nuclear staining due to the TUNEL technique. These observations support the beneficial role of Hsp27 in asthma. Indeed, desquamative cells are apoptotic and devoid of Hsp27 while cells that express Hsp27 are not apoptotic and do not desquamate. See [84] for further informations.

cells) and prostate cancers. Moreover, experimental approaches performed in rodents have enlightened the tumorigenic potential of Hsp27 expression [87]. Hence, Hsp27 is supposed to increase the ability of some cancer cells to resist to and evade from the apoptotic processes mediated by the immune system. The large oligomers which bear the chaperone-like activity are also responsible for the tumorigenic activity of Hsp27 [58]. Concerning this issue, it cannot be excluded that Hsp27 large oligomers may act as Hsp90 and bind specific client proteins that participate in the tumorigenic and metastatic processes.

α B-Crystallin constitutive expression has been detected in gliomas, prostate cancer, oral squamous cell carcinomas, renal cell carcinomas, head and neck cancer. A normal high level of α B-crystallin has also been detected in basal-like breast carcinomas and preinvasive ductal carcinoma that correlated with poor clinical outcome of the patients. Recently, a pathological role of α B-crystallin has again been reported in breast cancer diseases, hence suggesting that this protein acts as an oncoprotein [88]. Neoplastic changes and invasive properties of breast cells are inhibited by phosphorylation of α B-crystallin [89]. Indeed, serine 59 phosphorylation reduces the oligomerization and anti-apoptotic activities of α B-crystallin [90,91]. It can therefore be concluded that, as for Hsp27, the large oligomers of α B-crystallin may contribute to the aggressive behavior of cancer cells. However, the differential expression of α B-crystallin and Hsp27 reported in anaplastic thyroid carcinomas and in brain cancer suggests different involvement of these sHsps in these pathologies [92,93].

The expression of Hsp27 and α B-crystallin is also associated to other problems in cancer biology. First, high levels of Hsp27 are observed in metastatic tissues compared to non metastatic tissues suggesting that this protein plays a key role in metastasis formation [94]. α B-crystallin expression is correlated with lymph node involvement in breast carcinomas resulting in a shorter survival. Second, Hsp27 and α B-crystallin expression is associated with cellular resistance to cytostatic anticancerous drugs used in the clinic [95,96]. In addition, some of these drugs, particularly cisplatin [97], vincristine and colchicine [98] enhance Hsp27 and/or α B-crystallin expression. Collectively, these phenomena impair the efficiency of the clinical treatments using chemotherapeutic agents.

4. Hsp27 and α B-crystallin as therapeutic targets?

Hsp27 and α B-crystallin are potent protective factors of cells in which the disease-causing proteins are prone to aggregate and form large inclusions. In spite of the presence of Hsp27 and/or α B-crystallin, these diseases usually result in excessive cell death (Fig. 4). One therapeutic option could be the enhanced expression of the corresponding wild type protein. Unfortunately, such an approach is not feasible nowadays. Similarly, this approach can not be used to treat pathologies caused by Hsps mutations. Another approach to the development of therapeutic intervention for these diseases has been to identify chemical compounds that reduce the size or number of inclusions. However, recent results suggest that inclusion formation may in fact be beneficial to the cell to get rid of the mutated protein through autophagy [99]. However, inclusion formation or aggregation of metal-binding proteins (such as α -synuclein, Alzheimer β -amyloid peptide, PrP106-126 prion or polyQ mutants of Huntingtin) is a risky process since it can generate deleterious oxidative stress [67,100]. Hence, using available cellular models, studies will have to be performed to identify compounds that promote oxidative stress free inclusion formation as a therapeutic approach for neurodegenerative diseases caused by protein misfolding [101]. These studies will have to test whether compounds (still to be discovered, such as RNA/peptide aptamers or chemical chaperones, see below) that modulate Hsp27 and/or α B-crystallin functions are active towards the deleterious damages induced by these diseases.

In the myopathy and cataract research field, it is reasonable to assume that prevention of the formation of aggregates induced by α B-crystallin myopathy- and cataract-associated mutants may be an efficient strategy to inhibit the development of the disease (Fig. 4). For example, it is well known that the cessation of the expression of α B-crystallin R120G mutant in symptomatic mice improved cardiac function and rescued these animals from premature death [73]. Towards these pathologies, specific peptide/RNA aptamers or chemical chaperones that interfere with the mechanism leading to the aggregation of the mutated α B-crystallin but not with the wild type protein functionality should be researched and tested. A similar approach can be proposed towards the pathologies induced by mutations of Hsp27.

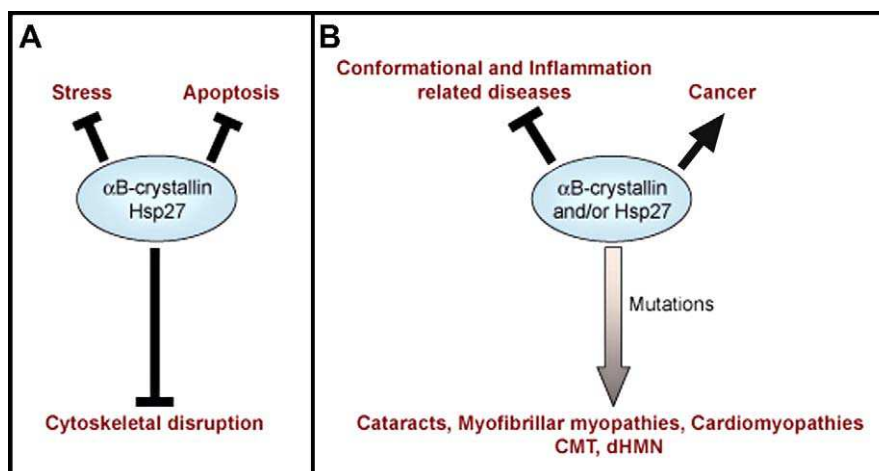


Fig. 4. Role of Hsp27 and α B-crystallin in normal and pathological cells. (A) In normal cells, Hsp27 and/or α B-crystallin participate in cytoskeleton, redox state and protein folding homeostasis. These proteins are also involved in the protection of cells in case of stress. In this respect, these sHsps interfere with spontaneous or induced apoptosis. (B) In pathological cells, Hsp27 and/or α B-crystallin have beneficial effects towards protein conformation and inflammation related diseases. In contrast, these proteins can have pernicious effects through their ability to protect cancer cells against the immune system- or drug-mediated death. Mutations in Hsp27 and/or α B-crystallin are responsive of the development of pathologies such as, cataracts, myofibrillar myopathies, cardiomyopathies, Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease and motor-neuronal neuropathies, such as Distal Hereditary motor neuropathy (dHMN).

Towards inflammation and asthma, compounds that stimulate the anti-oxidative activity of Hsp27 and α B-crystallin should be actively researched. Once again specific peptides or RNA aptamers or drugs that maintain these proteins in the form of large oligomers may stimulate their chaperone and anti-oxidative properties.

In the cancer field, Hsp27 and α B-crystallin have negative activities and should be either eliminated or their activity impaired (Fig. 4). Indeed, up until today, no report has described a positive role of these proteins in cancer cells, such as better tumor antigen-recognition at the cell surface as already shown in the case of Hsp70 [102,103]. Hence, experiments have been performed using anti-sense or nucleotide-based therapies with aim to inhibit Hsp27 and α B-crystallin expression. This approach sensitizes cancer cells to apoptotic inducers [45] and anticancer drugs and reduces the tumorigenic potential of bladder and prostate cancer cells [46,48]. The decrease in tumors aggressivity mediated by second generation of RNAi molecules, such as OGX 437 (Oncogenex Inc.), appears to be linked to loss of the anti-apoptotic protection mediated by Hsp27 [48]. Moreover, the degradation of putative and still unknown tumorigenic and/or metastatic client proteins that may bind Hsp27 should also be considered. As mentioned above, peptide/RNA aptamers or chemical chaperones that bind specific structural organizations of Hsp27 or α B-crystallin could be an alternative approach to reduce the tumorigenic and metastatic activities of these proteins. Similarly aptamers or drugs that modulate the anti-oxidant potential of these proteins (see above) may prove useful to block Hsp27 ability to counteract the killing efficiency of redox state dependent anti-cancer therapeutic drugs, such as 17AAG, or physical challenges such as X-rays irradiation.

5. Conclusions and perspectives

The number of reports that describe the importance of Hsp27 and α B-crystallin in pathologies is increasing exponen-

tially and the need of drugs that modulate the activity of these chaperones is rising fast. The discovery of drugs will be a challenge since the tri-dimensional structures of human Hsp27 and α B-crystallin is still not known because of the difficulty to obtain stable crystals of these oligomeric proteins for X-ray analysis. In spite of these considerations, an astonishing array of strategies to either stimulate the beneficial properties or to affect the pathological roles played by these proteins is fast emerging. For example, the discovery of specific peptides that recognize the oligomeric forms of Hsp27 or α B-crystallin may prove useful to determine the structure of peptido-mimetic compounds leading to the emergence of chemical drugs designated to modulate specific activities of Hsp27 and α B-crystallin and/or which can correct and mask specific mutations in these chaperones. Hence, it is likely that in a near future drugs will be available for clinical trials. In addition, the intense work which is actually performed towards the eight other members of the human small stress family of proteins and the fact that most sHsps interact with each other and form homo- and hetero-oligomeric complexes may lead to the emergence of other interesting therapeutic targets and strategies.

Acknowledgements: Apologies to all those whose work has not been cited due to lack of space and references number limitation. Research in the authors laboratory was supported by the Région Rhône-Alpes (Contract Cible 06 to A.P.A.), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the French Minister of Research, the Association Française contre les Myopathies (AFM Grants #11764 to P.V. and #12594 to A.P.A.) as well as Lyon 1 and Paris 7 Universities. Benjamin Gibert is supported by a doctoral fellowship of the Région Rhône-Alpes (Cible 06). Stéphanie Simon is supported by an AFM post-doctoral fellowship.

References

- [1] Launay, N., Goudeau, B., Kato, K., Vicart, P. and Lilienbaum, A. (2006) Cell signaling pathways to alphaB-crystallin following stresses of the cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 312, 3570–3584.
- [2] Theriault, J.R., Lambert, H., Chavez-Zobel, A.T., Charest, G., Lavigne, P. and Landry, J. (2004) Essential role of the

- NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J. Biol. Chem.* 279, 23463–23471, Epub 2004 Mar 21.
- [3] Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D., Cohen, P. and Gaestel, M. (1992) Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* 313, 307–313.
- [4] Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T. and Nebreda, A.R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027–1037.
- [5] Arrigo, A.P. (1998) Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol. Chem.* 379, 19–26.
- [6] Rogalla, T. et al. (1999) Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 18947–18956.
- [7] Kato, K., Hasegawa, K., Goto, S. and Inaguma, Y. (1994) Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J. Biol. Chem.* 269, 11274–11278.
- [8] Jakob, U., Gaestel, M., Engels, K. and Buchner, J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 268, 1517–1520.
- [9] Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M. and Buchner, J. (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16, 221–229.
- [10] McDonough, H. and Patterson, C. (2003) CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* 8, 303–308.
- [11] Ghosh, J.G., Estrada, M.R., Houck, S.A. and Clark, J.I. (2006) The function of the beta3 interactive domain in the small heat shock protein and molecular chaperone, human alphaB crystallin. *Cell Stress Chaperones* 11, 187–197.
- [12] Ghosh, J.G., Estrada, M.R. and Clark, J.I. (2006) Structure-based analysis of the beta8 interactive sequence of human alphaB crystallin. *Biochemistry* 45, 9878–9886.
- [13] Ghosh, J.G., Shenoy Jr., A.K. and Clark, J.I. (2006) N- and C-Terminal motifs in human alphaB crystallin play an important role in the recognition, selection, and solubilization of substrates. *Biochemistry* 45, 13847–13854.
- [14] Parcellier, A. et al. (2003) HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol. Cell Biol.* 23, 5790–5802.
- [15] Lin, D.I. et al. (2006) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4-alphaB crystallin) complex. *Mol. Cell.* 24, 355–366.
- [16] Duverger, O., Paslaru, L. and Morange, M. (2004) HSP25 is involved in two steps of the differentiation of PAM212 keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 10252–10260.
- [17] Arrigo, A.P. (2005) In search of the molecular mechanism by which small stress proteins counteract apoptosis during cellular differentiation. *J. Cell. Biochem.* 94, 241–246.
- [18] Mehlen, P., Mehlen, A., Godet, J. and Arrigo, A.-P. (1997) hsp27 as a switch between differentiation and apoptosis in murine embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 272, 31657–31665.
- [19] Mehlen, P., Coronas, V., Ljubic-Thibal, V., Ducasse, C., Granger, L., Jourdan, F. and Arrigo, A.P. (1999) Small stress protein Hsp27 accumulation during dopamine-mediated differentiation of rat olfactory neurons counteracts apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 227–233.
- [20] Kamradt, M.C., Chen, F., Sam, S. and Cryns, V.L. (2002) The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* 277, 38731–38736, Epub 2002 Jul 24.
- [21] Sugiyama, Y. et al. (2000) Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 275, 1095–1104.
- [22] Arrigo, A.P. (2001) Hsp27: novel regulator of intracellular redox state. *IUBMB Life* 52, 303–307.
- [23] Yan, L.J., Christians, E.S., Liu, L., Xiao, X., Sohal, R.S. and Benjamin, I.J. (2002) Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. *Embo J.* 21, 5164–5172.
- [24] Preville, 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. *Exp. Cell Res.* 247, 61–78.
- [25] Mehlen, P., Prévile, X., Kretz-Remy, C. and Arrigo, A.-P. (1996) Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these protein against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J.* 15, 2695–2706.
- [26] Firdaus, W.J., Wyttenbach, A., Diaz-Latoud, C., Currie, R.W. and Arrigo, A.P. (2006) Analysis of oxidative events induced by expanded polyglutamine huntingtin exon 1 that are differentially restored by expression of heat shock proteins or treatment with an antioxidant. *FEBS J.* 273, 3076–3093.
- [27] Prévile, X., Gaestel, M. and Arrigo, A.P. (1998) Phosphorylation is not essential for protection of L929 cells by Hsp25 against H₂O₂-mediated disruption actin cytoskeleton, a protection which appears related to the redox change mediated by Hsp25. *Cell Stress Chaperones* 3, 177–187.
- [28] Paul, C. and Arrigo, A.P. (2000) Comparison of the protective activities generated by two survival proteins: Bcl-2 and Hsp27 in L929 murine fibroblasts exposed to menadione or staurosporine. *Exp. Gerontol.* 35, 757–766.
- [29] Arrigo, A.P., Viro, S., Chaufour, S., Firdaus, W., Kretz-Remy, C. and Diaz-Latoud, C. (2005) Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid. Redox Signal* 7, 414–422.
- [30] Chen, H., Zheng, C., Zhang, Y., Chang, Y.Z., Qian, Z.M. and Shen, X. (2006) Heat shock protein 27 downregulates the transferrin receptor 1-mediated iron uptake. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1402–1416, Epub 2006 Mar 7.
- [31] Mehlen, P., Hickey, E., Weber, L. and Arrigo, A.-P. (1997) Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 187–192.
- [32] Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J. and Lutsch, G. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* 269, 20780–20784.
- [33] Mounier, N. and Arrigo, A.P. (2002) Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 7, 167–176.
- [34] Jog, N.R., Jala, V.R., Ward, R.A., Rane, M.J., Haribabu, B. and McLeish, K.R. (2007) Heat shock protein 27 regulates neutrophil chemotaxis and exocytosis through two independent mechanisms. *J. Immunol.* 178, 2421–2428.
- [35] Singh, B.N., Rao, K.S., Ramakrishna, T., Rangaraj, N. and Rao, Ch.M. (2007) Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. *J. Mol. Biol.* 366, 756–767.
- [36] Mairesse, N., Horman, S., Mosselmann, R. and Galand, P. (1996) Antisense inhibition of the 27 kDa heat shock protein production affects growth rate and cytoskeletal organization in MCF-7 cells. *Cell Biol. Int.* 20, 205–212.
- [37] Prévile, X., Mehlen, P., Fabre-Jonca, N., Chaufour, S., Kretz-Remy, C., Michel, M.R. and Arrigo, A.-P. (1996) Biochemical and immunofluorescence analysis of the constitutively expressed hsp27 stress protein in monkey CV-1 cells. *J. Biosci.* 21, 1–14.
- [38] Hino, M., Kurogi, K., Okubo, M.A., Murata-Hori, M. and Hosoya, H. (2000) Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 164–169.
- [39] Xi, J.H., Bai, F., McGaha, R. and Andley, U.P. (2006) Alpha-crystallin expression affects microtubule assembly and prevents their aggregation. *Faseb J.* 20, 846–857.

- [40] Bennardini, F., Wrzosek, A. and Chiesi, M. (1992) Alpha B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments. *Circ. Res.* 71, 288–294.
- [41] Djabali, K., de Nechaud, B., Landon, F. and Portier, M.M. (1997) AlphaB-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J. Cell Sci.* 110, 2759–2769.
- [42] Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K. and Arrigo, A.P. (1996) Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 271, 16510–16514.
- [43] Arrigo, A.P. (2000) sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity. *Pathol. Biol. (Paris)* 48, 280–288.
- [44] Concannon, C.G., Gorman, A.M. and Samali, A. (2003) On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8, 61–70.
- [45] Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viroit, S. and Arrigo, A.P. (2002) Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol. Cell Biol.* 22, 816–834.
- [46] Rocchi, P., Jugpal, P., So, A., Sinneman, S., Ettinger, S., Fazli, L., Nelson, C. and Gleave, M. (2006) Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation in vitro. *BJU Int.* 28, 28.
- [47] Bausero, M.A. et al. (2006) Silencing the hsp25 gene eliminates migration capability of the highly metastatic murine 4T1 breast adenocarcinoma cell. *Tumour Biol.* 27, 17–26, Epub 2005 Dec 8.
- [48] Kamada, M., So, A., Muramaki, M., Rocchi, P., Beraldi, E. and Gleave, M. (2007) Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 6, 299–308, Epub 2007 Jan 11.
- [49] Chauhan, D. et al. (2003) Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 102, 3379–3386, Epub 2003 Jul 10.
- [50] Bruey, J.M. et al. (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* 2, 645–652.
- [51] Pandey, P. et al. (2000) Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19, 1975–1981.
- [52] Charette, S.J., Lavoie, J.N., Lambert, H. and Landry, J. (2000) Inhibition of daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol. Cell Biol.* 20, 7602–7612.
- [53] Song, H., Ethier, S.P., Dziubinski, M.L. and Lin, J. (2004) Stat3 modulates heat shock 27kDa protein expression in breast epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 143–150.
- [54] Rane, M.J. et al. (2003) Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating akt activation. *J. Biol. Chem.* 278, 27828–27835.
- [55] Brar, B.K., Stephanou, A., Wagstaff, M.J., Coffin, R.S., Marber, M.S., Engelmann, G. and Latchman, D.S. (1999) Heat shock proteins delivered with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or hypoxic stress. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31, 135–146.
- [56] Latchman, D.S. (2005) HSP27 and cell survival in neurones. *Int. J. Hyperthermia.* 21, 393–402.
- [57] Arrigo, A.-P. (1995) Expression of stress genes during development. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 21, 488–491.
- [58] Bruey, J.M., Paul, C., Fromentin, A., Hilpert, S., Arrigo, A.P., Solary, E. and Garrido, C. (2000) Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene* 19, 4855–4863.
- [59] Kamradt, M.C., Chen, F. and Cryns, V.L. (2001) The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J. Biol. Chem.* 276, 16059–16063, Epub 2001 Mar 23.
- [60] Kamradt, M.C. et al. (2005) The small heat shock protein alpha B-crystallin is a novel inhibitor of TRAIL-induced apoptosis that suppresses the activation of caspase-3. *J. Biol. Chem.* 280, 11059–11066, Epub 2005 Jan 14.
- [61] Mao, Y.W., Liu, J.P., Xiang, H. and Li, D.W. (2004) Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 11, 512–526.
- [62] Liu, S., Li, J., Tao, Y. and Xiao, X. (2007) Small heat shock protein alphaB-crystallin binds to p53 to sequester its translocation to mitochondria during hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 109–114.
- [63] Morrison, L.E., Hoover, H.E., Thuerauf, D.J. and Glembotski, C.C. (2003) Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis. *Circ. Res.* 92, 203–211.
- [64] Efthymiou, C.A., Mocanu, M.M., de Bellerocche, J., Wells, D.J., Latchmann, D.S. and Yellon, D.M. (2004) Heat shock protein 27 protects the heart against myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 99, 392–394, Epub 2004 Jul 13.
- [65] Muchowski, P.J. and Wacker, J.L. (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 11–22.
- [66] Outeiro, T.F., Klucken, J., Strathearn, K.E., Liu, F., Nguyen, P., Rochet, J.C., Hyman, B.T. and McLean, P.J. (2006) Small heat shock proteins protect against alpha-synuclein-induced toxicity and aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 631–638, Epub 2006 Oct 26.
- [67] Firdaus, W.J., Wytttenbach, A., Giuliano, P., Kretz-Remy, C., Currie, R.W. and Arrigo, A.P. (2006) Huntingtin inclusion bodies are iron-dependent centers of oxidative events. *Febs J.* 273, 5428–5441.
- [68] Wytttenbach, A., Sauvageot, O., Carmichael, J., Diaz-Latoud, C., Arrigo, A.P. and Rubinsztein, D.C. (2002) Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1137–1151.
- [69] Dierick, I., Irobi, J., De Jonghe, P. and Timmerman, V. (2005) Small heat shock proteins in inherited peripheral neuropathies. *Ann. Med.* 37, 413–422.
- [70] Evgrafov, O.V. et al. (2004) Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat. Genet.* 36, 602–606, Epub 2004 May 02.
- [71] Vicart, P. et al. (1998) A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat. Genet.* 20, 92–95.
- [72] Selcen, D. and Engel, A.G. (2003) Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations. *Ann. Neurol.* 54, 804–810.
- [73] Sanbe, A., Osinska, H., Villa, C., Gulick, J., Klevitsky, R., Glabe, C.G., Kaye, R. and Robbins, J. (2005) Reversal of amyloid-induced heart disease in desmin-related cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13592–13597, Epub 2005 Sep 9.
- [74] Sherman, M.Y. and Goldberg, A.L. (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15–32.
- [75] Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292, 1552–1555.
- [76] Maloyan, A., Sanbe, A., Osinska, H., Westfall, M., Robinson, D., Imahashi, K., Murphy, E. and Robbins, J. (2005) Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. *Circulation* 112, 3451–3461.
- [77] Liu, M. et al. (2006) Identification of a CRYAB mutation associated with autosomal dominant posterior polar cataract in a Chinese family. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3461–3466.
- [78] Inagaki, N. et al. (2006) Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 379–386, Epub 2006 Feb 8.
- [79] Bova, M.P., Yaron, O., Huang, Q., Ding, L., Haley, D.A., Stewart, P.L. and Horwitz, J. (1999) Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6137–6142.
- [80] Perng, M.D., Wen, S.F., van den, I.P., Prescott, A.R. and Quinlan, R.A. (2004) Desmin aggregate formation by R120G alphaB-crystallin is caused by altered filament interactions and is dependent upon network status in cells. *Mol. Biol. Cell.* 15, 2335–2346, Epub 2004 Mar 5.

- [81] Mehlen, P., Prévaille, X., Chareyron, P., Briolay, J., Klemenz, R. and Arrigo, A.-P. (1995) Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J. Immunol.* 154, 363–374.
- [82] Alford, K.A., Glennie, S., Turrell, B.R., Rawlinson, L., Saklatvala, J. and Dean, J.L. (2007) HSP27 functions in inflammatory gene expression and TAK1-mediated signalling. *J. Biol. Chem.* 3, 3.
- [83] Kammanadiminti, S.J. and Chadee, K. (2006) Suppression of NF-kappaB activation by *Entamoeba histolytica* in intestinal epithelial cells is mediated by heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* 281, 26112–26120, Epub 2006 Jul 13.
- [84] Merendino, A.M. et al. (2002) Heat shock protein-27 protects human bronchial epithelial cells against oxidative stress-mediated apoptosis: possible implication in asthma. *Cell Stress Chaperones* 7, 269–280.
- [85] Ciocca, D.R. and Calderwood, S.K. (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10, 86–103.
- [86] Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B. and Ciocca, D.R. (2006) Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* 31, 164–172, Epub 2006 Feb 17.
- [87] Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A.P., Mehlen, P. and Solary, E. (1998) Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res.* 58, 5495–5499.
- [88] Gruvberger-Saal, S.K. and Parsons, R. (2006) Is the small heat shock protein alphaB-crystallin an oncogene? *J. Clin. Invest.* 116, 30–32.
- [89] Chelouche-Lev, D., Kluger, H.M., Berger, A.J., Rimm, D.L. and Price, J.E. (2004) alphaB-crystallin as a marker of lymph node involvement in breast carcinoma. *Cancer* 100, 2543–2548.
- [90] Webster, K.A. (2003) Serine phosphorylation and suppression of apoptosis by the small heat shock protein alphaB-crystallin. *Circ. Res.* 92, 130–132.
- [91] Moyano, J.V. et al. (2006) AlphaB-crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Invest.* 116, 261–270.
- [92] Hitotsumatsu, T., Iwaki, T., Fukui, M. and Tateishi, J. (1996) Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha B-crystallin) in human brain tumors. *Cancer* 77, 352–361.
- [93] Mineva, I. et al. (2005) Differential expression of alphaB-crystallin and Hsp27-1 in anaplastic thyroid carcinomas because of tumor-specific alphaB-crystallin gene (CRYAB) silencing. *Cell Stress Chaperones* 10, 171–184.
- [94] Xu, L., Chen, S. and Bergan, R.C. (2006) MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* 16, 16.
- [95] Oesterreich, S., Weng, C.-N., Qiu, M., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K. and Fuqua, S.W. (1993) The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 53, 4443–4448.
- [96] Rocchi, P. et al. (2004) Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 64, 6595–6602.
- [97] Oesterreich, S., Schunck, H., Benndorf, R. and Bielka, H. (1991) Cisplatin induces the small heat shock protein hsp25 and thermotolerance in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 243–248.
- [98] Kato, K., Ito, H., Inaguma, Y., Okamoto, K. and Saga, S. (1996) Synthesis and accumulation of alphaB crystallin in C6 glioma cells is induced by agents that promote the disassembly of microtubules. *J. Biol. Chem.* 271, 26989–26994.
- [99] Ravikumar, B. et al. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 36, 585–595, Epub 2004 May 16.
- [100] Turnbull, S., Tabner, B.J., Brown, D.R. and Allsop, D. (2003) Copper-dependent generation of hydrogen peroxide from the toxic prion protein fragment PrP106-126. *Neurosci. Lett.* 336, 159–162.
- [101] Bodner, R.A. et al. (2006) Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4246–4251, Epub 2006 Mar 6.
- [102] Basu, S. and Srivastava, P.K. (2000) Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. *Cell Stress Chaperones* 5, 443–451.
- [103] Wells, A.D. and Malkovsky, M. (2000) Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol. Today* 21, 129–132.
- [104] Arrigo, A.P., Firdaus, W.J., Mellier, G., Moulin, M., Paul, C., Diaz-Latoud, C. and Kretz-Remy, C. (2005) Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. *Methods* 35, 126–138, Epub 2004 Dec 19.