

UNIVERSITÉ DE LILLE

École doctorale
Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement (SMRE)

Unité de recherche
Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules (PhLAM)

THÈSE DE DOCTORAT

Modélisation biophysique de la mort cellulaire en réponse au stress thermique

Mémoire préparé par MOHAMED TAHAR LADJIMI
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Physique
Spécialité : Milieux Dilués et Optique Fondamentale

Thèse soutenue le 25 Septembre 2019 devant le jury :

PR. FABRIZIO CLERI	Président du jury	Université de Lille
DR. JEAN CLAIRAMBAULT	Rapporteur	Inria
DR. MADALENA CHAVES	Rapporteur	Inria
DR. NICOLAS FORAY	Examineur	Inserm
DR. ANNABELLE BALLESTA	Examineur	Inserm
DR. BENJAMIN PFEUTY	Directeur de thèse	Université de Lille
DR. QUENTIN THOMMEN	Co-encadrant	Université de Lille

Résumé

La cellule vivante est en permanence exposée à divers types de stress pouvant endommager ses composants. Quand les dommages induits sont détectés, des mécanismes de défense sont activés pour les maîtriser tout en gérant au mieux les ressources énergétiques disponibles et nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Si le stress est trop sévère et que le système ne peut se défendre, la mort sera inévitable. La réponse cellulaire au stress est orchestrée par des réseaux de signalisation intracellulaires qui présentent une complexité extraordinaire. Les espèces moléculaires constituant ces réseaux assurent des tâches diverses à travers des réactions biochimiques, formant des machineries de processus biologiques synchronisées. Notre approche dans cette thèse pour l'étude de ces réseaux consiste à les modéliser mathématiquement pour reproduire un phénomène observé et repérer ses acteurs clés, analyser leurs réactions en réponse à différents signaux, et éventuellement réaliser des prédictions assez précises et expérimentalement vérifiables qui peuvent se montrer d'une extrême utilité pour les applications thérapeutiques. Dans nos travaux, nous nous focalisons sur le stress thermique et sur la réponse cellulaire qui en résulte en termes de dynamique des espèces moléculaires impliquées, mais également de destin cellulaire (mort ou survie) à l'issue de l'exposition, nous abordons cette problématique par des modèles dynamiques décrivant la cinétique biochimique des variables du système en conséquence d'une variation de la température. Dans un premier temps, nous démontrons à travers des simulations, suivies par une validation expérimentale, que la forme temporelle du stress thermique impacte considérablement la survie cellulaire. Ce premier résultat met en évidence un mécanisme de saturation des espèces réparatrices en conséquence d'une exposition à des températures élevées. Dans un second temps, nous étudions la potentielle corrélation entre une variabilité introduite sur les niveaux de deux protéines du réseau de réponse au choc thermique et le phénomène de mort fractionnelle. Selon les prédictions de notre modèle, la variabilité des protéines chaperons (espèces réparatrices) mesurée expérimentalement ne suffit pas à elle seule à expliquer la mort fractionnelle, qui doit impliquer d'autres sources de variabilité. Enfin, une analyse des courbes iso-effet générées à l'aide d'un modèle générique de la réponse cellulaire aux stress transitoires nous montre l'existence de quatre régimes de sensibilité en fonction des paramètres durée-intensité du stress ainsi que des paramètres du réseau et de ses échelles de temps. Nos travaux soulignent le potentiel et l'utilité des modèles de réseaux dynamiques dans la caractérisation des courbes dose-effet.

Mots clés : choc thermique, modélisation des réseaux biologiques, dose et iso-effet, apoptose, variabilité cellulaire, mort fractionnelle.

Abstract

The living cell is constantly exposed to various types of stress that can damage its components. When the induced damages are detected, defense mechanisms are activated to repair them while optimally managing the energy resources available and necessary for cell function. If the stress is too severe and the system can not defend itself, death will be inevitable. The cellular response to stress is orchestrated by intracellular signaling networks that are extraordinarily complex. The molecular species constituting these networks perform various tasks through biochemical reactions, forming synchronized biological process machineries. Our approach in this thesis for the study of these networks is to model them mathematically to reproduce an observed phenomenon and identify its key players, analyze their reactions in response to different signals, and possibly make precise enough and experimentally verifiable predictions that can be of an extreme utility for therapeutic applications. In our studies, we focus on thermal stress and on the resulting cellular response in terms of the dynamics of the molecular species involved, but also of cell fate (death or survival) at the end of the exposure, we address those questions by dynamic models describing the biochemical kinetics of system variables as a consequence of temperature variation. In a first step, we demonstrate through simulations, followed by experimental validation, that the temporal form of heat stress significantly impacts cell survival. This first result highlights a mechanism of saturation of the repair species as a consequence of exposure to high temperatures. In a second step, we study the potential correlation between a variability introduced on the levels of two proteins in the heat shock response network and the phenomenon of fractional killing. According to our model predictions, experimentally measured chaperone proteins (repair species) variability alone is not sufficient to explain fractional killing, which must involve other sources of variability. Finally, an analysis of the isoeffect curves generated by a generic model of the cellular response to transient stress shows the existence of four sensitivity regimes depending on the duration-intensity parameters of the stress as well as on the parameters of the response network and its time scales. Our work highlights the potential and utility of dynamic network models in the characterization of dose-response curves.

Key words : heat shock, biological networks modelling, dose and isoeffect, apoptosis, cellular variability, fractional killing.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

– Marie Curie

Remerciements

Cette thèse a été pour moi une expérience sincèrement marquante, aussi bien sur le plan intellectuel que sur le plan humain, j'en ressors réellement grandi.

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie ainsi les examinateurs Pr. Cleri, Dr. Foray et Dr. Ballesta, et les rapporteurs Dr. Chaves et Dr. Clairambault, que j'espère avoir le plaisir de revoir.

Je remercie infiniment les membres de l'équipe qui m'a accueilli. Mes remerciements vont à Marie Guilbert et François Anquez, qui m'ont apporté une aide essentielle dans les expérimentations, à Emmanuel Courtade pour ses précieux conseils tout au long de ces trois années, et à Jean Pesez et Alexandra Pruvost, avec qui je n'ai malheureusement pas eu le plaisir de travailler de manière directe, mais qui ont toujours apporté leur touche dans mon quotidien au laboratoire.

Je voudrais également adresser mes remerciements à Gilbert Martinelli, qui a encadré mes activités d'enseignement à l'IMT de Lille-Douai. Son expérience et ses conseils ont garanti le très bon déroulement des travaux dirigés et m'ont fait apprécier chaque moment où je me tenais devant une classe.

Je remercie mes très chers collègues : Darka Labavić (qui m'a énormément appris), Majid Layachi, Marine Jacquier et Dana Simiuc, avec qui j'ai partagé l'exceptionnel bureau "Biocal", et eu des conversations scientifiques et non scientifiques extrêmement enrichissantes. Sans eux, l'ambiance de travail aurait été tristement différente.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude à mes encadrants Benjamin Pfeuty et Quentin Thommen, notamment, pour la confiance qu'ils m'ont accordée depuis le début de mon stage de Master au laboratoire. Leur expérience, leur patience et leur disponibilité m'ont permis d'avancer sereinement, leurs conseils aussi bien que leurs critiques ont été les piliers de cette thèse.

Je remercie tous les enseignants, tuteurs et encadrants qui m'ont formé tout au long de mon parcours, qui m'ont conseillé, poussé à me surpasser, et qui n'ont jamais hésité à m'accorder leur temps et à partager leurs connaissances.

J'adresse mes plus sincères remerciements à mes parents, pour avoir consacré leurs vies à m'aider à construire la mienne, et d'avoir cru en moi dès mon plus jeune âge. Je remercie mes beaux parents qui n'ont jamais cessé de m'encourager et qui ont été d'un formidable soutien moral. Je remercie aussi mes très chers amis Djaber et Malek, ainsi que mon frère Walid, qui ont toujours été présents quand j'en avais le plus besoin ; sans oublier Anis, Sylvain et Imed, avec qui j'ai partagé la passionnante aventure des études en physique.

Je tiens enfin à remercier du fond du cœur la personne sans qui je n'aurai certainement pas pu parcourir tout ce chemin, qui a été à mes côtés à chaque instant, et qui m'a soutenu inconditionnellement durant les moments les plus éprouvants, je remercie ma femme Bouchra.

Acronymes et abréviations

- CEM43 : Cumulative Equivalent Minutes at 43°C
- RRCT : Réseau de Réponse au Choc Thermique
- RMSE : Root Mean Square Error
- HSP : Heat Shock Protein
- HSF1 : Heat Shock Factor 1
- MFP : Misfolded Protein (protéine dénaturée)
- pC3 / pC9 : Procaspase-3 / Procaspase-9
- C3* / C9* : Caspase-3 active / Caspase-9 active
- XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Table des matières

1	Introduction générale	1
1.1	Hyperthermie et dosimétrie thermique	2
1.1.1	L'hyperthermie	2
1.1.2	Détermination de la dose thermique à iso-effet biologique	2
1.1.3	Facteurs impactant le calcul de la dose thermique à iso-effet biologique	4
1.2	Réponse cellulaire au choc thermique	5
1.2.1	Dommmages cellulaires induits par l'hyperthermie	5
1.2.2	Les protéines de choc thermique (<i>Heat Shock Proteins, HSP</i>)	7
1.2.3	Le facteur de transcription <i>HSF1</i> (<i>Heat Shock Factor 1</i>)	7
1.2.4	Régulation de la réponse cellulaire au stress thermique	7
1.3	La mort cellulaire	8
1.3.1	L'apoptose	8
1.3.2	La nécrose	11
1.4	Variabilité cellulaire et mort fractionnelle	11
1.4.1	Bruit intrinsèque et extrinsèque	11
1.4.2	Hétérogénéité du contenu cellulaire	12
1.4.3	Asynchronie dans le cycle cellulaire	12
1.4.4	Mort fractionnelle	12
1.5	Modélisation des réseaux intracellulaires de signalisation	13
1.5.1	Circuits biologiques de signalisation	13
1.5.2	Modélisation dynamique des réseaux biologiques	14
1.5.3	Boucles de rétroaction	14
1.5.4	Estimation des paramètres du modèle	15
1.5.5	Séparation des échelles de temps	15
1.6	Plan	16
2	Effets de la forme temporelle du stress thermique sur la survie cellulaire	17
2.1	Introduction	17
2.2	Modèle dynamique de la survie cellulaire en réponse au stress thermique	18
2.2.1	Modèle dynamique du réseau cellulaire de réponse au stress thermique <i>RRCT</i>	18
2.2.2	Couplage du modèle <i>RRCT</i> à une équation de population	23
2.2.3	Fonction de mort probabiliste pour une colonie cellulaire	23
2.2.4	Ajustement des paramètres de la fonction de mort	24
2.2.5	Modélisation de l'effet de la forme temporelle du stress sur la survie cellulaire	26
2.3	Observation expérimentale de l'effet de la forme temporelle du stress sur la survie cellulaire	30
2.3.1	Dispositif expérimental et protocole d'expérimentation	30
2.3.2	Résultats de l'étude expérimentale	31
2.4	Discussion	33

3	Modèle réduit de la survie cellulaire en réponse au stress thermique	35
3.1	Introduction	35
3.2	Réduction du modèle de survie cellulaire en réponse au choc thermique	36
3.2.1	Reproduction des résultats du modèle de survie cellulaire en réponse au choc thermique avec le modèle réduit	39
3.3	L'inhibition des chaperons augmente la sensibilité au choc thermique	40
3.4	Ajustement des courbes de survie de différentes lignées cellulaires	43
3.5	Discussion	45
4	Modélisation de la mort cellulaire par apoptose	47
4.1	Introduction	47
4.2	Modélisation de l'apoptose intrinsèque	48
4.2.1	Identification des espèces clés du réseau apoptotique intrinsèque et construction du modèle	48
4.2.2	Système d'équations différentielles décrivant le modèle	50
4.3	Paramétrage du modèle de l'apoptose intrinsèque	51
4.3.1	Bistabilité irréversible et analyse de bifurcation	52
4.3.2	Dynamique des espèces clés du modèle	54
4.3.3	Combinaisons de paramètres (β, γ, δ) pour une bistabilité irréversible	56
4.3.4	Subdivision de l'espace des paramètres	57
4.4	Discussion	58
5	Modélisation de la mort fractionnelle en réponse au choc thermique	61
5.1	Introduction	61
5.2	Couplage du modèle de l'apoptose intrinsèque au modèle <i>RRCT</i>	62
5.3	Distribution des HSP dans une colonie de cellules <i>HeLa</i>	64
5.4	Distribution normale logarithmique des <i>HSP</i> et calcul de la fraction de survie	65
5.5	Calibration du modèle pour la reproduction des données de mort fractionnelle	67
5.6	Couplage complet des deux modèles (<i>RRCT</i> et apoptose)	71
5.7	Variabilité de la concentration de <i>XIAP</i>	75
5.8	Discussion	80
6	Modélisation générique de la réponse cellulaire aux stress transitoires	81
6.1	Introduction	81
6.2	Modèle générique de la réponse cellulaire au stress	82
6.2.1	Dynamique et bifurcation	84
6.2.2	Iso-effet et paramètres (durée-intensité) du stress	85
6.3	Lois de puissance de la relation iso-effet	85
6.3.1	Régime R_1 : adaptation après un stress de très courte durée	87
6.3.2	Régime R_2 : adaptation transitoire à un stress de courte durée	88
6.3.3	Régime R_3 : adaptation stationnaire à un stress de courte durée	89
6.3.4	Régime R_4 : adaptation à un stress de longue durée	90
6.4	Effets des paramètres de régulation sur la relation iso-effet	90
6.4.1	Effet de la variation de β sur la relation iso-effet	90
6.4.2	Effet de la variation de τ_R sur la relation iso-effet	91
6.4.3	Effet de la variation de α sur la relation iso-effet	91
6.5	Discussion	92
	Conclusion	93
	Perspectives	95

Annexes	97
A Modèle mathématique du <i>RRCT</i>	99
B Subroutine SEULEX	101
C Calibration du dispositif expérimental dans l'étude de l'effet d'asymétrie	103
D Régulation transcriptionnelle	105
D.1 Activateurs de transcription	105
D.2 Inhibiteurs de transcription	105
D.3 Activation des facteurs de transcription	105
E Non-linéarité dans les systèmes biologiques	107
E.1 Mécanisme de saturation	107
E.2 Mécanisme de seuil	107
F Fonction de Michaelis-Menten	109
G Coopérativité et équation de Hill	111
H Publications	113
Bibliographie	114

Table des figures

1.1	Courbe schématique représentative de la relation d' <i>Arrhenius</i> liant le taux de survie cellulaire à la température	3
1.2	Profils dynamiques (simulés) de protocoles thermiques portant la même dose <i>CEM43</i>	4
1.3	Schéma de la réponse cellulaire au stress thermique	6
1.4	Schéma des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose dans les cellules mam-mifères	10
1.5	Schéma simplifié du réseau de réponse cellulaire au stress	13
2.1	Schéma représentatif des étapes méthodologiques de l'étude	18
2.2	Schéma du modèle de réseau de réponse au choc thermique <i>RRCT</i>	19
2.3	Évolution temporelle des variables clés du modèle <i>RRCT</i> en réponse à une marche de stress thermique	22
2.4	Schéma du modèle dynamique de réponse au stress thermique	23
2.5	Calibration du modèle dynamique de survie cellulaire	25
2.6	Évolution temporelle du taux de mortalité κ	25
2.7	Simulation de la survie cellulaire de la lignée <i>HeLa</i> et ajustement des données expérimentales	26
2.8	Espace des profils temporels du stress thermique	27
2.9	Effet d'asymétrie de la survie cellulaire en fonction de la forme temporelle du stress thermique	28
2.10	Ratio de survie en fonction de la dose et de la durée du stress thermique	29
2.11	L'effet d'asymétrie de la réponse de survie dépend peu des valeurs des paramètres α et β	29
2.12	Photographie du dispositif expérimental	30
2.13	Forme temporelle des deux protocoles thermiques de l'étude expérimentale	31
2.14	Résultats du comptage du nombre de cellules après les protocoles thermiques à 0, 24, 48 et 72h	32
2.15	Évolution temporelle du nombre de cellules correspondant à chaque protocole à l'issue de l'expérimentation	33
3.1	Schéma représentatif des étapes méthodologiques de l'étude avec le modèle réduit	35
3.2	Vérification de la validité de l'approximation réalisée dans la réduction du modèle de survie cellulaire en réponse au stress thermique	38
3.3	Le modèle réduit reproduit les résultats du modèle dynamique de survie cellulaire	40
3.4	L'inhibition des HSP augmente la sensibilité cellulaire au stress thermique	41
3.5	Le modèle réduit prédit un effet de seuil de l'inhibition des chaperons	42
3.6	Effet d'asymétrie avec inhibition des <i>HSP</i>	43
3.7	Reproduction par le modèle réduit des données de survie en réponse au stress thermique de plusieurs lignées cellulaires	44
4.1	Courbes signal-réponse présentant différentes caractéristiques	48

4.2	Schéma explicatif du modèle du réseau d'apoptose intrinsèque	49
4.3	Schéma explicatif de la réponse bistable irréversible du système en fonction de DET^*	53
4.4	Fraction de $C3^*$ au point fixe en réponse à des "marches" de DET^* de différentes amplitudes	54
4.5	Tracés temporels des fractions de $XIAP$, $C9^*$ et $C3^*$ en réponse à une "marche" de DET^*	55
4.6	Fraction de $C3^*$ de l'état de mort en fonctions des combinaisons (β, γ)	56
4.7	Fraction de $C3^*$ au point de bifurcation ($DET^* = 0.5$) en fonction des combinaisons (β, γ)	57
4.8	Subdivision de l'espace des paramètres (β, γ) en zones satisfaisant différents critères	58
5.1	Couplage du modèle $RRCT$ au modèle de l'apoptose intrinsèque	62
5.2	Dynamique du modèle global en réponse à un stress de 43°C 3h	63
5.3	Temps de mort en fonction de l'intensité et de la durée du stress thermique	64
5.4	Variabilité des niveaux de $HSP72$ dans une colonie cellulaire $HeLa$ à 37°C	65
5.5	Distribution log-normale des HSP introduite dans les simulations et hypothèse de la concentration départageante	66
5.6	Score d'ajustement des données expérimentales en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*})	68
5.7	Fraction de survie cellulaire à 37°C en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*})	68
5.8	Moyenne optimale de la distribution initiale des HSP en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*})	69
5.9	CV de la distribution initiale optimale des HSP en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*})	70
5.10	Ajustement des données de [1] avec les combinaisons optimales (α, δ_{DET^*})	70
5.11	Distributions de la concentration initiale des HSP issues des simulations d'optimisation	71
5.12	Score d'ajustement des données de [1] en fonction des paramètres (β, γ) du modèle de l'apoptose	72
5.13	Variation de la moyenne μ de la distribution initiale des HSP optimale en fonction des paramètres (β, γ) du modèle de l'apoptose	73
5.14	Variation du CV de la distribution initiale des HSP optimale en fonction des paramètres (β, γ) du modèle de l'apoptose	74
5.15	Ajustement des données de [1] avec les combinaisons $(\alpha, \delta_{DET^*}, \beta, \gamma)$	74
5.16	Score d'ajustement des données de [1] en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*})	75
5.17	Fraction de survie cellulaire à 37°C en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*})	76
5.18	Moyenne μ de la distribution optimale de $XIAP$ en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*})	76
5.19	CV de la distribution optimale de $XIAP$ en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*})	77
5.20	Ajustement des données de [1] avec $(\alpha, \delta_{DET^*}) = (6, 31 \times 10^{-3}; 0, 31)$	77
5.21	Distribution optimale de $XIAP$	78
5.22	Variation du score, du CV et de la moyenne de distribution μ optimaux en fonction des paramètres (β, γ) du modèle de l'apoptose	79
6.1	Schémas représentatifs des réponses cellulaires aux stress	82
6.2	Diagramme de bifurcation avec bistabilité irréversible	84
6.3	Courbe iso-effet $S^* = f(T)$ décrite par quatre régimes distincts	86
6.4	Dynamique des dommages et des espèces réparatrices dans le régime R_1 (stress de durée très courte)	88
6.5	Dynamique des dommages et des espèces réparatrices dans le régime R_2 (stress de durée courte)	88

6.6	Dynamique des dommages et des espèces réparatrices dans le régime R_3	89
6.7	Effet du paramètre β sur les régimes de la relation iso-effet	90
6.8	Effet du paramètre τ_R sur les régimes de la relation iso-effet	91
6.9	Effet du paramètre α sur les régimes de la relation iso-effet	91
C.1	Simulation de la réponse du dispositif expérimental	104
E.1	Mécanisme de saturation dans les systèmes biologiques	107
E.2	Mécanisme de seuil dans les systèmes biologiques	108

Chapitre 1

Introduction générale

La cellule vivante se trouve constamment exposée à divers types de stress : thermique, oxydant, chimique, hypoxie, rayonnements ionisants, choc osmotique, *etc.* En fonction de la nature du stress, son *ADN*, sa membrane, ses protéines ainsi que d'autres de ses composants peuvent être endommagés. Une fois que les dommages induits sont détectés, le signal d'alerte est lancé et des mécanismes de défense sont activés pour essayer de les maîtriser et de préserver le bon fonctionnement cellulaire en gérant au mieux les ressources énergétiques disponibles. Si le stress subi est trop sévère et que le système est dans l'incapacité de se défendre, la mort cellulaire devient inévitable, et peut potentiellement être de nature suicidaire dite programmée pour protéger les cellules voisines.

Les différentes étapes de la réponse cellulaire au stress sont réalisées par diverses espèces moléculaires interagissant au sein de réseaux intracellulaires de signalisation. Ces réseaux sont basés sur des réactions biochimiques et présentent une complexité extraordinaire leur permettant d'avoir des comportements hautement sophistiqués. En effet, les espèces moléculaires les constituant assurent des tâches variées essentielles à la survie et au bon fonctionnement cellulaire, formant des machineries de processus biologiques aussi parfaitement synchronisées que les musiciens d'un orchestre symphonique. L'une des approches permettant l'étude de ces réseaux consiste à les traduire en modèles mathématiques, dans l'optique de reproduire un phénomène observé, analyser leurs réactions en réponse à différents stimuli, repérer les acteurs clés d'un phénomène biologique, et éventuellement réaliser des prédictions assez précises et expérimentalement vérifiables qui peuvent se montrer d'une extrême utilité pour les applications thérapeutiques.

Nous nous focalisons principalement sur le stress thermique et sur la réponse cellulaire qui en résulte en termes de dynamique des espèces moléculaires impliquées, mais également en termes de destin cellulaire, de nature binaire (mort ou survie), à l'issue de l'exposition au stimulus. Nous abordons cette problématique par une approche de modèles dynamiques décrivant la cinétique biochimique des variables du système résultante d'une variation de la température. Nos travaux s'inscrivent dans un cadre d'étude des problématiques thérapeutiques en matière de dosimétrie iso-effective et d'hétérogénéité de la réponse, et visent à démontrer la capacité prédictive des modèles dynamiques et leur utilité dans l'exploration des phénomènes biologiques et la caractérisation des courbes dose-effet. Dans ce chapitre, nous passerons en revue les notions concernant le stress thermique qui faciliteront la compréhension de nos études. Nous commencerons par une introduction à la technique d'hyperthermie et son potentiel thérapeutique. Par la suite, nous expliciterons un outil standard de la détermination de la dose thermique à iso-effet biologique, ainsi que ses limites de validité. Naturellement, il est également essentiel de mettre en évidence les mécanismes biologiques régissant la réponse cellulaire au stress thermique et les principales molécules y opérant. Enfin, nous présenterons une brève introduction à la modélisation des circuits biologiques.

1.1 Hyperthermie et dosimétrie thermique

1.1.1 L'hyperthermie

L'hyperthermie est définie comme une élévation localisée de la température au dessus du niveau physiologique dans un but thérapeutique, généralement avec des températures dans l'intervalle 39-45°C [2]. L'élévation de température peut induire des dommages directs et mortels aux cellules cancéreuses mais peut également les sensibiliser à d'autres modalités de traitement [3], et les courbes de survie cellulaire qui en découlent sont similaires à celles associées à la radiothérapie, caractérisées par une épaule initiale suivie par une décroissance exponentielle [4]. L'épaule initiale dans ces courbes représente l'accumulation de dommages sublétaux, et une fois un seuil de dommages dépassé, la décroissance exponentielle (mort) commence. Pour les températures pas trop élevées, une queue de résistance peut apparaître, correspondant à l'acquisition de la thermotolérance [5].

Plusieurs études réalisées *in vivo* et *in vitro* ont clairement démontré que l'hyperthermie combinée à la radiothérapie ou à la chimiothérapie peut significativement améliorer le rendement [6, 7]. Des études ont également confirmé son impact positif sur la réponse immunitaire envers les cellules tumorales [8]. Dans le cas de la combinaison avec la radiothérapie, l'hyperthermie augmente la sensibilité des cellules aux radiations par une action d'inhibition, entre autres, des processus de réparation des dommages *ADN* [4, 9, 10]. Enfin, pour ce qui est de la chimiothérapie, des agents thérapeutiques montrent une action synergique quand ils sont combinés à une élévation de température [11, 12].

L'application clinique de l'hyperthermie peut être locale, régionale ou sur corps entier [2]. Les techniques utilisées peuvent être classées suivant leur nature invasive ou intraluminaire, ainsi que selon la nature superficielle ou profonde de leur effet [9]. Actuellement, les méthodes les plus utilisées se basent sur la conduction thermique par circulation de liquide ou sur l'exposition aux ondes électromagnétiques ou acoustiques [4].

1.1.2 Détermination de la dose thermique à iso-effet biologique

La description la plus simple pour un protocole thermique est la variation de la température en fonction du temps. Quand des cellules sont exposées à un choc thermique (hyperthermie), le taux de survie cellulaire est directement lié à la température et à la durée d'exposition [13]. Cependant, le fait est que les profils dynamiques de ces protocoles sont souvent très irréguliers, ce qui complique un peu les questions de dosimétrie thermique.

Une première approximation dans le calcul de la dose thermique, est de diviser le profil dynamique du protocole en plusieurs intervalles dans lesquelles la température est plus ou moins constante, de multiplier ces températures par leurs durées correspondantes, et d'additionner les résultats pour obtenir une dose en ($^{\circ}\text{C min}$). Néanmoins, ce calcul ne permet pas de prédire efficacement le rendement en termes de fraction de survie (ou de mort) cellulaire : par exemple, une élévation de température allant de 37 à 42°C ($\Delta T = 5^{\circ}\text{C}$) durant 10min produira moins de dommages qu'une transition allant de 37 à 46°C ($\Delta T = 9^{\circ}\text{C}$) durant 5.55min, et ce, bien que les deux protocoles donnent approximativement un résultat de 50 $^{\circ}\text{C min}$ [14, 15].

Une autre approche résultant directement des courbes de survie cellulaire, est de convertir une certaine durée à une certaine température dans un protocole thermique, à une durée à une température de référence, dans la contrainte d'un **iso-effet biologique**, *i.e.*, même fraction de survie. La relation d'*Arrhenius* lie le taux d'inactivation (taux de mort) dans les systèmes biologiques à la température, et présente une nature biphasique avec un "*breakpoint*" aux alentours

de 43°C pour les lignées cellulaires de rongeurs et de 43,5°C pour les lignées humaines [4, 14]. Nous pouvons voir sur la figure (1.1) une courbe schématique de la relation d'*Arrhenius* où le logarithme de la pente des courbes de survie cellulaire ($1/D_0$) est représenté en fonction de la température.

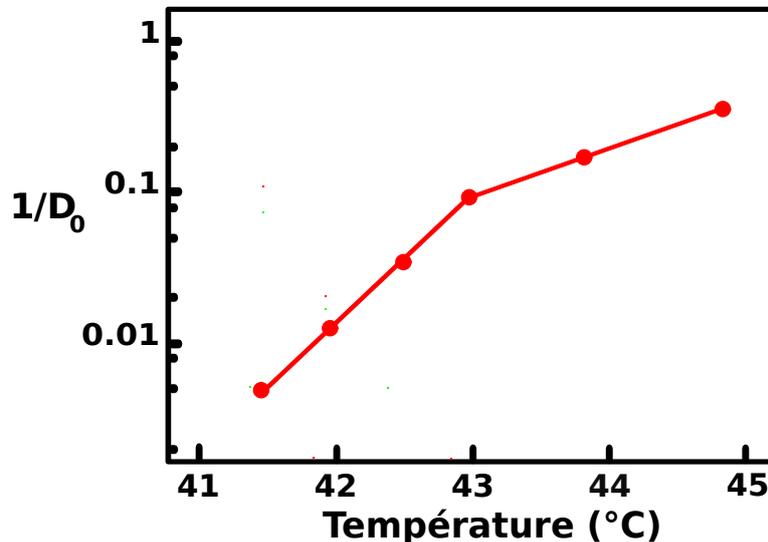


FIGURE 1.1 – Courbe schématique représentative de la relation d'*Arrhenius* liant le taux de survie cellulaire à la température. La courbe présente une nature biphasique avec un breakpoint aux alentours de 43°C.

Sapareto et *Dewey* ont proposé d'utiliser cette relation entre le taux de mortalité cellulaire et la température d'exposition pour normaliser les doses thermiques [16], et ont ainsi formulé l'outil de détermination de la dose thermique nommé *CEM43* défini comme suit :

$$\text{CEM43} = \int_{t=0}^{t=\text{final}} R^{(43-T(t))} dt \quad \text{avec} \quad \begin{cases} R = 0,25 & T < 43^\circ\text{C} \\ R = 0,5 & T > 43^\circ\text{C} \end{cases} \quad (1.1)$$

où $T(t)$ désigne la température en fonction du temps en (°C), et où R est un paramètre qui peut être expérimentalement déterminé et qui tient compte du changement de pente du taux de mortalité en fonction des températures au-dessus ou en dessous de 43°C. "*CEM43*" est l'abréviation de "*Cumulative Equivalent Minutes at 43*". Cet outil permet de convertir n'importe quel profil thermique à une durée à 43°C, la figure (1.2) adaptée de [16] montre plusieurs profils dynamiques de choc thermique ayant des formes différentes mais portant la même dose selon le *CEM43*. Il est tout de même important de noter que le *CEM43* a été formulé à partir des courbes de survie cellulaire issues d'une exposition au choc thermique où les profils dynamiques sont supposés être des impulsions (température constante pendant une durée définie).

En outre, la température dans plusieurs points spatiaux au sein d'une même tumeur soumise à un protocole hyperthermique varie et une différence de 4 à 5°C peut être atteinte [17], ce qui a nécessité l'introduction d'un concept considérant cette hétérogénéité spatiale dans la propagation de la température et qui peut avoir un impact sur la précision de la dose thermique calculée par le *CEM43*. Une idée était de partir de la température minimale atteinte dans 90%, 50% et 10% du volume tumoral, ce qui a conduit à l'élaboration du *CEM43 T90*, *CEM43 T50* et *CEM43 T10* [14], et qui donneront donc à chaque profil dynamique d'hyperthermie un nombre équivalent de minutes pour lesquelles la température dans 90%, 50% et 10% du volume tumoral est d'au moins 43°C. Des études ont trouvé que le *CEM43 T90* corrèle très bien avec la

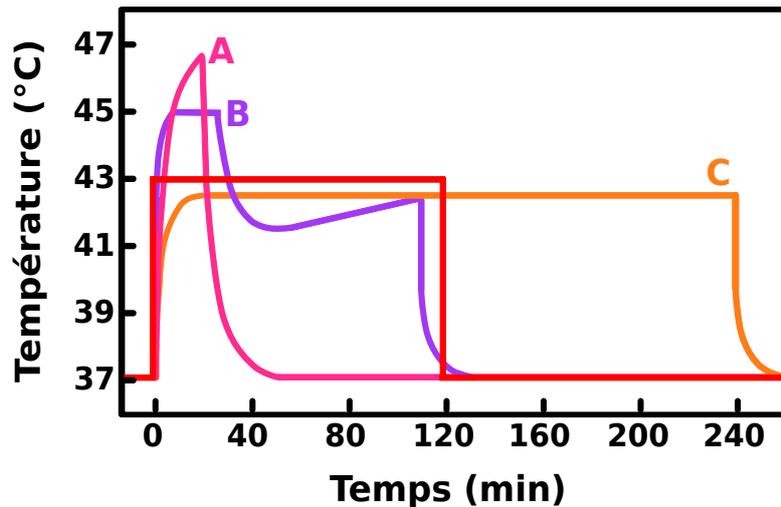


FIGURE 1.2 – Profils dynamiques (simulés) de protocoles thermiques portant la même dose CEM_{43} . Le profil idéal est représenté en rouge et présente une dose thermique de 120 minutes à 43°C. Les profils (A-C) sont équivalents à 120 minutes à 43°C, nous pouvons voir clairement que les aires correspondantes ne sont pas égales. La figure a été adaptée de [16].

réponse [18] et paraît être aujourd’hui l’outil le plus pratique pour le calcul de la dose thermique dans les études cliniques [19].

Enfin, pour se donner un ordre de grandeur concernant la létalité d’un protocole thermique par rapport à sa dose CEM_{43} , des travaux ont montré que pour des structures sensibles comme la barrière hémato-encéphalique (chez l’humain), une dose de 2min à 43°C est suffisante pour observer des dommages significatifs ; alors que le seuil de dommages significatifs pour les muscles, les graisses et la peau est aux alentours de 41min à 43°C ; enfin pour les os, le seuil est à 15min à 43°C [20]. Une étude a également montré que des seuils allant de 20 à 240minutes à 43°C sont requis pour induire des dommages dans plusieurs tissus sains de plusieurs espèces (dont l’humain) [21].

1.1.3 Facteurs impactant le calcul de la dose thermique à iso-effet biologique

Il existe plusieurs facteurs pouvant influencer considérablement la cytotoxicité hyperthermique et la réponse des systèmes biologiques exposés [22], ce qui peut modifier l’allure et/ou la position de la courbe d’*Arrhenius*. Nous allons énumérer certains de ses facteurs qui sont à prendre en considération et à potentiellement corriger lors du calcul d’une dose thermique par le CEM_{43} [16].

1. La thermotolérance :

La thermotolérance est définie comme étant l’acquisition temporaire d’une résistance envers un traitement hyperthermique létal suite au pré-conditionnement par un premier traitement sublétal [1,5,23]. Par exemple, un protocole de deux impulsions de 1h à 44°C espacées par une durée au repos à 37°C cause beaucoup moins de mort cellulaire qu’un protocole de 2h à 44°C [1], et ce, bien que les deux protocoles ont la même dose selon le CEM_{43} . Par ailleurs, la thermotolérance peut décaler la courbe d’*Arrhenius* et le *breakpoint* de 1°C vers les températures supérieures [24], ce qui veut dire que les cellules thermotolérantes sont 1°C plus résistantes que les cellules non thermotolérantes. Une manière de s’affranchir de cet effet est d’attendre suffisamment longtemps après la première fraction de dose pour que la thermotolérance disparaisse. Son amplitude et sa durée dépendent de la température et durée du premier traitement thermique de conditionnement.

2. Le "**Step-down heating**" :

Il correspond à une situation où la température augmente et dépasse le "*breakpoint*" pour ensuite décroître et repasser en dessous pour le reste de la durée de l'exposition. Il sensibilise les cellules aux températures inférieures au "*breakpoint*" et élimine ce dernier dans la courbe d'*Arrhenius*. Dans les conditions de Step-down heating, le paramètre R prend donc sa valeur supérieure même pour les températures inférieures au "*breakpoint*" [16].

3. Les conditions physiologiques :

Plusieurs facteurs physiologiques comme le pH [25,26] et les nutriments peuvent modifier la réponse cellulaire à l'hyperthermie et impacter le développement de la thermotolérance [27]. La sensibilité cellulaire à l'hyperthermie augmente quand le pH diminue, et la courbe d'*Arrhenius* est décalée vers les températures inférieures au "*breakpoint*" sans changement d'allure [14].

4. La différence de sensibilité des phases du cycle cellulaire :

La phase S du cycle cellulaire est sensible au choc thermique tandis que la phase $G1$ est plus résistante [28].

1.2 Réponse cellulaire au choc thermique

Maintenant que les notions de dosimétrie thermique ont été expliquées, il est temps de s'intéresser aux dommages induits par choc thermique au niveau intracellulaire, au mécanisme de réparation de ces dommages, et à la régulation de la réponse cellulaire en explicitant les protéines clés impliquées dans ces processus. La réponse cellulaire au choc thermique RCT a été abondamment étudiée [29–32]. Nous nous limitons ici à ses caractéristiques qui sont considérées dans nos modèles et qui sont décrits dans la figure (1.3) présentant un schéma explicatif de la réponse cellulaire au stress thermique.

1.2.1 Dommages cellulaires induits par l'hyperthermie

Le principal dommage qu'induit une élévation de la température au sein des cellules est la **dénaturation des protéines** (Fig. 1.3), qui sont composées de polymères d'acides aminés appelés polypeptides, et dans lesquels les acides aminés s'associent par des liaisons covalentes [33]. Cette séquence d'acides aminés constitue la structure primaire de la protéine, et le polypeptide doit acquérir une conformation secondaire puis tertiaire (tridimensionnelle) [34] pour que la protéine puisse assurer ses fonctions, ceci est possible via des liaisons non-covalentes de type hydrogène.

Cette conformation tridimensionnelle n'est stable qu'aux températures physiologiques, et une augmentation de la température peut amener à la rupture des liaisons non-covalentes et à la dénaturation (perte de la conformation tridimensionnelle) de la protéine [35], et donc à la perte de sa fonctionnalité, ce qui impacte des processus intracellulaires critiques, perturbe l'homéostasie protéique (protéostasie), et peut éventuellement causer la mort cellulaire [36,37]. Il est à noter que certaines protéines sont plus stables que d'autres, ce qui leur permet de résister au stress et de garder leur conformation et leur fonctionnalité. Les protéines dénaturées ont tendance à former des agrégats toxiques impliqués dans les maladies neurodégénératives et dans le vieillissement [38,39].

L'hyperthermie cause également une déformation du cytosquelette, une perte de localisation des organites, un effondrement des processus de transport intracellulaire, une fragmentation de l'appareil de *Golgi* et du réticulum endoplasmique, une décroissance du nombre de mitochondries

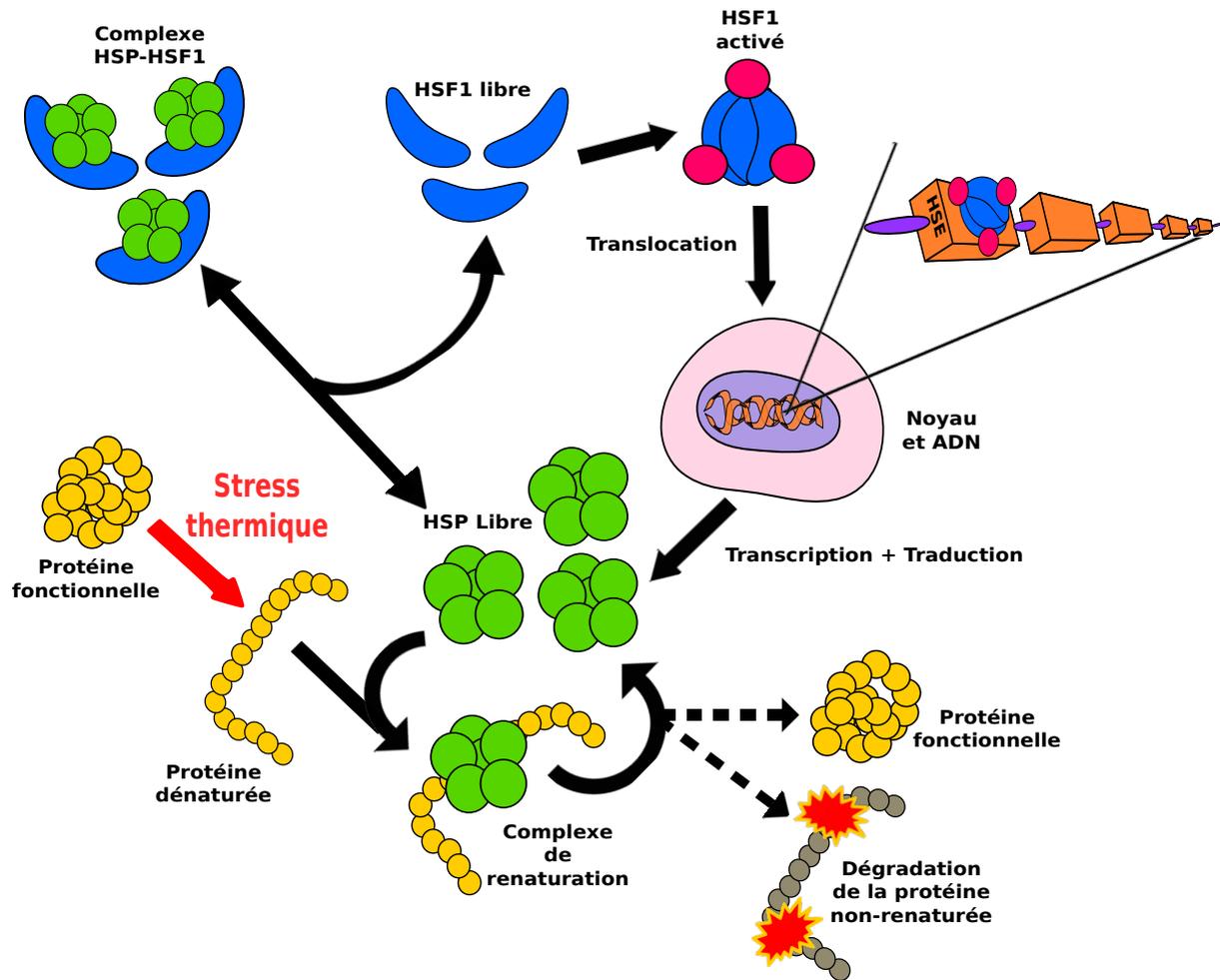


FIGURE 1.3 – Schéma de la réponse cellulaire au stress thermique. D'une part, les protéines se dénaturent sous l'action du choc thermique et les *HSP* présentes (libres ou dissociées de *HSF1*) tentent de les réparer ; d'autre part, les *HSF1* libres forment des trimères et sont activés pour ensuite lancer la transcription d'autres *HSP*, une fois qu'il y a assez de protéines chaperons et que les dommages sont maîtrisés (réparés ou dégradés - flèches en pointillés), les *HSP* séquestrent de nouveau les *HSF1* pour stopper leur propre production et éviter une dépense énergétique inutile à la cellule.

et de lysosomes, un changement morphologique de la membrane conduisant à l'augmentation de sa perméabilité, et provoque l'apparition de granules de stress contenant des *ARN* et des protéines dans le cytosol. Au niveau intranucléaire, elle impacte aussi les processus d'épissage [31].

Enfin, il a été précédemment mentionné que l'exposition au choc thermique sensibilise les cellules à la radiothérapie, qui de son côté induit principalement des dommages à l'*ADN* de type cassures simple-brin et double-brin. Il est largement accepté que le choc thermique perturbe les mécanismes de réparation de l'*ADN* [40,41] ce qui rend les cellules vulnérables aux autres stress qui ciblent directement ce dernier, comme les rayonnements ionisants par exemple. En effet, le choc thermique peut désactiver la *Polymérase-β*, l'enzyme clé impliquée dans le processus de réparation par excision de base, et il impacte également les processus de jonction d'extrémités non homologues (*Non-Homologous End Joining, NHEJ*) et de recombinaison homologue (*Homologous Recombination, HR*) [40]. Des études ont par ailleurs montré que l'hyperthermie seule peut induire des dommages à l'*ADN* [42,43].

1.2.2 Les protéines de choc thermique (*Heat Shock Proteins, HSP*)

Suite aux dommages intracellulaires induits par le choc thermique, une machinerie de réponse est mise en place pour les réparer et préserver au mieux l'homéostasie permettant le bon fonctionnement et la survie. Les acteurs principaux de cette machinerie sont les protéines de choc thermique (*Heat Shock Proteins, HSP*) [30,44,45] qui sont hautement conservées à travers diverses lignées cellulaires. Ces protéines sont classées en familles en fonction de leur poids moléculaire. La **HSP70** (70kDa) est l'une des protéines chaperons les plus étudiées en raison de son rôle cytoprotecteur central dans les réponses à différents types de stress (thermique, métaux lourds, oxydant) [46,47].

Dans les conditions normales à la température physiologique, les *HSP* sont présentes dans la cellule et constamment produites avec un taux basal pour assurer le bon repliement des protéines nouvellement synthétisées. Quand la cellule est exposée à un choc thermique, les protéines dénaturées commencent à s'accumuler, et la production des *HSP* est alors augmentée par le biais de leur **facteur de transcription**. Ces protéines chaperons interviennent pour extraire les protéines dénaturées des agrégats qu'elles forment [48], les réparer, et les marquer pour qu'elles soient dégradées si le processus de réparation se solde par un échec (Fig. 1.3).

En outre, des études ont montré le rôle des *HSP* dans le processus de thermotolérance [49,50], se traduisant par l'acquisition d'une résistance transitoire à un choc thermique normalement létal suite au pré-conditionnement par un choc thermique subléta. Des travaux ont également montré l'implication des *HSP* dans l'inhibition de la mort cellulaire apoptotique [51]. Toutes ces propriétés font des *HSP* une cible potentiellement intéressante pour les thérapies [52,53].

1.2.3 Le facteur de transcription *HSF1* (*Heat Shock Factor 1*)

Une protéine de type facteur de transcription peut moduler le taux de transcription des protéines cibles en favorisant ou en réprimant la liaison de l'*ARN polymérase* sur les gènes cibles de l'*ADN*. **HSF1** est une protéine facteur de transcription hautement conservée dans les cellules eucaryotes et principalement impliquée dans la réponse transcriptionnelle aux stress protéotoxiques comme le choc thermique, mais aussi dans des mécanismes de régulation liés au métabolisme et au développement [54]. Sous des conditions de stress thermique, *HSF1* forme des trimères et active la transcription des protéines chaperons *HSP* (Fig. 1.3). En absence de stress, *HSF1* subit une régulation négative (séquestration) par les protéines chaperons.

1.2.4 Régulation de la réponse cellulaire au stress thermique

La réponse cellulaire au choc thermique se caractérise principalement par l'activation de la synthèse de protéines de choc thermique *HSP*, qui tentent de réparer les protéines dénaturées induites par l'élévation de la température (Fig. 1.3), parallèlement, la synthèse des autres protéines est inhibée [55]. Nous pourrions penser qu'une solution est de surproduire les *HSP* en permanence pour contrer toute agression le plus rapidement possible, mais cette stratégie ne serait efficace que si la production de ces protéines ne coûterait rien, ce qui n'est pas le cas : la synthèse des *HSP* présente un **coût métabolique** et les ressources énergétiques de la cellule sont limitées. La cellule doit donc, sous des conditions de stress, réparer au mieux les dommages sans pour autant épuiser toutes ses réserves d'énergie [56].

En réalité, en absence de conditions de stress, la concentration des *HSP* dans la cellule reste à son niveau basal nécessaire au bon repliement des protéines nouvellement synthétisées. Les *HSP* forment des complexes avec leur facteur de transcription *HSF1* (*Heat Shock Factor 1*) présent sous forme de monomères pour le séquestrer et empêcher l'activation de leur propre synthèse vu

que la cellule n'en a pas besoin. Sous les conditions de choc thermique, les protéines dénaturées s'accumulent, les *HSP* se dissocient des *HSF1* et tentent de réparer les dommages. Pendant ce temps, les *HSF1* libres passent par des étapes de trimérisation et de phosphorylation avant de devenir actifs et de lancer la transcription de plus de *HSP* en se plaçant sur les promoteurs de ces dernières nommés *HSE* (*Heat Shock Elements*). De cette manière, la cellule produit plus de *HSP* pour replier davantage de protéines endommagées. Une fois que le nombre de protéines dénaturées aura diminué, les *HSP* libres s'associent de nouveau aux *HSF1* pour stopper leur propre production [57, 58]. Ce mécanisme de séquestration de *HSF1* par *HSP*, qui peut être vu comme une **boucle de rétroaction négative**, permet à la cellule de gérer au mieux ses ressources et de répondre d'une manière relativement rapide à l'induction des dommages, ce qui l'aide à préserver plus ou moins son homéostasie en fonction de la sévérité du stress.

1.3 La mort cellulaire

A l'issue d'une exposition au stress, deux cas de figure sont possibles : soit la cellule arrive à se remettre en équilibre en réparant les dommages et survit ; soit, les dommages accumulés dépassent un certain seuil et la cellule se trouve dans l'incapacité de les réparer, la mort cellulaire devient alors inévitable et peut prendre diverses formes. Sous certaines conditions, la cellule peut "choisir" de mourir, si elle est dans l'impossibilité de réparer efficacement les dommages induits, pour protéger les cellules voisines. Ce type de mort est dit programmé, et reste aujourd'hui le mécanisme de mort cellulaire le plus exploré en raison des avantages thérapeutiques qu'il offre [59–61].

L'apoptose et la nécrose sont les deux mécanismes de mort cellulaire les plus largement étudiés. Il est généralement accepté que la cellule meurt par apoptose ou par nécrose dépendamment de la nature et de la sévérité du signal de mort mais aussi du type cellulaire, stipulant que les stress de basses intensités provoquent une mort par apoptose alors que les plus sévères provoquent plutôt une mort par nécrose. Dans le cas du stress thermique, une étude a montré qu'un choc thermique de 60min à 44°C induit majoritairement une mort cellulaire par apoptose des cellules *Jurkat*, alors qu'un choc thermique de même durée à 46°C provoque majoritairement une mort nécrotique [62]. Les notions de bases concernant ces deux modes de mort cellulaire sont brièvement présentées dans ce qui suit.

1.3.1 L'apoptose

L'apoptose est définie comme étant un type de mort cellulaire programmé qui évite l'inflammation et qui joue un rôle critique en parallèle à la mitose dans le maintien de l'équilibre tissulaire. Ce type de mort est dit programmé en raison de son extrême régulation et complexité. Une caractéristique clé de la mort cellulaire apoptotique est l'activation des **caspases** (contraction de *cysteine-dependent aspartate specific proteases*) initiatrices et effectrices. Après des réactions en cascade enclenchées par un signal, les caspases effectrices activées mènent à terme le processus de mort [63].

La morphologie associée à ce type de mort se caractérise par un rétrécissement de la cellule, une condensation du noyau et du cytoplasme et un clivage de la chromatine, alors que la membrane cellulaire reste intacte ; la cellule se désintègre enfin en corps apoptotiques qui sont ingérés par les phagocytes *in vivo*, protégeant ainsi les cellules voisines et évitant éventuellement l'inflammation [64]. *In vitro*, les cellules apoptotiques se détachent des surfaces adhérentes, et l'absence des phagocytes fait que le contenu cellulaire finisse déversé dans le milieu extracellulaire. Il existe deux réseaux principaux de l'apoptose cellulaire : le réseau intrinsèque dit mitochondrial, et le réseau extrinsèque dit réseau du récepteur de mort (*death receptor*). Ces deux voies mènent au

même résultat, à savoir la mort cellulaire et la désintégration de la cellule en corps apoptotiques sous l'action des caspases initiatrices et effectrices évitant le déversement du contenu cellulaire dans le milieu. Les réactions en cascade caractérisant chacune des voies et leurs potentiels points d'intersection sont présentés dans ce qui suit. Ceci permettra d'identifier les espèces et les motifs des interactions au sein du réseau apoptotique.

Réseau intrinsèque de l'apoptose

Contrairement au réseau extrinsèque, le réseau intrinsèque ne repose pas sur les récepteurs de mort mais plutôt sur divers stimuli qui orchestrent des signaux intracellulaires conduisant dans un premier temps à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ces stimuli peuvent être des radiations, des toxines, l'hypoxie, l'hyperthermie, des infections virales et des radicaux libres [65]. Ces signaux enclenchent une cascade de réactions qui passe par l'activation des protéines pro-apoptotiques (favorisant la mort cellulaire) du type *BH3-only* [66] appartenant à la famille *Bcl-2* [67], et qui par la suite vont promouvoir l'activation de *Bax* et *Bak*, d'autres protéines pro-apoptotiques (Fig. 1.4A). Ces deux dernières forment des oligomères dans la membrane externe de la mitochondrie, ce qui la rend perméable et cause la diffusion du *cytochrome-c* et de *Smac/DIABLO*.

Dans le cytoplasme, le *cytochrome-c* se lie à *Apaf-1* et à la *Procaspase-9* pour former un complexe appelé l'*Apoptosome*, conduisant à l'activation de la *Caspase-9* dite initiatrice par clivage de la *Procaspase-9*. La *Caspase-9* active la *Caspase-3* effectrice [68] par un clivage de la *Procaspase-3*. La *Caspase-3* active à son tour la *Caspase-9* [69] en formant une **boucle de rétroaction positive**. L'accumulation de la *Caspase-3* active conduit à la condensation de la chromatine et à la fragmentation de l'*ADN* [70, 71]. La protéine anti-apoptotique *XIAP* inhibe l'apoptose en séquestrant les caspases 9 et 3 [72–74], et *Smac/DIABLO* se lie à *XIAP* pour l'empêcher de ce faire [75].

Il est important de noter que la régulation du processus d'apoptose implique les protéines anti-apoptotiques de la famille *Bcl-2* [67]. En effet, les protéines de cette famille peuvent être pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques et sont les principaux acteurs de la perméabilisation de la membrane mitochondriale ou de sa préservation. Les *BH3-only*, *Bax* et *Bak* que nous avons précédemment cités font partie de cette famille, la protéine *Bcl-2* en fait également partie, mais est en revanche anti-apoptotique et agit en inhibant la perméabilisation de la membrane mitochondriale à travers l'inhibition de l'homodimérisation de *Bax* et de *Bak*. A ce stade, il est inutile de préciser que le processus d'apoptose est hautement régulé et extrêmement complexe.

Réseau extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose se caractérise par des interactions trans-membranaires impliquant les récepteurs de mort de la famille *TNF* (*Tumor Necrosis Factor*) [76]. Ces récepteurs sont dotés d'un "domaine de mort" (*death domain*) qui se trouve au centre de la transmission du signal de mort de la surface cellulaire aux réseaux de signalisation intracellulaires. A chaque récepteur de mort correspondent des ligands de mort (*death ligand*) homologues [77]. Quelques uns des couples ligand/récepteur découverts sont *FasL/FasR*, *TNF- α /TNF-R1* et *TRAIL-R1/DR4*.

A la réception et association avec un ligand de mort homologue, le récepteur de mort recrute des protéines cytoplasmiques adaptatrices qui présentent des domaines de mort similaires, par exemple, l'association *FasL/FasR* recrutera la protéine adaptatrice *FADD*. Conséquemment, ces protéines adaptatrices s'associent par dimérisation avec les *Procaspases-8* et forment le complexe *DISC* (*Death-Inducing Signalling Complex*), ce qui résulte par l'activation de la *Caspase-8* initiatrice via l'auto-activation catalytique de la *Procaspase-8* [65] (Fig. 1.4). Une fois la *Caspase-*

8 activée, elle active la *Caspase-3* effectrice et les deux forment une boucle de rétroaction positive. La voie extrinsèque de l'apoptose est inhibée par la protéine *c-FLIP* qui peut séquestrer les protéines adaptatrices *FADD* et la *Caspase-8* [65,78] (Fig. 1.4B).

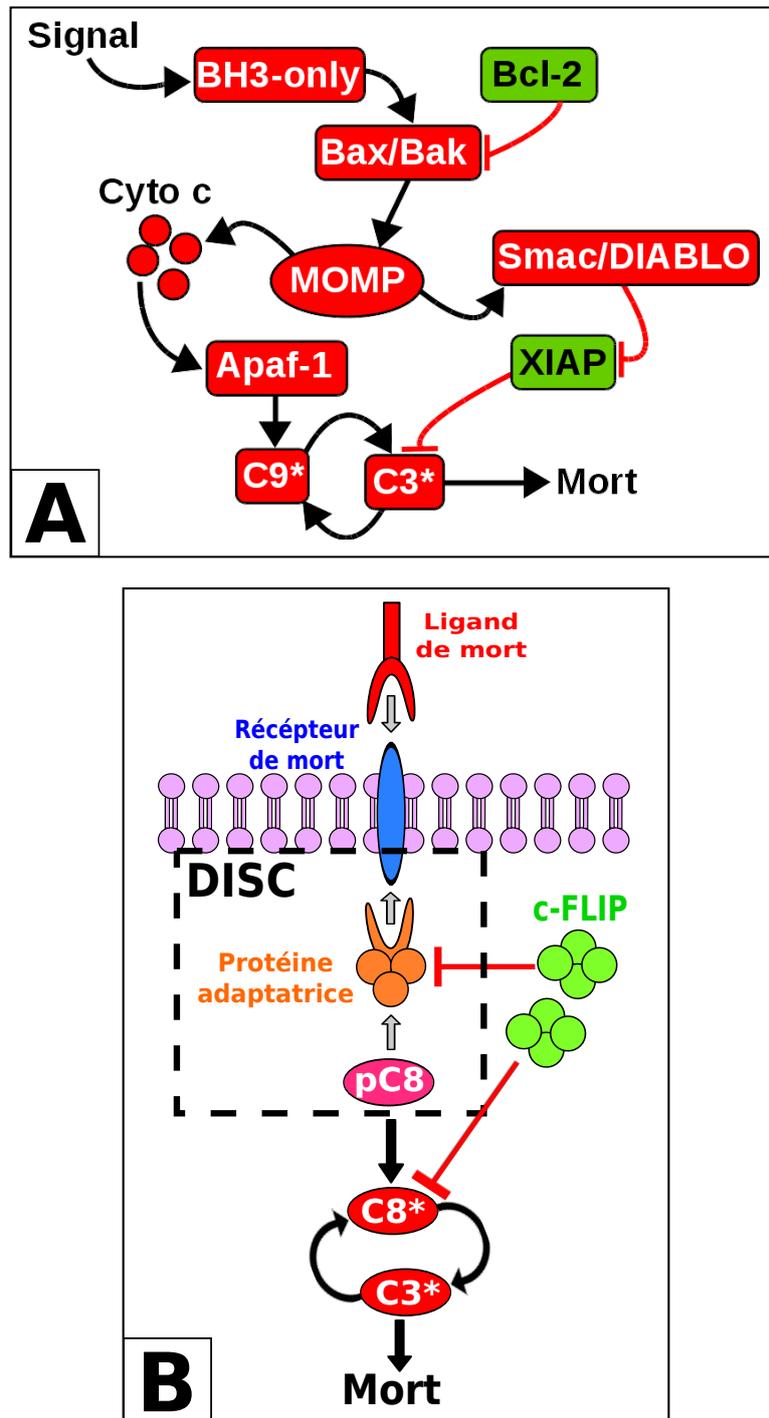


FIGURE 1.4 – Schéma des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose dans les cellules mammifères. Les flèches noires symbolisent une régulation positive (activation) et les flèches rouges à tête plate une régulation négative (inhibition), les flèches grises représentent une association. MOMP=Mitochondria Outer Membrane Permeabilization (perméabilisation de la membrane mitochondriale externe). A- Schéma de la voie intrinsèque de l'apoptose. B- Schéma de la voie extrinsèque de l'apoptose.

Convergence des deux voies apoptotiques

Les deux réseaux de l'apoptose cellulaire convergent dans la phase de l'exécution du processus assurée par la *Caspase-3* (les caspases 6 et 7 sont également des caspases effectrices, cependant, la *Caspase-3* reste la plus largement étudiée). La *Caspase-3* active les *endonucléases* et les *protéases* qui dégradent respectivement l'*ADN* et les protéines nucléaires ainsi que du cytosquelette. La rétroaction positive entre la *Caspase-3* et les caspases initiateuses garantit l'**irréversibilité du processus** [79]. Les voies intrinsèque et extrinsèque peuvent également être interconnectées : la *Caspase-8* peut activer *Bid* (protéine pro-apoptotique de type *BH3-only*), ce qui induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale et les réactions en cascade qui en découlent se terminant par l'activation de la *Caspase-3*, de même que pour la voie intrinsèque [80, 81].

1.3.2 La nécrose

La nécrose quant à elle désigne la mort cellulaire non-apoptotique dite "accidentelle", elle se distingue principalement de l'apoptose par le gonflement de la cellule jusqu'à la rupture de la membrane et du déversement du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire, provoquant ainsi une réponse inflammatoire [64]. Bien que la nécrose soit considérée comme un mode de mort incontrôlé et "aléatoire", plusieurs études affirment qu'il existe en réalité des mécanismes de régulation de la nécrose [82, 83], et que ce type de mort peut très bien être programmé, introduisant le terme "nécroptose".

Les voies de l'apoptose et de la nécroptose peuvent interagir entre elles par le biais des molécules impliquées dans leurs voies de signalisation respectives. Par exemple, la *Caspase-8* (initiatrice) activée dans la voie extrinsèque de l'apoptose peut inhiber la nécroptose en désactivant *RIPK1* et *RIPK3* [84]. En outre, l'*ATP* joue un rôle essentiel dans la détermination du type de mort cellulaire car le processus d'apoptose a besoin d'une grande quantité d'*ATP* pour être réalisé, contrairement à la nécrose [85], ce qui fait que le type de mort peut changer en fonction des niveaux d'*ATP* disponible.

1.4 Variabilité cellulaire et mort fractionnelle

La variabilité cellulaire et son impact sur la réponse d'une colonie de cellules à un même stress est une notion centrale de la problématique thérapeutique. Dans ce qui suit, les sources de variabilité les plus connues sont présentées. Ce phénomène n'est pas exclusivement lié au stress thermique, et il constitue un obstacle majeur pour les différentes classes de thérapies à travers l'hétérogénéité de la réponse. Cependant, cette variabilité cellulaire n'a pas forcément que des inconvénients. En effet, en dehors du cadre thérapeutique, nous pourrions imaginer une situation caricaturale où une population de cellules saines sont exposées à un quelconque stress :

- Si toutes les cellules sont rigoureusement identiques, soit elles réussissent toutes à survivre, soit elles meurent toutes et le tissu cellulaire qu'elles composent disparaît.
- Si par contre les cellules sont différentes, nous aurions plus de chances d'avoir une fraction survivante pouvant potentiellement reproduire la population.

1.4.1 Bruit intrinsèque et extrinsèque

La variabilité cellulaire aussi appelée bruit cellulaire [86] se traduit par le fait que même dans une population de cellules génétiquement identiques et qui appartiennent au même tissu, chaque cellule est unique par sa taille, sa forme, son niveau de protéines, *etc.* Ce bruit peut impacter significativement des processus tels que la réponse au stress et l'évolution du cycle cellulaire. Le bruit cellulaire peut être séparé en deux catégories : le bruit intrinsèque et le bruit extrinsèque [87]. Le bruit intrinsèque s'exprime à travers la stochasticité naturelle des réactions

biochimiques cellulaires telles que la formation de complexes protéiques, la transcription et la traduction au sein d'une même cellule. Le bruit extrinsèque quant à lui, désigne la variabilité dans le contenu cellulaire entre plusieurs cellules comme par exemple la concentration d'une protéine donnée. Ces deux types de bruit contribuent ensemble à la variabilité cellulaire globale [88].

1.4.2 Hétérogénéité du contenu cellulaire

L'une des facettes de la variabilité est la différence dans les concentrations des composants cellulaires entre les cellules d'une même population. Ces composants peuvent être des protéines [89, 90] ou d'autres organites. Des travaux ont par exemple montré que la variabilité de la masse mitochondriale due au partage non équitable des mitochondries au moment de la division cellulaire peut influencer le taux de transcription global et donc la concentration des protéines à travers les niveaux d'*ATP* [91–93]. Cette hétérogénéité peut significativement impacter le destin cellulaire après une exposition au stress dans le sens où chaque cellule aura une réponse dynamiquement différente en fonction de ses composants clés impliqués [94]. Dans le cas du stress thermique, nous explorons l'hypothèse qu'une variabilité des niveaux des protéines chaperons *HSP* au moment de l'exposition peut entraîner une différence de réponse et du destin cellulaire résultant dans le chapitre 5.

1.4.3 Asynchronie dans le cycle cellulaire

Une autre facette de la variabilité cellulaire correspond à l'asynchronie dans le cycle cellulaire. Dans une population, les cellules ne sont pas naturellement synchronisées et se trouvent dans différentes phases du cycle. En fonction de la nature du stress, et des phases du cycle dans lesquelles elles se trouvent au moment de l'exposition, les cellules peuvent se montrer résistantes ou sensibles [95, 96]. Par exemple, pour le stress thermique, les cellules des mammifères sont les plus sensibles en phase *M* du cycle cellulaire (mitose) et sont plus résistantes en phase *G1*. En outre, la production des chaperons *HSP70* varie dépendamment des phases du cycle [97]. Pour une population cellulaire asynchrone, une variabilité de la réponse au stress peut donc être constatée.

1.4.4 Mort fractionnelle

Dans une colonie cellulaire monoclonale, chaque cellule est néanmoins unique de par ses caractéristiques biochimiques, son protéome, et sa position dans le cycle cellulaire. Si cette colonie est soumise à un stress de quelconque nature, cette hétérogénéité se traduit en une différence de réponse du point de vue dynamique [98–100]. De ce fait, une fraction de la population cellulaire survit alors que l'autre meurt. La mort fractionnelle se définit donc comme étant cette **différence de destin cellulaire** dans une colonie clonogénique à l'issue d'une exposition au même stress. Ce phénomène est clairement constatable sur les courbes de survie cellulaire résultantes des études dosimétriques.

Prenons une vision très simplifiée de la problématique dans le cas du stress thermique comme exemple : nous pouvons imaginer une situation où une cellule aurait deux fois plus de protéines réparatrices *HSP* qu'une autre cellule de la même population, et en cas de choc thermique, la première est donc plus avantagée vu qu'elle peut immédiatement commencer la renaturation des protéines dénaturées en s'affranchissant du délai nécessaire pour la transcription (régulée par *HSF1*) et la traduction des *HSP*, délai qui peut être décisif sachant que si les dommages accumulés dépassent un certain seuil, cela enclenche des réactions en cascade ayant pour issue la mort cellulaire.

Plus concrètement, une étude a également trouvé une corrélation entre la masse mitochondriale et la concentration des protéines apoptotiques [93] qui peut expliquer l'hétérogénéité dans la réponse cellulaire de mort/survie à des doses du ligand de mort *TRAIL*. *In vivo*, nous pouvons avoir d'autres causes d'acquisition de résistance au stress et de mort fractionnelle comme l'hétérogénéité du micro-environnement tumoral [101].

1.5 Modélisation des réseaux intracellulaires de signalisation

Il est possible de voir la cellule comme un système dans lequel les protéines et autres composants assurent diverses tâches liées aux fonctions cellulaires essentielles telles que la gestion des ressources énergétiques, le maintien de l'intégrité, le transport membranaire, *etc.* Pour ce faire, les protéines interagissent au sein de réseaux de signalisation qui présentent souvent des entrecroisements. La modélisation mathématique de ces réseaux nous permet de mieux comprendre leur fonctionnement, d'identifier les acteurs clés pour les simplifier, de réaliser des prédictions vérifiables expérimentalement, et de repérer des cibles potentielles pour les thérapies.

1.5.1 Circuits biologiques de signalisation

Les réseaux biologiques sont très complexes en raison des nombreux types de macromolécules, de mécanismes d'interactions et d'entrecroisements qu'ils comportent. Caricaturalement, les acteurs impliqués interagissent entre eux soit par une action d'activation, soit par une action d'inhibition, et chaque action est caractérisée par un taux représentant son intensité. A titre d'exemple, pour ce qui est de la réponse cellulaire générale au stress, nous pouvons schématiser le réseau de réponse comme suit (Fig. 1.5) :

1. Le stress induit des dommages (D) qui activent les réseaux de réparation (R) et de mort.
2. Les réseaux de réparation (R) essaient de maîtriser les dommages (D) et d'inhiber les réseaux de mort, directement ou indirectement (à travers la réparation des dommages), pour que la cellule survive.
3. Les réseaux de mort activés par les dommages s'auto-activent pour qu'une fois le point de non retour atteint, la décision de mort soit irréversible.

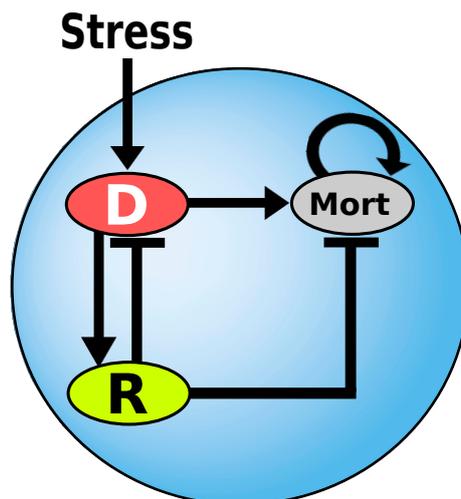


FIGURE 1.5 – Schéma simplifié du réseau de réponse cellulaire au stress. Les flèches ($=>$) indiquent une activation, et les flèches ($=|$) une inhibition. D symbolise les dommages induits et R les réseaux de réparation.

En réalité, les molécules d'un réseau biologique s'associent, se dissocient, coopèrent pour réaliser des tâches, forment des boucles de rétroaction positives et négatives, *etc.* Quand on s'intéresse

à la modélisation d'un certain phénomène biologique, nous devons déterminer les acteurs constituant le réseau causant le phénomène observé, les natures de leurs interactions biochimiques, ainsi que les taux régissant ces interactions (taux de synthèse, de dégradation, d'activation, *etc.*) et qui seront les paramètres du modèle. Ensuite, à travers des lois mathématiques, comme la **loi d'action de masse** typiquement, le réseau peut être traduit en un système d'équations différentielles couplées qui permet d'analyser la dynamique des variables à travers leurs concentrations moléculaires en réponse à un stimulus. Les paramètres non déterminés peuvent être estimés par optimisation et calibration du modèle pour qu'il reproduise des mesures expérimentales.

1.5.2 Modélisation dynamique des réseaux biologiques

Dans les modèles dynamiques de réseaux biologiques, les espèces ont des concentrations initiales déterminées, et les prédictions de la variation de ces concentrations requiert la connaissance des taux régissant les réactions entre ces espèces. Les taux de réaction dépendent des concentrations des réactifs mais aussi des conditions environnementales comme la température et le pH [102]. L'évolution temporelle de la concentration de chaque espèce est mathématiquement modélisée, via la loi d'action de masse, par une équation différentielle en fonction des réactions dans lesquelles l'espèce est impliquée et de leurs taux respectifs. Dans les modèles dynamiques de survie cellulaire que nous utiliserons dans nos travaux, la concentration de certaines espèces peut être considérée comme un indicateur de mort, ou peut également être utilisée dans une fonction probabiliste donnant une fraction de survie.

Une fois que le modèle est ajusté (taux de réactions fixés par mesure ou par optimisation), les simulations numériques nous permettent d'étudier l'évolution temporelle des concentrations des différentes espèces du modèle en réponse à la perturbation d'un paramètre (par exemple, l'évolution des concentrations de *HSF1* et de *HSP* en réponse à une élévation de température), et donc de réaliser des prédictions plus ou moins précises quant à l'issue d'une expérimentation. Quand le stimulus est constant et pour un temps d'observation suffisamment long, les modèles dynamiques biologiques peuvent atteindre un point fixe dans lequel les concentrations de toutes les variables du système sont constantes, ou peuvent également effectuer des oscillations infinies. Dans nos modèles qui seront présentés par la suite, le signal désigne la variation de la température dans le cadre d'une exposition au stress thermique.

1.5.3 Boucles de rétroaction

Les réseaux biologiques de signalisation sont composés de motifs récurrents, et l'un des motifs les plus simples est la boucle de rétroaction. Une rétroaction est par définition l'action d'un effet sur sa propre cause, les espèces formant ce genre de boucle vont donc interagir avec d'autres espèces qui en sont à l'origine, comme par exemple une interaction entre une protéine et son propre facteur de transcription. Les boucles de rétroaction permettent aux systèmes biologiques d'avoir des comportements particuliers nécessaires dans l'accomplissement des divers procédés aussi bien liés à la survie et à la prolifération qu'à la mort. Il existe deux types de boucles de rétroaction, les positives et les négatives, indépendamment du nombre d'espèces qui les forment. Il existe également des boucles avec une seule espèce qui va s'auto-réguler par activation ou par inhibition. Par ailleurs, en raison de leur impact sur le déterminant de la matrice jacobienne du système auquel elles appartiennent, les boucles de rétroaction impactent également sa stabilité [103, 104].

Dans une boucle de rétroaction négative, une espèce s'auto-inhibe ou inhibe son activateur. Elle présente deux fonctions principales : la première est qu'elle permet aux systèmes d'atteindre leurs états stables plus rapidement (**accélération de la réponse**) [105], caractéristique qui est d'ailleurs très avantageuse dans le cas d'une réponse à un stress transitoire, une observation

expérimentale de cela concerne le système *SOS* de réparation de l'*ADN* dans la bactérie *E. coli* [106]. La seconde est qu'elle permet aussi, dans le cas où le taux de la rétroaction est assez élevé, d'engendrer des oscillations du système [107], un exemple étant l'activité du facteur de transcription *NF-κB* [108].

Contrairement à la boucle de rétroaction négative, une espèce s'auto-active ou active son activateur dans une boucle positive, également de manière directe ou indirecte. Ces boucles peuvent donner divers comportements au système en fonction de leurs paramètres. Elles peuvent retarder les réponses, comme démontré dans des réseaux synthétiques d'expression génétique de *E. coli* [109], provoquer de l'ultra-sensibilité vis-à-vis des petits changements du signal, mais elles peuvent surtout produire de la **bistabilité** (existence de deux états stables du système) [110,111], cette dernière est une notion centrale dans la prise de décision cellulaire. Le cas des caspases initiateuses et effectrices de l'apoptose est un bon exemple, présentant une bistabilité (état de survie et état de mort) à caractère irréversible.

1.5.4 Estimation des paramètres du modèle

L'estimation des paramètres du modèle représente l'une des étapes les plus cruciales, car la qualité de la calibration est directement liée au pouvoir prédictif. Certains paramètres peuvent être expérimentalement mesurés tels que les taux de dégradation des protéines que nous pouvons déterminer à partir de leurs temps de demi-vie. Les autres paramètres peuvent être estimés via l'ajustement de données expérimentales en utilisant des fonctions de score, qui doivent être minimisées ou maximisées, comme par exemple l'erreur quadratique moyenne **RMSE** utilisée dans nos opérations et qui est définie comme suit :

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{i,sim} - X_{i,exp})^2}{n}} \quad (1.2)$$

où $X_{i,sim}$ et $X_{i,exp}$ sont respectivement les résultats issus des simulations et des expérimentations, n est le nombre de points des données. Plus l'écart entre $X_{i,sim}$ et $X_{i,exp}$ est faible, moins élevé est le score **RMSE**, et meilleur est l'ajustement et donc la calibration du modèle.

Cette fonction de score peut être couplée à des algorithmes d'optimisation basés sur la méthode des moindres carrés tels que l'algorithme de *Levenberg-Marquardt*, visant à minimiser l'écart entre les prédictions du modèle et les données. L'optimisation peut être locale au voisinage (défini) d'une valeur de paramètre prise comme valeur initiale, ou globale sur la totalité de l'espace de définition. Par ailleurs, il n'est pas du tout rare dans les expérimentations biologiques que les résultats de plusieurs expériences d'une même étude soient quantitativement différents, et dans ce cas, une solution est de prendre la moyenne des données ou d'effectuer une pondération favorisant les données dans lesquelles nous avons le plus confiance et qui auront donc une contribution élevée dans l'estimation des paramètres.

1.5.5 Séparation des échelles de temps

L'une des caractéristiques fondamentales des systèmes biologiques est que les procédés qui s'y opèrent le font avec des échelles de temps significativement différentes. Par exemple, en réponse à un stimulus, la phosphorylation d'un facteur de transcription peut se faire en moins d'une seconde, ce facteur de transcription une fois activé se lie à son site sur l'*ADN* en quelques secondes, la transcription et traduction des gènes ciblés se passe en quelques minutes, et l'accumulation des protéines produites peut prendre plusieurs minutes à plusieurs heures. En conséquence, si nous nous intéressons par exemple à la dynamique d'accumulation des protéines uniquement, le procédé de phosphorylation du facteur de transcription, qui est de loin le plus rapide de la chaîne, peut être omis, et nous pouvons considérer que le facteur de transcription est activé

instantanément par le stimulus.

Ainsi, pour modéliser un système dont les procédés ont des échelles temporelles différentes, l'échelle de temps du procédé le plus "intéressant" pour l'étude sera prise comme référence, et de là [102] :

1. Les procédés largement (au moins un ordre de grandeur de différence) plus lents peuvent être considérés comme invariants : les variables impliquées deviennent des constantes.
2. Les procédés largement plus rapides peuvent être considérés comme instantanés : pour ce faire, les approximations de l'équilibre rapide ou de l'état quasi-stationnaire sont utilisées.

Cette séparation des échelles de temps permet de simplifier, par des approximations raisonnablement précises, le modèle initial en réduisant sa dimensionnalité tout en préservant son comportement dynamique. La réduction des modèles facilite leur manipulation, permet d'identifier les facteurs clés du phénomène modélisé, et fait gagner un temps de calcul considérable.

1.6 Plan

Ce premier chapitre introduit les différentes notions qui sont utiles pour la suite. Nos travaux se focalisent sur la réponse cellulaire au choc thermique, aussi bien sur l'aspect dynamique de la réponse centré sur les variables clés, que sur le destin cellulaire de mort ou de survie à l'issue de l'exposition à des stress de différentes sévérités.

Le chapitre 2 présente une étude de l'effet de la forme temporelle du stress thermique sur cette réponse dans un cadre de dosimétrie thermique à iso-effet biologique en utilisant un modèle de réseau de réponse au choc thermique (*RRCT*) couplé à une équation de population comportant une fonction de mort probabiliste.

Dans le chapitre 3, le modèle précédemment mentionné est réduit, et utilisé par la suite dans l'étude de la potentielle synergie entre le choc thermique et l'inhibition des chaperons *HSP*, puis dans la reproduction des données de survie cellulaire au stress thermique de plusieurs lignées.

Le chapitre 4 traite la modélisation de la voie apoptotique de la mort cellulaire qui doit aboutir sur une réponse binaire décrivant le destin d'une cellule unique. Nous utilisons ensuite ce modèle de l'apoptose dans le chapitre 5 en le couplant au modèle *RRCT*, pour réaliser une étude de la variabilité de la réponse au sein d'une colonie de cellules exposées à un même stress en y ajoutant une différence de concentration sur les protéines clés du réseau de réponse.

Enfin, nous développons dans le chapitre 6 un modèle réduit générique de la réponse au stress que nous utilisons dans l'étude de la réponse cellulaire au stress transitoires de durées et d'intensités variables à travers l'analyse des courbes iso-effet.

Chapitre 2

Effets de la forme temporelle du stress thermique sur la survie cellulaire

2.1 Introduction

L'hyperthermie a largement été utilisée comme traitement anti-cancer [112], particulièrement en combinaison avec la chimiothérapie [113, 114] ou la radiothérapie [112, 115], et des études ont montré que l'hyperthermie peut améliorer le rendement de l'immunothérapie [8, 116, 117]. A l'intérieur des cellules, le choc thermique cause la dénaturation des protéines et donc la perte de leur fonction, ce qui peut amener à un dysfonctionnement cellulaire et potentiellement à la mort [118]. Adoptant une méthode heuristique d'analyse de régression des courbes de survie cellulaire en réponse à une impulsion de stress thermique, un outil standard de détermination de la dose thermique, le *Cumulative Equivalent Minutes at 43°C (CEM43)*, a été développé [16] et reste énormément utilisé, même dans le cas les profils temporels de température complexes comportant des variations rapides et irrégulières.

En parallèle, les voies intracellulaires de signalisation, de régulation et de réparation impliquées dans la réponse à l'hyperthermie ont été largement caractérisées [119–121], et des modèles mathématiques du réseau de réponse au choc thermique (*RRCT*) orientés par les données expérimentales ont été établis [122–124]. Les modèles dynamiques du *RRCT* offrent la possibilité de simuler et prédire l'évolution temporelle des protéines dénaturées, des chaperons *HSP*, et de leurs facteurs de transcription *HSF1*, en réponse à n'importe quel profil temporel de dose thermique singulière. L'étude quantitative de la dynamique intracellulaire peut donc être exploitée pour déduire la réponse de survie cellulaire à des conditions de stress temporellement variables.

Dans cette étude, nous revisitons le concept de dose thermique dans un cadre de dynamique des réseaux de réponse au stress. Pour ce faire, nous construisons un modèle mathématique couplant le *RRCT* à une équation de population probabiliste pour définir les courbes de survie cellulaire en réponse à des profils temporels d'hyperthermie de forme rectangulaire (impulsions) [1] et avec une précision similaire à celle du *CEM43*. Néanmoins, le comportement dynamique d'un modèle de réseau implique une réponse de survie qui peut être sensible à la forme du profil temporel du protocole d'hyperthermie puisque le système est caractérisé, entre autres, par ses échelles de temps.

En effet, nos simulations et expériences *in vitro* montrent que pour une dose thermique *CEM43* donnée, un protocole caractérisé par une élévation rapide de la température suivie par une baisse lente peut être jusqu'à deux fois plus létal qu'un autre présentant une élévation lente suivie par une baisse rapide. Ce phénomène contredit formellement les prédictions du *CEM43*, et est désigné sous le nom d'**effet d'asymétrie**. Enfin, une fixation de l'activité transcriptionnelle

de *HSF1* dans les simulations montre que la régulation de la production des protéines chaperons par leur facteur de transcription n'est pas le mécanisme responsable de cet effet.

Pour clarifier notre méthodologie, les étapes de l'étude sont présentées dans la figure (2.1). La première étape consiste à calibrer le modèle mathématique de survie cellulaire en réponse au stress thermique développé pour reproduire les mesures expérimentales de fraction de survie de la lignée *HeLa*. Par la suite, le modèle est utilisé dans la simulation de l'effet d'asymétrie en réponse à deux protocoles thermiques temporellement symétriques (et donc, portant la même dose *CEM43*) dans la deuxième étape. Enfin, dans la troisième étape, nous validons expérimentalement l'effet d'asymétrie prédit.

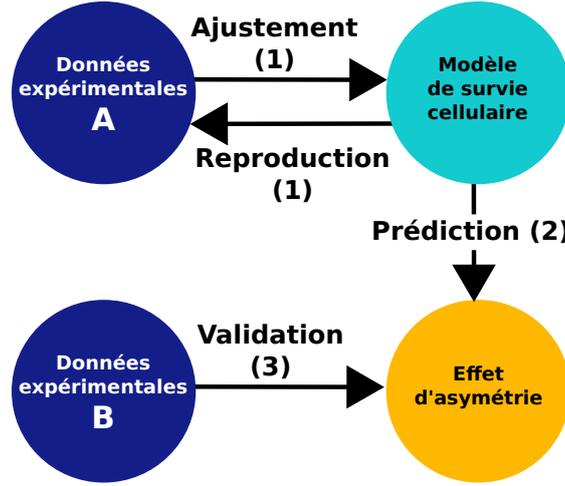


FIGURE 2.1 – Schéma représentatif des étapes méthodologiques de l'étude. Les données expérimentales sont en bleu foncé, la modélisation mathématique en bleu clair et les prédictions du modèle en orange. Les nombres entre parenthèses désignent l'ordre des étapes.

2.2 Modèle dynamique de la survie cellulaire en réponse au stress thermique

Dans cette partie, un modèle de survie cellulaire à l'issue d'un choc thermique est réalisé en utilisant un modèle du réseau de réponse au stress thermique déjà élaboré [122] auquel une équation de population est ajoutée. Une fois calibré par des données expérimentales, nous utilisons le modèle résultant de ce couplage pour réaliser des prédictions de l'effet de la forme temporelle d'un protocole hyperthermique sur la réponse cellulaire de mort ou de survie.

2.2.1 Modèle dynamique du réseau cellulaire de réponse au stress thermique *RRCT*

La modélisation du *RRCT* comporte le facteur de transcription (*Heat Shock Factor 1*, *HSF1*), les protéines chaperons (*Heat Shock Proteins*, *HSP*), le complexe de séquestration (*HSF1 : HSP*), les protéines dénaturées (*Misfolded Proteins*, *MFP*), le complexe de renaturation (*MFP : HSP*) et le contenu protéique cellulaire (*P*) [122] (Fig. 2.2). Le taux de dénaturation $\kappa_d(T)$ est approximé dans l'intervalle de température 37 – 45°C par [125] :

$$\kappa_d(T) = k_d (1 - 0,4 e^{37-T}) 1,4^{T-37} \quad (2.1)$$

où T représente la température exprimée en °C. Le taux de dénaturation est le seul paramètre qui dépend directement de la température dans le réseau.

En outre, ce modèle ne prend pas en compte les réactions de trimérisation et phosphorylation de *HSF1*, ainsi que la dynamique de liaison de *HSF1* à l'ADN, les considérant comme des réactions rapides. Le procédé de renaturation des protéines dénaturées est décrit par une fonction de *Michaelis-Menten* (Annexe F) pour considérer les ressources énergétiques limitées causant une saturation :

$$R_N(HSP : MFP) = k_r \frac{[MFP : HSP]}{K_M + [MFP : HSP]} \quad (2.2)$$

Enfin, le procédé de transcription des chaperons *HSP* régulée par *HSF1* est décrit par une fonction de *Hill* (Annexe E) :

$$T_r(HSF1) = \lambda_{HSP} \frac{[HSF1]^3}{P_0^3 + [HSF1]^3} \quad (2.3)$$

où le paramètre (P_0) définit le seuil de régulation et (λ_{HSP}) le taux maximal de transcription régulée des *HSP*.

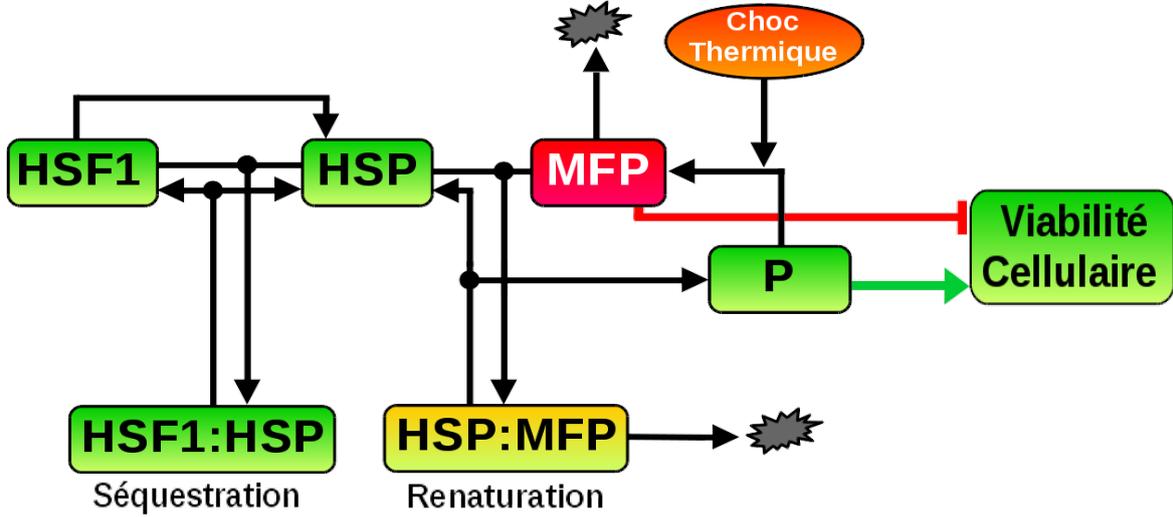


FIGURE 2.2 – Schéma du modèle de réseau de réponse au choc thermique *RRCT*. Les protéines thermosensibles (P) se dénaturent sous l'action de l'hyperthermie et deviennent défectueuses (MFP). $HSF1$ et HSP se dissocient : les HSP se lient aux MFP pour tenter de les réparer pendant que les $HSF1$ activent la transcription de plus de HSP . Une fois les protéines dénaturées maîtrisées (réparées ou dégradées), les HSP s'associent de nouveau aux $HSF1$ pour inhiber leur propre production devenue inutile. Les protéines dénaturées MFP induisent la mort cellulaire (flèche rouge), les protéines fonctionnelles P contribuent à la survie (flèche verte).

Le *RRCT* comporte divers procédés de régulation tels que la transcription, la dégradation, la multimérisation, la dénaturation et la renaturation qui peuvent être formulées comme un ensemble de réactions biochimiques, ce qui amène à un système d'équations différentielles ordinaires couplées de 7 variables et 19 paramètres. Le tableau (2.1) contient les réactions biochimiques du système et les taux correspondants. Les paramètres δ_u sont les taux linéaires de dégradation (u indique l'espèce), les K_u^\pm sont les constantes cinétiques de l'hétérodimérisation et les μ_u sont les taux basaux de transcription, P_T désigne la concentration totale des protéines P (considérée constante). Le tableau (2.2) présente les 19 paramètres du modèle et leurs estimations.

Dans ce système, l'élévation de la température dénature les protéines avec un taux $\kappa_d(T)$, les HSP disponibles libres ou formant un complexe avec $HSF1$ vont se lier aux protéines dénaturées MFP et tenter de les réparer pendant que les $HSF1$ libres vont activer la production de plus de

chaperons *HSP* pour que la cellule puisse garder le rythme face à l'induction des dommages. Si le procédé de renaturation des protéines endommagées est un succès, les *HSP* se dissocient de ces protéines redevenues fonctionnelles et séquestrent à nouveau *HSF1* pour stopper leur propre transcription. Si au contraire la renaturation échoue, les *HSP* vont marquer les protéines dénaturées non réparées pour qu'elles soient dégradées car ces dernières présentent un risque toxique. Cependant, étant donné que les protéines réalisent divers procédés cellulaires potentiellement critiques, la dégradation des protéines non réparées implique que certaines fonctions ne sont plus assurées, et présente donc une perte pour le bon fonctionnement cellulaire.

TABLE 2.1 – Liste des réactions biochimiques et des taux correspondants

#	Réaction biochimique	Taux de réaction
R1	$\emptyset \longrightarrow P$	$\mu_P = \delta_P P_T$
R2	$\emptyset \longrightarrow HSF1$	μ_{HSF1}
R3	$\emptyset \longrightarrow mHSP$	$\mu_{HSP} + \lambda_{HSP} \frac{[HSF1]^3}{P_0^3 + [HSF1]^3}$
R4	$mHSP \longrightarrow mHSP + HSP$	$\beta_{HSP} [mHSP]$
R5	$P \longrightarrow \emptyset$	$\delta_P [P]$
R6	$HSF1 \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{HSF1} [HSF1]$
R7	$mHSP \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{mHSP} [mHSP]$
R8	$HSP \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{HSP} [HSP]$
R9	$MFP \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{MFP} [MFP]$
R10	$MFP : HSP \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{MFP:HSP} [MFP : HSP]$
R11	$HSF1 : HSP \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{HSF1:HSP} [HSF1 : HSP]$
R12	$MFP + HSP \longrightarrow MFP : HSP$	$K_{MFP:HSP}^+ [MFP] [HSP]$
R13	$HSF1 + HSP \longrightarrow HSF1 : HSP$	$K_{HSF1:HSP}^+ [HSF1] [HSP]$
R14	$HSF1 : HSP \longrightarrow HSF1 + HSP$	$K_{HSF1:HSP}^- [HSF1 : HSP]$
R15	$MFP : HSP \longrightarrow P + HSP$	$k_r \frac{[MFP:HSP]}{K_M + [MFP:HSP]}$
R16	$P \longrightarrow MFP$	$\frac{\kappa_d(T)}{P_T} [P]$

La figure (2.3) montre les tracés dynamiques des *MFP*, *HSP* et *HSF1* en réponse à une marche de stress de différentes températures, les variables évoluent donc vers leurs valeurs au point fixe. Quand la température augmente, la concentration des protéines dénaturées augmente également, et la concentration des *HSP* libres diminue conséquemment, puisque les chaperons vont s'associer aux *MFP* pour les renaturer et la concentration de ses dernières commence à diminuer. Parallèlement, la concentration des *HSF1* libres augmente en raison de leur dissociation des *HSP*, et la concentration des chaperons augmente du fait de l'activation de leur transcription par *HSF1*. L'augmentation de la concentration des chaperons entraîne la diminution de la concentration des protéines dénaturées, puis celle de *HSF1* à cause de la rétroaction négative des *HSP*. Ce motif cause-effet se répète jusqu'à l'atteinte du point fixe.

TABLE 2.2 – Paramètres estimés du *RRCT*

Paramètre	Définition	Valeur
P_T	concentration totale des protéines	4500 (μM)
δ_P	taux de dégradation des protéines	0,069 (h^{-1})
$\ln(2)/\delta_{HSF1}$	demi-vie de <i>HSF1</i>	19,21 (h)
$\ln(2)/\delta_{mHSP}$	demi-vie de <i>mHSP</i>	7,69 (h)
$\ln(2)/\delta_{HSP}$	demi-vie de <i>HSP</i>	14,71 (h)
$\ln(2)/\delta_{HSF1:HSP}$	demi-vie de <i>HSF1 : HSP</i>	17,54 (h)
$\ln(2)/\delta_{MFP:HSP}$	demi-vie de <i>MFP : HSP</i>	11,02 (h)
$\ln(2)/\delta_{MFP}$	demi-vie de <i>MFP</i>	3,694 (h)
μ_{HSF1}	taux de transcription basal de <i>HSF1</i>	8,178E-05 ($\mu M h^{-1}$)
μ_{HSP}	taux de transcription basal de <i>HSP</i>	6,124E-06 ($\mu M h^{-1}$)
λ_{HSP}	taux maximal de la transcription régulée de <i>HSP</i>	224,2 ($\mu M h^{-1}$)
P_0	seuil de régulation de la transcription de <i>HSP</i>	0,0144 (μM)
β_{HSP}	taux de traduction de <i>HSP</i>	3.720 (h^{-1})
$K_{HSF1:HSP}^+$	affinité d'association de <i>HSP : HSF1</i>	60,07 ($\mu M^{-1} h^{-1}$)
$K_{HSF1:HSP}^-$	taux de dissociation de <i>HSP : HSF1</i>	24,80 (h^{-1})
$K_{MFP:HSP}^+$	affinité d'association de <i>MFP : HSP</i>	274,6 ($\mu M^{-1} h^{-1}$)
k_d	taux de dénaturation des protéines	13,30 ($\mu M h^{-1}$)
k_r	taux maximal de renaturation des protéines	101,8 ($\mu M h^{-1}$)
K_M	constante de <i>Michaelis-Menten</i> de renaturation	0,9409 (μM)

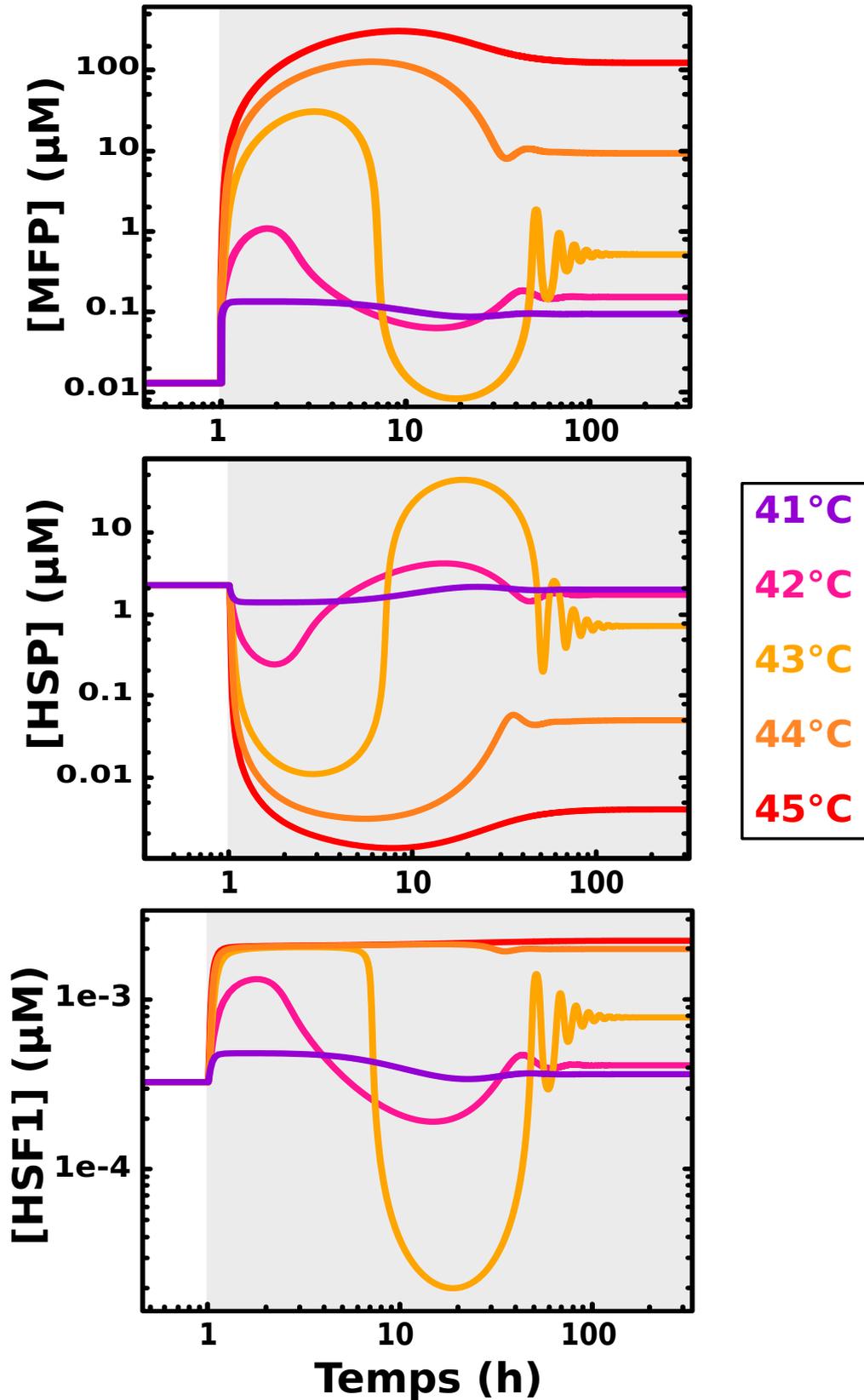


FIGURE 2.3 – Évolution temporelle des variables clés du modèle *RRCT* en réponse à une marche de stress thermique. Les concentrations sont en (μM) et le temps en heures. Les températures appliquées vont de 41 à 45°C (voir code couleur). La zone grise représente la fenêtre temporelle dans laquelle le stress thermique est appliqué (profil temporel de type "marche").

2.2.2 Couplage du modèle *RRCT* à une équation de population

Un modèle basé sur des équations différentielles et décrivant la survie cellulaire en réponse au choc thermique est établi en couplant le modèle dynamique du *RRCT* des cellules *HeLa* [122] à une équation de population (Fig. 2.4) :

$$\frac{d\vec{X}}{dt} = \vec{F}(\vec{X}, T) \quad (2.4)$$

$$\frac{dN}{dt} = \gamma N - \kappa(\vec{X}) N \quad (2.5)$$

où : \vec{X} représente un vecteur de concentrations des espèces et T représente la température. L'équation (2.4) décrit les interactions dynamiques entre les protéines thermosensibles, les protéines chaperons *HSP* et les facteurs de transcription *HSF1*. Dans les conditions normales à 37°C, les *HSF1* sont séquestrés par les *HSP* ; dans les conditions de choc thermique, les *HSP* se dissocient des *HSF1* pour s'associer aux protéines dénaturées et tentent de les réparer pendant que les *HSF1* activent la transcription de plus de *HSP*. Tous les paramètres du système d'équations résultant ont été fixés (Table. 2.2) [122]. L'équation de population (2.5) décrit l'évolution temporelle du nombre N des cellules viables, γ représente le taux de prolifération et κ le taux de mortalité. Dans les conditions normales, N est considéré comme ayant une augmentation exponentielle, et la baisse de prolifération due à l'inhibition de contact n'est pas considérée, car les cellules sont supposées comme ne se trouvant pas à confluence dans les simulations et ne le seront pas dans les expérimentations de validation des résultats prochainement présentées.

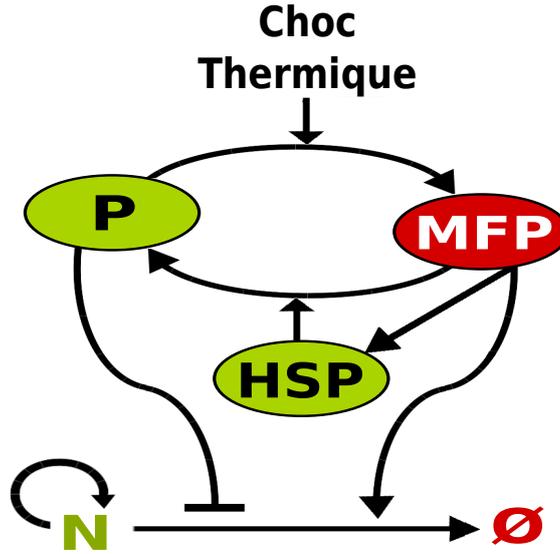


FIGURE 2.4 – Schéma du modèle dynamique de survie cellulaire en réponse au stress thermique. N désigne le nombre de cellules viables. Les protéines dénaturées *MFP* favorisent la mort cellulaire et les protéines fonctionnelles la survie.

2.2.3 Fonction de mort probabiliste pour une colonie cellulaire

Dans l'équation de population (2.5), et en première approximation, le taux de mortalité κ est considéré comme dépendant sur deux effets nocifs de l'hyperthermie, premièrement, l'accumulation des protéines dénaturées (*MFP*) [126], et deuxièmement, la perte des protéines sensibles au choc thermique ($P_{tot} - P(t)$) [127] :

$$\kappa(\vec{X}(t)) = \alpha ([MFP](t) + [MFP : HSP](t)) + \beta \left(1 - \frac{[P](t)}{P_{tot}}\right) \quad (2.6)$$

où α et β , qui représentent des coefficients de proportionnalité entre le taux de mortalité et les deux effets précédemment cités, sont les seuls paramètres à estimer dans le modèle de survie cellulaire en réponse au choc thermique.

De l'équation de population (2.5), il est possible de calculer la probabilité de survie en réponse à un protocole d'hyperthermie, et ce, comme étant le nombre de cellules viables après que la colonie ait subi un choc thermique, normalisé au nombre de cellules viables dans les conditions normales de contrôle (sans choc thermique). En intégrant l'équation de population (2.5) dans les conditions de choc thermique ($\kappa \neq 0$) nous obtenons :

$$N(t) = N(0) \exp \left(\gamma t - \int_0^t \kappa \left(\vec{X}(u) \right) du \right) \quad (2.7)$$

Dans les conditions normales à 37°C (κ est négligeable), le nombre N_{37} des cellules viables au temps t croît exponentiellement en fonction du temps :

$$N_{37}(t) = N(0) \exp(\gamma t) \quad (2.8)$$

Nous obtenons finalement la fonction exponentielle de la probabilité de survie normalisée $\mathcal{S}(t)$ suivante :

$$\mathcal{S}(t) = \frac{N(t)}{N_{37}(t)} = \exp \left(- \int_0^t \kappa \left(\vec{X}(t) \right) dt \right) \quad (2.9)$$

où $[0, t]$ est l'intervalle de temps de l'expérience. La probabilité de survie ne dépend ni du taux de prolifération γ , ni du nombre initial des cellules viables $N(0)$, mais seulement du taux de mortalité κ .

2.2.4 Ajustement des paramètres de la fonction de mort

Pour calibrer le modèle de survie cellulaire, les paramètres α et β dans l'équation définissant le taux de mortalité (Eq. 2.6) doivent être estimés dans le but de reproduire des résultats de fraction de survie à l'issue d'une exposition au stress thermique observés expérimentalement. Nous choisissons pour ce faire les données de survie des cellules *HeLa S3* en réponse à des impulsions de choc thermique de durées et températures différentes de [1].

Les paramètres α et β sont ajustés selon une fonction de score du type erreur quadratique moyenne *RMSE*, décrivant la différence entre les résultats de simulation et les points expérimentaux. L'existence d'une vallée de combinaisons (α, β) reproduisant de manière "acceptable" les données expérimentales est constatée ; dans cette vallée, la solution optimale suggère que l'accumulation des protéines dénaturées et la perte des protéines contribuent toutes deux à la mortalité cellulaire en réponse au choc thermique (Fig. 2.5). La figure (2.6) montre la dynamique du taux de mortalité κ (Eq. 2.6) pour des stress de type "marche" à différentes températures et avec une combinaison des paramètres (α, β) fixée aux valeurs optimales. La figure (2.7) quant à elle présente la fraction de survie cellulaire (en lignes pleines) en fonction des durées d'exposition à différentes températures, encore une fois pour une combinaison optimale des paramètres (α, β) .

En ce qui concerne le *CEM43* dans le cadre de l'étude, l'analyse des courbes de survie des cellules *HeLa S3* de [1] permet de fixer les deux valeurs du paramètre R de cet outil à 0,27 en dessous de 43°C et à 0,44 au-dessus. La probabilité de survie correspond à $S = \exp(-k \text{CEM43})$ (Eq. 1.1), où k est fixé par régression linéaire sur la survie expérimentale (mêmes données) estimée à 43°C, qui donne ainsi $k = 0,86h^{-1}$ (Fig. 2.7, lignes en pointillés).

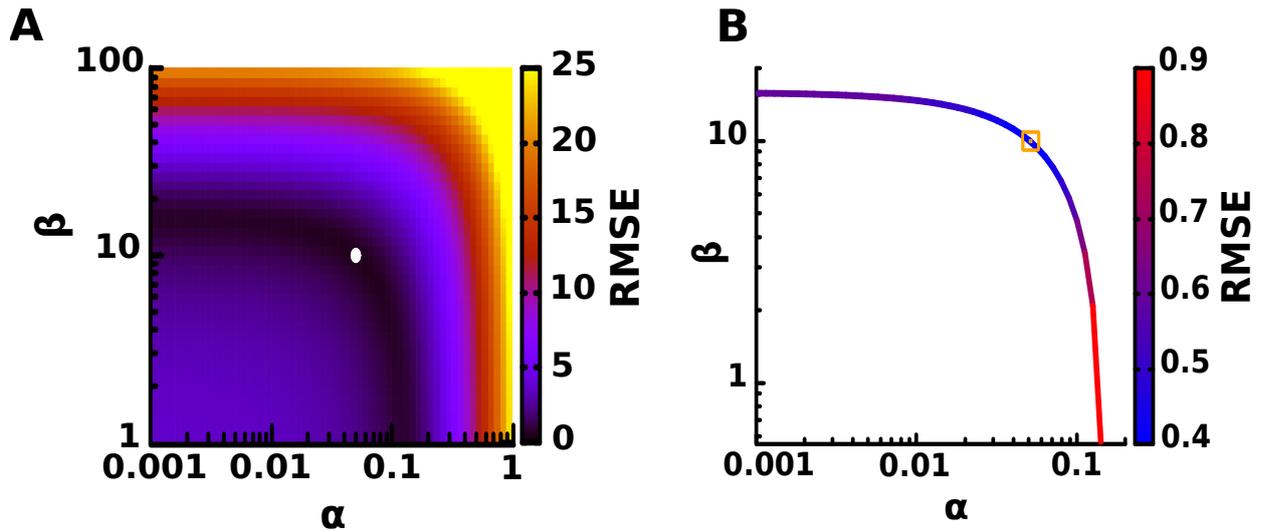


FIGURE 2.5 – Calibration du modèle dynamique de survie cellulaire. A- Score de la fonction d'erreur quadratique moyenne $RMSE$ en fonction des valeurs de α et β , le point blanc indique la combinaison optimale. B- Variation du score $RMSE$ en fonction des valeurs des paramètres α et β dans la vallée optimale. Le carré orange désigne la combinaison des deux paramètres offrant le meilleur score (désigné par le point blanc sur la Fig. A).

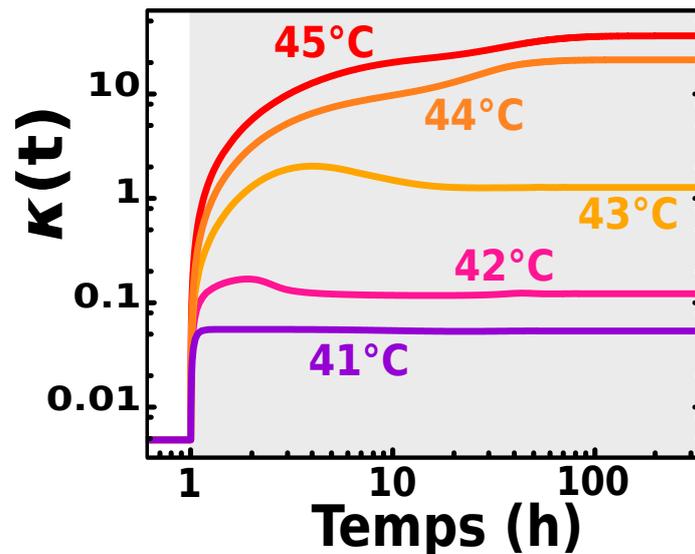


FIGURE 2.6 – Évolution temporelle du taux de mortalité κ . Les paramètres α et β ont été fixés à leurs valeurs optimales (point blanc sur la Fig. 2.5A) dans l'équation (2.6), le stress est de type "marche" avec différentes amplitudes allant de 41 à 45°C, la zone grise représente la fenêtre temporelle du stress.

Pour les chocs thermiques de profils temporels rectangulaires (impulsions), le modèle dynamique de survie des cellules *HeLa* présente un score de reproductibilité des données expérimentales similaire à celui du *CEM43*, qui lui dépend de trois paramètres : k , R et T_b (température de la *breakpoint*), et présente une variation discrète de ses paramètres à une température de transition proche de 43°C.

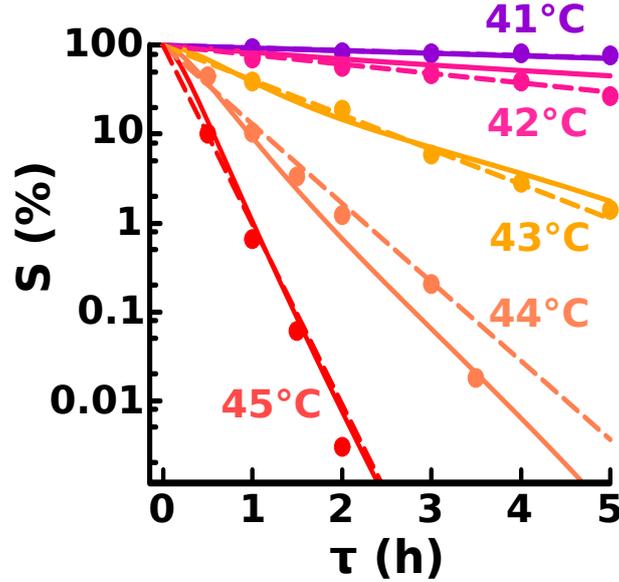


FIGURE 2.7 – Simulation de la survie cellulaire de la lignée *HeLa* et ajustement des données expérimentales. Fraction de survie des cellules *HeLa* en réponse à un stress thermique de profil temporel rectangulaire et de durée et amplitude variables, les points représentent les mesures expérimentales de [1], les lignes pleines représentent les prédictions du modèle dynamique de la survie, les lignes en pointillés représentent les prédictions du *CEM43*, le code couleur indique la température maximale (amplitude du stress).

2.2.5 Modélisation de l'effet de la forme temporelle du stress sur la survie cellulaire

Maintenant que le modèle de survie cellulaire en réponse au choc thermique est calibré, il est possible de réaliser des prédictions concernant la fraction de survie cellulaire à des profils temporels de stress thermique dynamiquement différents, mais portant la même dose thermique selon le *CEM43*. De ce fait, l'obtention d'un taux de survie homogène pour les différents profils utilisés veut dire que le *CEM43* reste valide quelle que soit la forme temporelle du choc thermique.

Espace de profils trapézoïdaux de stress

La forme d'un profil temporel d'hyperthermie peut être généralisée à un trapèze, et caractérisée par une élévation linéaire de la température en partant de 37°C jusqu'à l'atteinte d'une température T_{\max} durant l'intervalle de temps $[0, t_1]$, suivie par un plateau à la température T_{\max} durant l'intervalle $[t_1, t_2]$, et une baisse linéaire de la température de T_{\max} à 37°C durant l'intervalle $[t_2, \tau]$. Pour une gamme de paramètres (t_1, t_2, τ) donnée, les indices de saturation et d'asymétrie peuvent être définis, respectivement, par $\sigma = \frac{t_2 - t_1}{\tau}$ et $\eta = \frac{t_2 + t_1}{2\tau}$ (Fig. 2.8).

Tous les profils trapézoïdaux peuvent être générés en variant σ et η dans une région triangulaire du plan $(\sigma - \eta)$ (Fig. 2.8). Plus précisément, l'indice de saturation σ , d'une part, définit la fraction du temps où les cellules sont exposées à la température maximale du protocole T_{\max} , par exemple, un profil temporel rectangulaire correspond à $\sigma = 1$, alors qu'un profil triangulaire correspond à $\sigma = 0$. D'autre part, l'indice d'asymétrie η indique le temps (entre t_1 et t_2) auquel se trouve le centre du plateau à la température maximale T_{\max} , normalisé par rapport à la durée totale τ ; par exemple, $\eta = 0$ correspond à une élévation instantanée de la température de 37°C à T_{\max} suivie par une baisse linéaire, $\eta = 1$ correspond à une élévation linéaire de 37°C à T_{\max} suivie par une baisse instantanée, et $\eta = 0,5$ correspond à une élévation linéaire suivie par une baisse linéaire de la température temporellement symétriques.

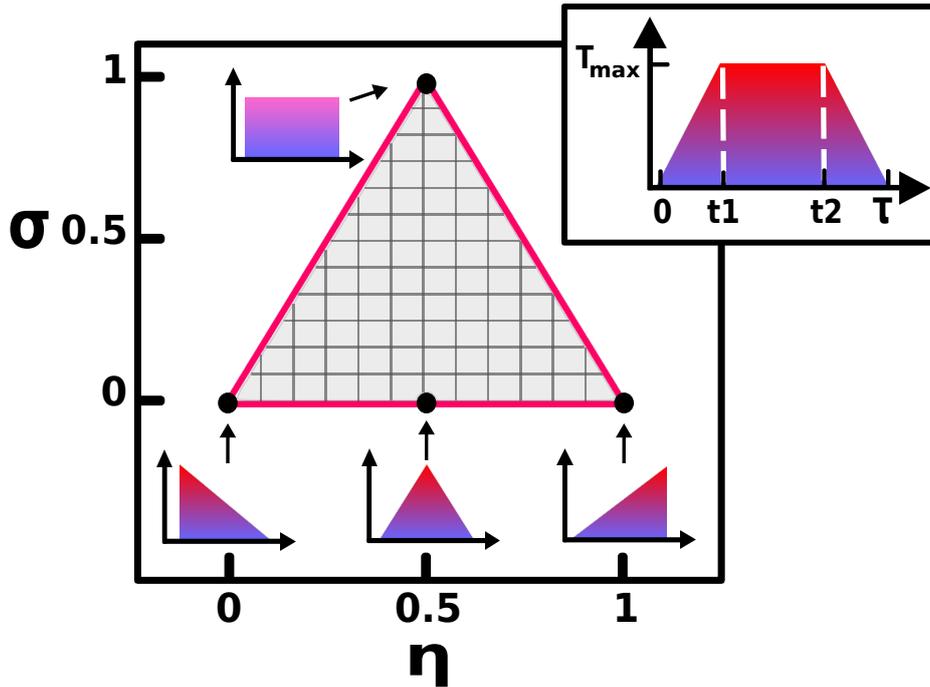


FIGURE 2.8 – **Espace des profils temporels du stress thermique.** Chaque profil temporel est caractérisé par quatre paramètres : la température maximale au plateau T_{\max} , la durée du stress τ , l'indice de saturation σ et l'indice d'asymétrie η , avec $\sigma = \frac{t_2 - t_1}{\tau}$ et $\eta = \frac{t_2 + t_1}{2\tau}$.

Simulation de la survie cellulaire en fonction du profil de stress thermique appliqué

Une description détaillée de la manière dont la forme temporelle du protocole d'hyperthermie influence la réponse de survie cellulaire est obtenue en calculant numériquement la survie cellulaire en réponse à tous les profils temporels trapézoïdaux avec la même dose thermique selon le *CEM43*. Chaque profil temporel est défini par le paramètre τ qui représente la durée totale de l'exposition à une température supérieure à 37°C et par les deux indices de saturation et d'asymétrie, σ et η respectivement, qui sont compris dans l'intervalle $[0, 1]$.

Pour une durée totale d'exposition τ et une dose *CEM43* données, il est possible de voir la manière dont la réponse de survie cellulaire dépend des valeurs de (σ, η) dans l'espace des profils temporels trapézoïdaux. Pour une gamme fixée de ces paramètres, la température maximale T_{\max} peut être déterminée pour une dose *CEM43* donnée. Des simulations numériques pour $\tau = 3\text{h}$ et une dose de 180CEM43 sont réalisées et montrent que la survie cellulaire dépend significativement des indices σ et η et ceci de manière non-triviale (Fig. 2.9).

En ce qui concerne les profils temporellement symétriques ($\eta = 0,5$), le profil temporel le moins létal est le profil rectangulaire, alors que le profil le plus létal est celui caractérisé par $\sigma = 0,3$, en gardant à l'esprit que la température maximale T_{\max} n'est pas la même. Quant aux profils temporels asymétriques, la survie cellulaire augmente avec η . Ce résultat suggère de manière générale que les profils avec une élévation lente de la température suivie par une baisse rapide ($\eta > 0,5$) sont moins létaux que ceux comportant une élévation rapide suivie par une baisse lente ($\eta < 0,5$).

A présent, il reste à quantifier l'influence de la dose thermique selon le *CEM43* et de la durée totale d'exposition τ sur cet effet d'asymétrie de la réponse. L'intérêt est particulièrement porté à deux profils triangulaires : le premier comporte une élévation instantanée de la température

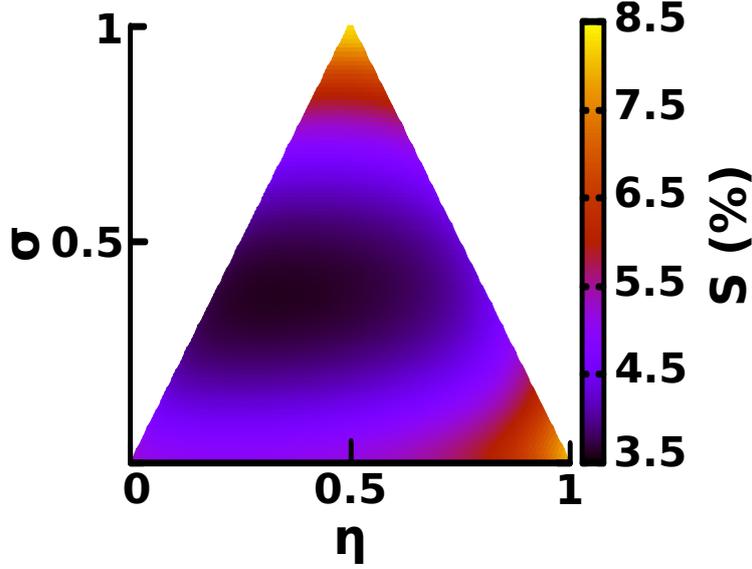


FIGURE 2.9 – Effet d’asymétrie de la survie cellulaire en fonction de la forme temporelle du stress thermique. Fraction de survie des cellules *HeLa* en fonction des indices σ et η qui définissent chaque profil temporel, pour une dose thermique fixée à 180 CEM_{43} (T_{\max} est déterminée en conséquence) et une durée fixée à $\tau = 3\text{h}$.

suivie par une baisse linéaire ($\sigma = 0, \eta = 0$), et le second présente une élévation linéaire suivie par une baisse instantanée ($\sigma = 0, \eta = 1$). Ainsi, pour chaque combinaison (τ , dose CEM_{43}), des simulations de la survie cellulaire correspondante à chacun des profils sont réalisées, et les résultats relatifs aux deux profils sont comparés au moyen d’un ratio défini comme suit :

$$\rho_S = \exp\left(-\int_{\eta=1} \kappa(t) dt\right) \Big/ \exp\left(-\int_{\eta=0} \kappa(t) dt\right) \quad (2.10)$$

que nous appelons le *ratio de survie*.

Dans les simulations, pour des doses allant de 10CEM_{43} à 300CEM_{43} et des durées d’exposition allant de $\tau = 0,1\text{h}$ à $\tau = 20\text{h}$, un ratio de survie maximal $\rho_S = 1,7$ est obtenu et apparaît principalement dans la zone (τ , dose CEM_{43}) où $T_{\max} > 43^\circ\text{C}$. A contrario, les profils temporels caractérisés d’une température maximale $T_{\max} < 43^\circ\text{C}$ présentent un ratio de survie $\rho_S = 1,1$ (Fig. 2.10A). Le ratio de survie a également été simulé dans la même gamme dose-durée précédente mais avec un taux de transcription active des *HSP* fixé à sa valeur à 37°C , et ce, en posant $[\text{HSF1}] = [\text{HSF1}]_{37}$ dans l’expression $\left[\lambda_{\text{HSP}} \frac{[\text{HSF1}]^3}{P_0^3 + [\text{HSF1}]^3}\right]$ (Table. 2.1) pour voir si la régulation transcriptionnelle des *HSP* par *HSF1* joue un éventuel rôle dans l’effet d’asymétrie. Sur la figure (2.10B), le ratio de survie ρ_S , obtenu dans le cas où le taux de transcription des *HSP* activée par *HSF1* est fixé à sa valeur à 37°C , est qualitativement similaire au ratio de survie du cas normal (Comparer Fig. (2.10A) et Fig. (2.10B)), ce qui suggère que la régulation transcriptionnelle dans le *RRCT* ne joue aucun rôle dans l’effet d’asymétrie.

La variation de l’effet d’asymétrie en fonction des valeurs des paramètres α et β intervenant dans le taux de mortalité κ (Eq. 2.6) est aussi vérifiée. Pour un stress thermique d’une dose de 180CEM_{43} et d’une durée $\tau = 3\text{h}$, le ratio de survie varie de 1,4 à 1,6 pour des combinaisons de valeurs de α et β se trouvant sur la vallée correspondant aux meilleurs scores d’optimisation (Fig. 2.11). Cet effet est légèrement plus prononcé quand la perte de protéines constitue la partie dominante de l’équation du taux de mortalité (Eq. 2.6).

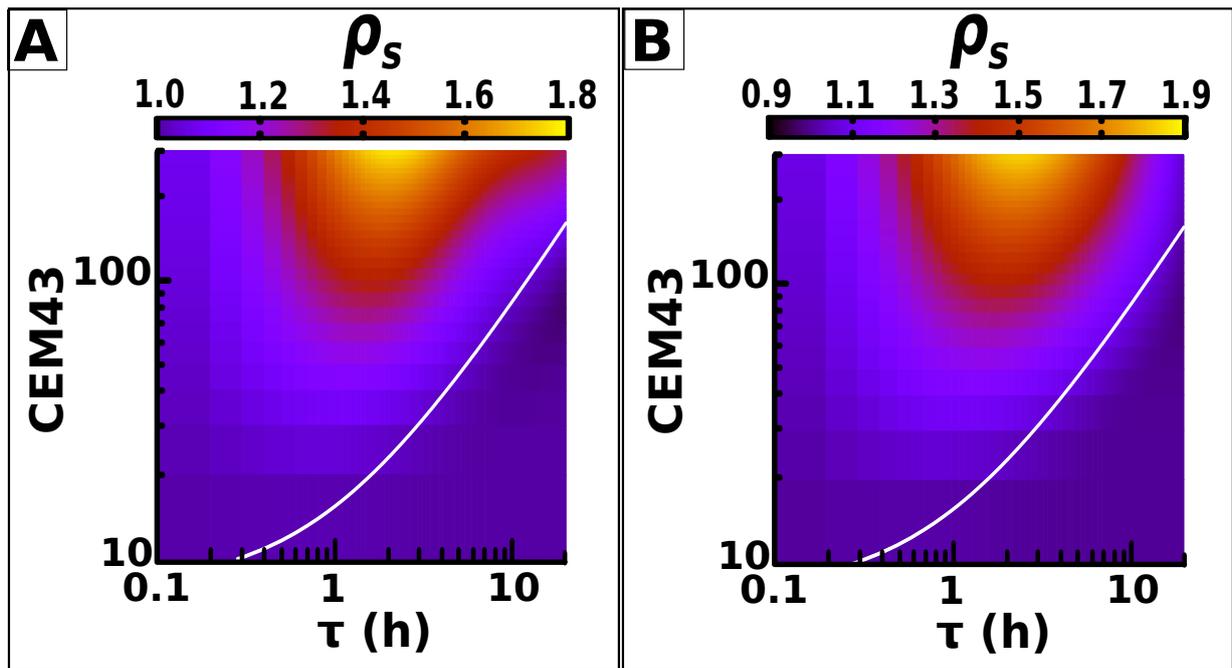


FIGURE 2.10 – Ratio de survie en fonction de la dose et de la durée du stress thermique. A- Variation du ratio de survie ρ_s , défini comme étant le ratio des fractions de survie cellulaire correspondantes aux profils temporels ($\sigma = 0, \eta = 1$) et ($\sigma = 0, \eta = 0$), en fonction de la dose thermique CEM_{43} et de la durée du stress τ . La ligne pleine blanche représente les T_{max} de 43°C . B- Ratio de survie en fonction de la dose thermique CEM_{43} et de la durée du stress τ , avec fixation du taux de transcription des *HSP* par *HSF1* à sa valeur des conditions normales à 37°C . La similarité entre les deux figures montre que la régulation transcriptionnelle n'est pas le mécanisme responsable de l'effet d'asymétrie.

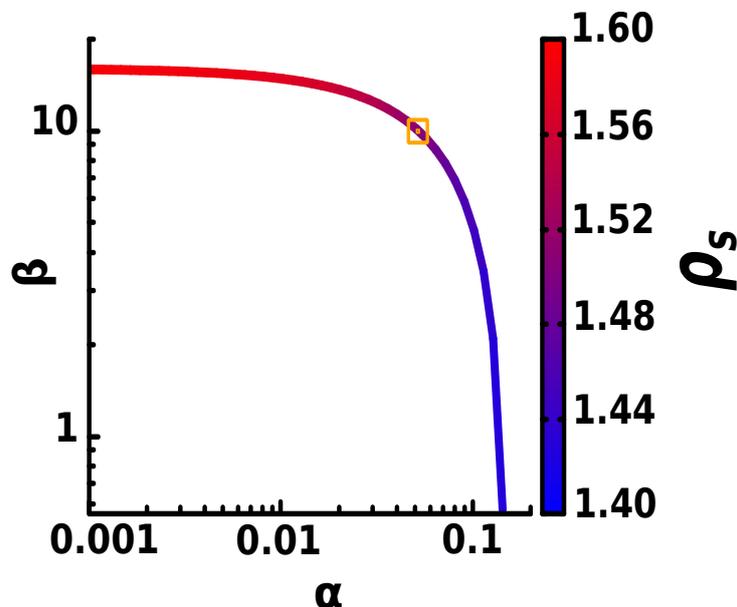


FIGURE 2.11 – L'effet d'asymétrie de la réponse de survie dépend peu des valeurs des paramètres α et β . Prédiction du ratio de survie ρ_s en fonction des combinaisons (α, β) sur la vallée des meilleurs scores (Fig. 2.5) pour une durée de stress $\tau = 3\text{h}$ et une dose de 180 CEM_{43} . Le code couleur représente la valeur du ratio de survie. Le carré orange indique la combinaison (α, β) optimale pour la calibration du modèle.

2.3 Observation expérimentale de l'effet de la forme temporelle du stress sur la survie cellulaire

Pour essayer de départager les prédictions du modèle dynamique et celles du $CEM43$, un test expérimental est réalisé, et se base sur l'exposition des cellules *HeLa* à deux chocs thermiques ayant des profils temporels asymétriques : élévation rapide de la température suivie par une baisse lente (protocole rapide-lent) et élévation lente de la température suivie par une baisse rapide (protocole lent-rapide). Si les deux protocoles ont la même durée totale et atteignent la même température maximale, le $CEM43$ prédit le même taux de survie pour les deux, mais le modèle dynamique montre une différence significative dans l'accumulation des protéines dénaturées, et donc, du taux de survie entre les deux protocoles.

2.3.1 Dispositif expérimental et protocole d'expérimentation

Les cellules *HeLa* sont placées dans deux compartiments d'un incubateur conçu spécialement pour cette étude (Fig. 2.12), dans un troisième compartiment, une thermistance est placée et permet de mesurer l'évolution temporelle de la température. Les profils temporels de stress thermique ayant une forme triangulaire sont difficiles à réaliser dans les études expérimentales en raison de l'inertie thermique de l'incubateur. Nous avons donc mesuré le temps de réponse du dispositif et le décalage entre la température de consigne et la température appliquée causé par les effets de diffusion thermique et dépendant également de la température de la salle d'expérimentation avant chaque manipulation pour prédire les profils temporels résultant des commandes de consigne afin d'ajuster ces dernières pour avoir des doses $CEM43$ similaires (Annexe C).

La durée des protocoles thermiques est limitée à 3h pour éviter les effets de thermotolérance qui apparaissent pour des temps d'exposition plus longs et qui peuvent affecter la précision des prédictions du $CEM43$ [128]. Nous obtenons finalement deux profils temporels asymétriques "rapide-lent" et "lent-rapide" portant des doses de 196 et 200 $CEM43$ respectivement (Fig. 2.13). Une expérience de contrôle sans exposition à l'hyperthermie est également réalisée.

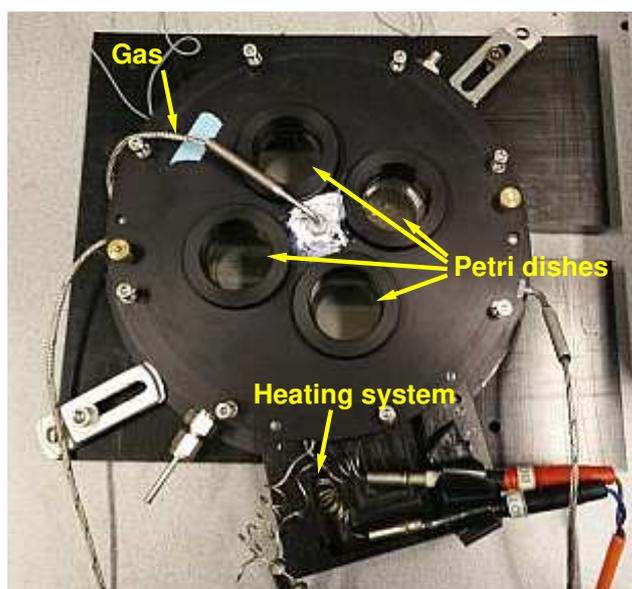


FIGURE 2.12 – Photographie du dispositif expérimental. L'incubateur contient quatre compartiments. Une thermistance est placée dans l'un des compartiments, permettant d'obtenir une mesure en temps réel de l'évolution de la température à l'intérieur de l'incubateur. L'atmosphère et l'humidité à l'intérieur de l'incubateur sont contrôlées.

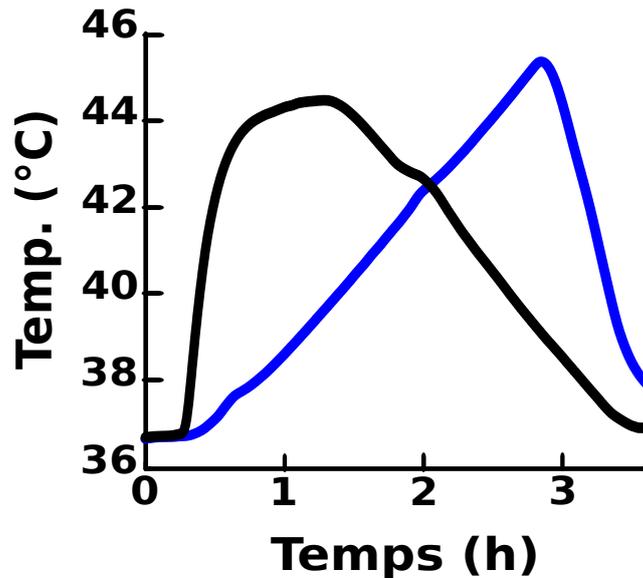


FIGURE 2.13 – **Forme temporelle des deux protocoles thermiques de l'étude expérimentale.** Protocole rapide-lent en noir portant une dose de 196 CEM_{43} , protocole lent-rapide en bleu portant une dose de 200 CEM_{43} .

2.3.2 Résultats de l'étude expérimentale

Les mesures du nombre de cellules en fonction du temps normalisé au nombre de cellules dans l'expérience de contrôle montrent que le protocole rapide-lent est significativement plus létal que le protocole lent-rapide (Fig. 2.14 et 2.15). Dans l'expérience de contrôle, le nombre de cellules augmente par prolifération et est multiplié par un facteur 1,55 après deux jours. A même intervalle de temps, la population cellulaire ayant subi le protocole thermique rapide-lent (respectivement, lent-rapide) est divisée par un facteur 2,61 (respectivement, 1,46).

Une analyse par régression permet d'obtenir un ajustement de la décroissance exponentielle en fonction du temps du nombre de cellules viables et pour en extraire typiquement le temps auquel le nombre initial des cellules est divisé par 2. Cette analyse révèle que la population cellulaire relative à celle du contrôle, est divisé par un facteur 2 après 39h post-stress pour le protocole rapide-lent, contre 86h post-stress pour le protocole lent-rapide (Fig. 2.15).

Il est à noter que dans les expériences réalisées, nous effectuons une mesure de l'évolution temporelle post-stress du nombre de cellules vivantes dans la colonie, et nous quantifions l'effet cytotoxique de l'hyperthermie par le temps nécessaire pour atteindre une fraction survivante de 50% (Fig. 2.15). Nous ne pouvons donc pas extraire une mesure similaire à la fraction de survie et comparer directement avec la prédiction du modèle. Cependant, les résultats expérimentaux obtenus prouvent que la forme temporelle du stress thermique peut significativement impacter la réponse de survie cellulaire même dans le cas de protocoles thermiques non-fractionnés, ayant la même dose CEM_{43} , la même durée et la même température maximale.

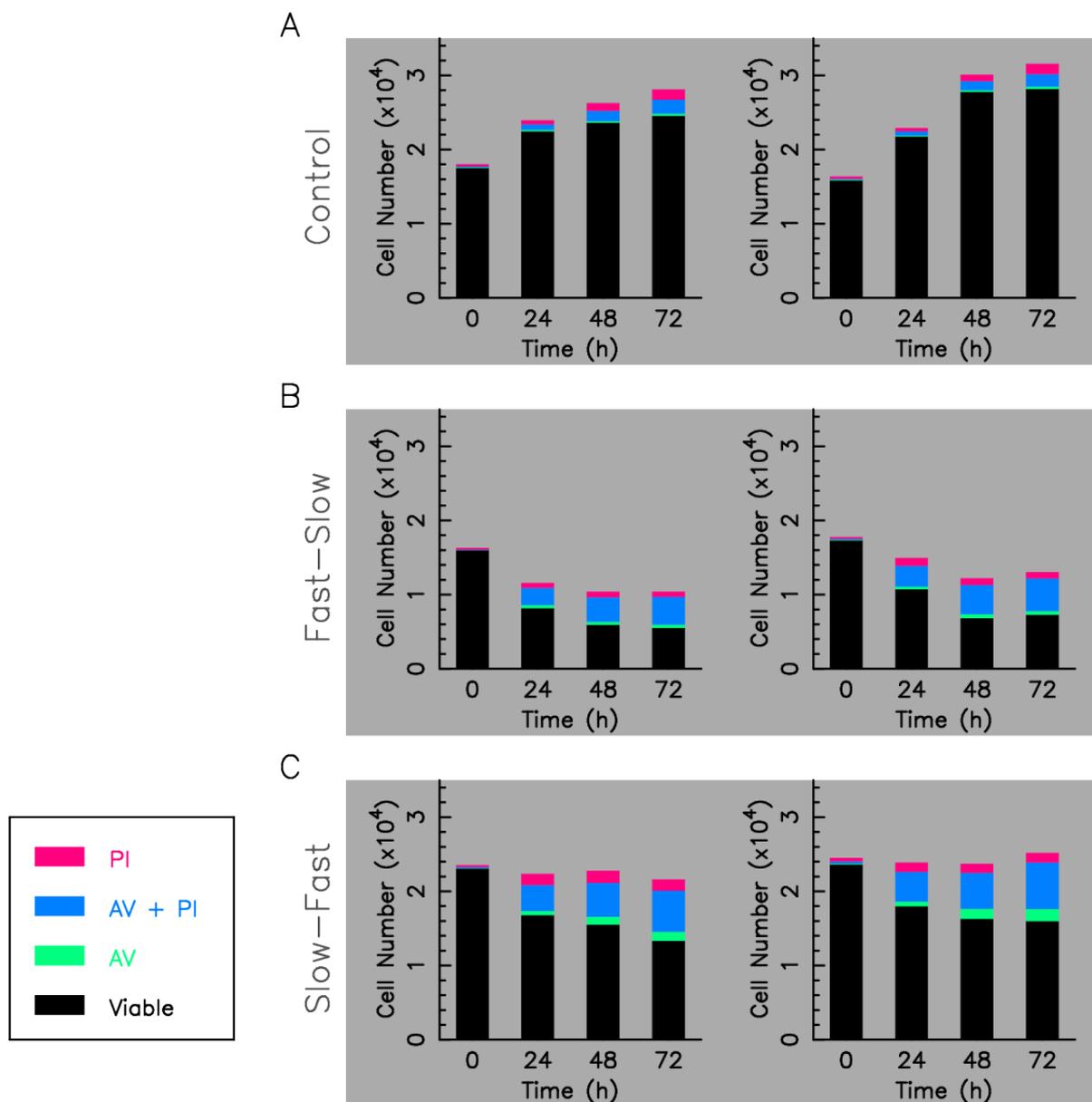


FIGURE 2.14 – Résultats du comptage du nombre de cellules après les protocoles thermiques à 0, 24, 48 et 72h. A- Évolution du nombre de cellules du groupe de contrôle à 37°C (non exposé au stress). B- Évolution du nombre de cellules exposés à un protocole rapide-lent. C- Évolution du nombre de celles exposés à un protocole lent-rapide. Le noir représente les cellules viables, Les cellules marquées au *PI* et/ou à l'*Annexin-V* sont non-viables et représentées par les couleurs rose, bleue et verte (voir code couleur). Le temps 0h correspond au début de l'expérience, juste avant l'exposition au choc thermique.

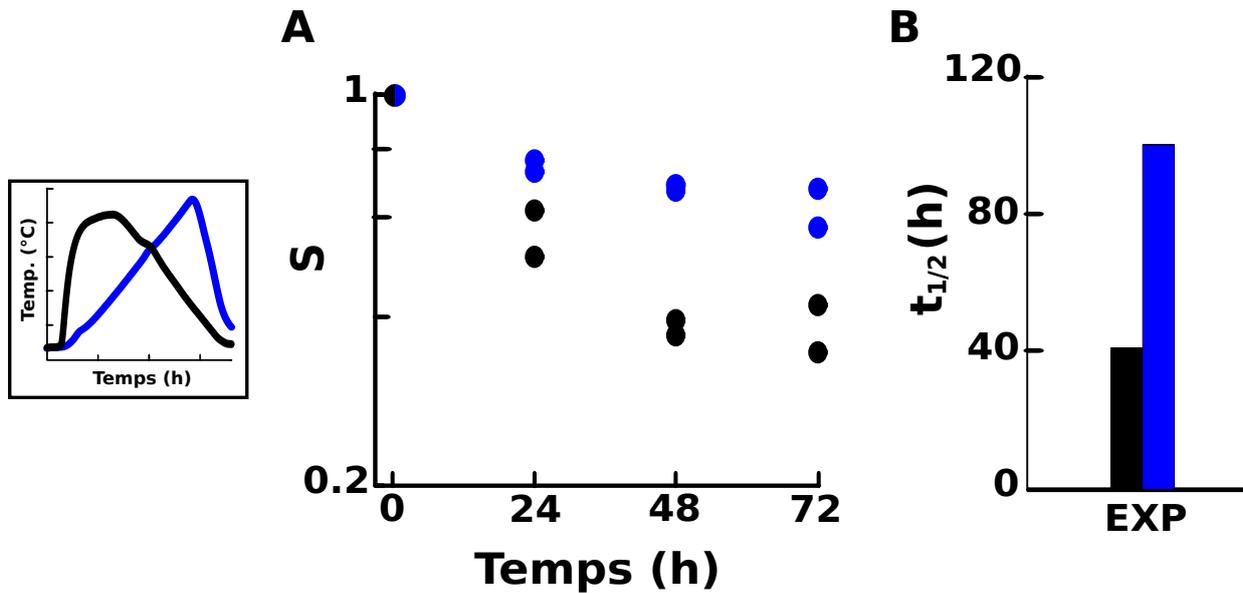


FIGURE 2.15 – Évolution temporelle du nombre de cellules correspondant à chaque protocole à l’issue de l’expérimentation. A- Nombre relatif des cellules viables de la colonie après exposition à au stress thermique. B- Temps nécessaire pour la division par un facteur 2 des colonies cellulaires après exposition aux deux protocoles thermiques.

2.4 Discussion

Le modèle dynamique de survie cellulaire en réponse aux protocoles d’hyperthermie temporellement variables est construit en combinant un modèle de réseau biologique de régulation et une équation de population comportant une fonction de mort probabiliste. La capacité prédictive de ce modèle a été démontrée dans le cas de deux profils dynamiques de choc thermique temporellement asymétriques dont les effets sur la survie cellulaire ont également été expérimentalement mesurés, cependant, le *CEM43* ne prédit pas ces effets. Ceci est important en pratique parce que le *CEM43* est largement utilisé dans l’imagerie médicale pour prévenir les effets secondaires thermiquement induits (la dose étant limitée à $2CEM43$) [129], sachant que les profils temporels ont des variations rapides dans ces procédés.

Pour un protocole thermique en dose unique, une élévation rapide de la température suivie par une baisse lente est plus létale qu’une élévation lente suivie par une baisse rapide. La régulation transcriptionnelle des *HSP* par HSF1 n’est pas impliquée dans cet effet. Cette variation de la survie cellulaire en fonction de la forme temporelle du stress thermique diffère des effets obtenus avec des protocoles comportant un prétraitement thermique de forme temporelle rectangulaire [1] ou une élévation linéaire de la température (rampe) suivie par un plateau [130], qui amènent à une augmentation considérable du taux de survie, désignés comme étant de la thermotolérance [131].

Chapitre 3

Modèle réduit de la survie cellulaire en réponse au stress thermique

3.1 Introduction

La réduction des modèles de réseaux biologiques peut considérablement améliorer la facilité d'utilisation et le temps de calcul, mais permet également de repérer clairement les "vrais responsables" d'un certain phénomène biologique. Pour ce faire, il existe plusieurs approches [132]. Comme il a été démontré au chapitre 2, la survie cellulaire résultante d'une exposition au choc thermique dépend de la forme temporelle du stress pour les températures supérieures à 43°C (lignée *HeLa*). Dans cette partie, nous nous proposons de réduire le modèle de survie cellulaire en réponse au stress thermique précédemment développé afin de mettre en évidence les mécanismes dynamiques biochimiques responsables de l'effet d'asymétrie de la réponse de survie cellulaire constaté dans les expériences et les simulations.

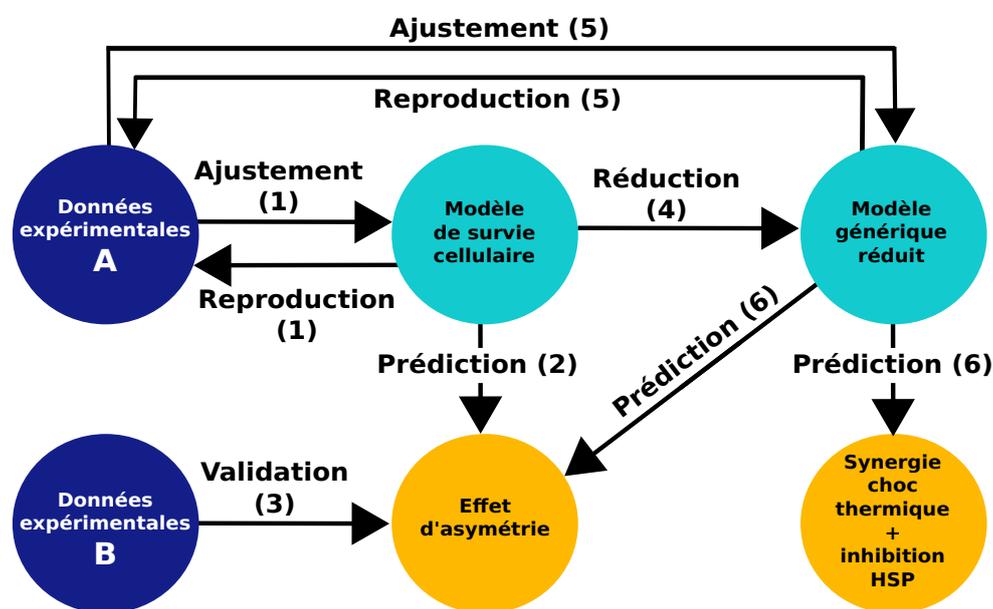


FIGURE 3.1 – Schéma représentatif des étapes méthodologiques de l'étude avec le modèle réduit. Les données expérimentales sont en bleu foncé, la modélisation mathématique en bleu clair et les prédictions du modèle en orange. Les nombres entre parenthèses désignent l'ordre des étapes

La figure (3.1) présente un schéma explicatif des étapes méthodologiques de ce chapitre. Ainsi, à partir du modèle de survie cellulaire, un modèle réduit est dérivé, basé essentiellement sur un

mécanisme de saturation des ressources limitant le processus de renaturation des protéines endommagées. Ce modèle réduit est ensuite calibré avec les mêmes données expérimentales de survie de la lignée cellulaire *HeLa* en réponse au stress thermique [1] utilisées auparavant. Une fois le modèle réduit ajusté, il reproduit qualitativement l'effet d'asymétrie observé avec le modèle de survie cellulaire original, confirmant ainsi que le mécanisme de saturation est bien au centre de cet effet. Par ailleurs, ce modèle réduit est également utilisé pour explorer la possibilité d'un éventuel effet de synergie entre l'hyperthermie et les molécules d'inhibition des protéines *HSP*, en modulant la quantité de ces dernières. Ce dernier point peut en effet illustrer le potentiel des protocoles hyperthermiques en combinaison aux protocoles chimiothérapeutiques basés sur des molécules inhibitrices des chaperons.

Afin d'aller plus loin, vu le caractère générique du modèle réduit, il est enfin utilisé dans la reproduction des données de survie à l'issue d'une exposition au stress thermique de plusieurs lignées cellulaires. Les paramètres du modèle vont donc varier en fonction de la lignée étudiée car la réponse de survie au stress thermique est connue comme étant fortement dépendante du type cellulaire [133], et ce, malgré le fait que les caractéristiques principales de la réponse soient hautement conservées entre les différentes lignées et que les courbes de survie résultantes présentent la même tendance de décroissance quasi-exponentielle. La possibilité de décrire les procédés d'endommagement, de réparation et de mort avec un modèle de faible dimensionnalité est particulièrement attirante en considérant le manque de données et de connaissance de la réponse cellulaire au stress thermique et des mécanismes de mort cellulaire dans n'importe quelle lignée.

3.2 Réduction du modèle de survie cellulaire en réponse au choc thermique

Dans le chapitre 2, des simulations ont montré que la perturbation de la régulation transcriptionnelle de *HSP* par *HSF1* n'affecte pas l'effet d'asymétrie entre les deux protocoles rapide-lent ($\sigma = 0, \eta = 0$) et lent-rapide ($\sigma = 0, \eta = 1$) (comparer Fig. (2.10A) et (2.10B)). En effet, le taux de transcription des *HSP* activée par *HSF1* a été fixé à sa valeur des conditions normales à 37°C dans ces simulations, et en appliquant un stress thermique avec les deux profils (ayant des doses allant de 10 à 300CEM43 sur des durées allant de 0,1 à 20h), un ratio de survie cellulaire similaire à celui des conditions non perturbées, où ce taux de transcription n'est pas fixé, est obtenu. En outre, il est fort probable que la régulation transcriptionnelle ne soit pas le seul mécanisme dans le réseau *RRCT* n'altérant pas l'effet d'asymétrie. Il est donc possible de réduire le modèle du réseau de réponse au stress thermique (Annexe A) en éliminant les mécanismes qu'il inclut, un par un, tout en gardant cet effet, pour idéalement isoler le facteur clé du réseau qui en est à l'origine. Ainsi, une réduction du modèle de survie cellulaire (couplant le modèle *RRCT* à une équation de population) est réalisée en supposant que :

1. Toutes les protéines du *RRCT*, à l'exception des protéines dénaturées (*MFP*), ont des taux de dégradation similaires : $\delta_P = \delta_{HSF1} = \delta_{HSP} = \delta_{HSF1:HSP} = \delta_{MFP:HSP} \equiv \delta$.
2. Les concentrations totales des protéines *HSF1* et *HSP* sont constantes (En fait, la concentration de *HSF1* ne varie pas significativement sous hyperthermie [122]), et la régulation transcriptionnelle des *HSP* par *HSF1* n'impacte pas de manière significative la survie cellulaire : $\lambda_{HSP} = 0$.
3. La variation de la concentration totale des protéines natives en raison de la dénaturation induite par le choc thermique est négligeable [122] : $\frac{dP}{dt} \approx 0$.
4. Le taux de renaturation des protéines dénaturées est dans un régime linéaire, par exemple, pour $K_M \gg [MFP : HSP]$ (Table. 2.1).

Conséquentement, le système dynamique de l'annexe A peut s'écrire sous la forme :

$$\frac{d}{dt}[MFP] = \kappa_d(T) - K_{MFP:HSP}^+[HSP][MFP] - \delta_{MFP}[MFP] \quad (3.1a)$$

$$\frac{d}{dt}[MFP : HSP] = K_{MFP:HSP}^+[HSP][MFP] - k_r \frac{[MFP : HSP]}{K_M} - \delta[MFP : HSP] \quad (3.1b)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[HSF1] &= \mu_{HSF1} - K_{HSF1:HSP}^+[HSF1][HSP] + K_{HSF1:HSP}^-[HSF1 : HSP] \\ &\quad - \delta[HSF1] \end{aligned} \quad (3.1c)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[HSF1 : HSP] &= K_{HSF1:HSP}^+[HSF1][HSP] - K_{HSF1:HSP}^-[HSF1 : HSP] \\ &\quad - \delta[HSF1 : HSP] \end{aligned} \quad (3.1d)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[HSP] &= k_{HSP} - K_{HSF1:HSP}^+[HSF1][HSP] + K_{HSF1:HSP}^-[HSF1 : HSP] \\ &\quad - K_{MFP:HSP}^+[HSP][MFP] + k_r \frac{[MFP : HSP]}{K_M} - \delta[HSP] \end{aligned} \quad (3.1e)$$

où k_{HSP} est le taux constant de synthèse des HSP .

Par la suite, le nombre d'équations différentielles du système précédent peut être réduit en supposant une conservation du nombre total de copies de $HSF1$, de HSP et des MFP , noté par $[HSF1]_T$, $[HSP]_T$, et $[MFP]_T$ respectivement :

$$[HSF1]_T = [HSF1] + [HSP : HSF1] \quad (3.2a)$$

$$[MFP]_T = [MFP] + [HSP : MFP] \quad (3.2b)$$

$$[HSP]_T = [HSP] + [HSP : MFP] + [HSP : HSF1] \quad (3.2c)$$

En utilisant le système (3.1), nous obtenons :

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[MFP]_T &= \frac{d}{dt}[MFP] + \frac{d}{dt}[HSP : MFP] = \kappa_d(T) - (\kappa_d(T^*) + \delta) [MFP : HSP] \\ &\quad - \delta_{MFP} [MFP] \end{aligned} \quad (3.3a)$$

$$\frac{d}{dt}[HSF1]_T = \frac{d}{dt}[HSF1] + \frac{d}{dt}[HSP : HSF1] = \mu_{HSF1} - \delta [HSF1]_T \quad (3.3b)$$

$$\frac{d}{dt}[HSP]_T = \frac{d}{dt}[HSP] + \frac{d}{dt}[HSP : MFP] + \frac{d}{dt}[HSP : HSF1] = \mu'_{HSP} - \delta [HSP]_T \quad (3.3c)$$

Où un paramètre relatif à la température T^* est introduit dans le système (3.3) pour plus de clarté, défini par $\kappa_d(T^*) = \frac{k_r}{K_M}$, et impliquant que $\kappa_d(T^*) \gg \delta$ en raison du paramétrage du modèle *RRCT* [122]. Dans le même système, $[HSF1]_T$ et $[HSP]_T$ convergent vers une valeur constante qui peut être prise en tant que paramètre.

La dernière étape est de formuler $[MFP : HSP]$ et $[MFP]$ en fonction de $[HSF1]_T$, $[HSP]_T$, et $[MFP]_T$ dans le but d'obtenir un système fermé. Ceci peut être fait par une élimination adiabatique de l'association et dissociation des dimères. Considérons deux protéines (A) et (B), l'équation d'équilibre de la réaction de formation réversible du complexe ($A + B \leftrightarrow A : B$) est $[A : B] k_0 = [A] [B]$ où k_0 est une concentration d'équilibre. En posant $a = [A] + [A : B]$ et $b = [B] + [A : B]$ qui représentent donc les concentrations totales des protéines A et B respectivement, la résolution de l'équation $[A : B]^2 - (a + b + k_0)[A : B] + ab = 0$ résultante donne :

$$[A : B] = -\frac{a + b + k_0}{2} \left[\sqrt{1 - \frac{4ab}{(a + b + k_0)^2}} - 1 \right] \quad (3.4a)$$

$$[A : B] = -\frac{a + b + k_0}{2} \left[-\sqrt{1 - \frac{4ab}{(a + b + k_0)^2}} - 1 \right] \quad (3.4b)$$

Il est à noter que la solution donnée par l'équation (3.4b) n'est pas pertinente d'un point de vue biologique car elle implique que $[A : B] > \max(a, b)$ pour toute combinaison (a, b) (la fonction \max retourne la variable de valeur supérieure). En ce qui concerne l'équation (3.4a), si l'approximation stipulant que $a \gg b$ (ou $b \gg a$) impliquant que $4ab \ll (a + b + k_0)^2$ est considérée, un développement limité du premier ordre du terme sous racine donne :

$$[A : B] \simeq -\frac{a + b + k_0}{2} \left[1 - \frac{2ab}{(a + b + k_0)^2} - 1 \right] = \frac{ab}{(a + b + k_0)} \quad (3.5)$$

Si maintenant les concentrations totales a et b dominent la concentration d'équilibre k_0 ($a + b \gg k_0$), les concentrations à l'équilibre peuvent être approximées par les fonctions sans paramètre suivantes :

$$[A : B] \simeq \frac{ab}{a + b} \quad (3.6a)$$

$$[A] \simeq \frac{a^2}{a + b} \quad (3.6b)$$

$$[B] \simeq \frac{b^2}{a + b} \quad (3.6c)$$

La figure (3.2) montre que cette approximation reste valide dans la partie de l'espace (a, b) où $a + b \gg k_0$. En effet, le ratio des concentrations $[A : B]$ données respectivement par les équations (3.4a) et (3.6a) reste très proche de 1, sauf dans une région très étroite pour laquelle $a \sim b$ (et atteint une valeur maximale de 2 quand $a = b$). Pour la plupart des stress thermiques étudiés, les chaperons *HSP* et les protéines dénaturées *MFP* ont des concentrations suffisamment différentes pour justifier cette approximation.

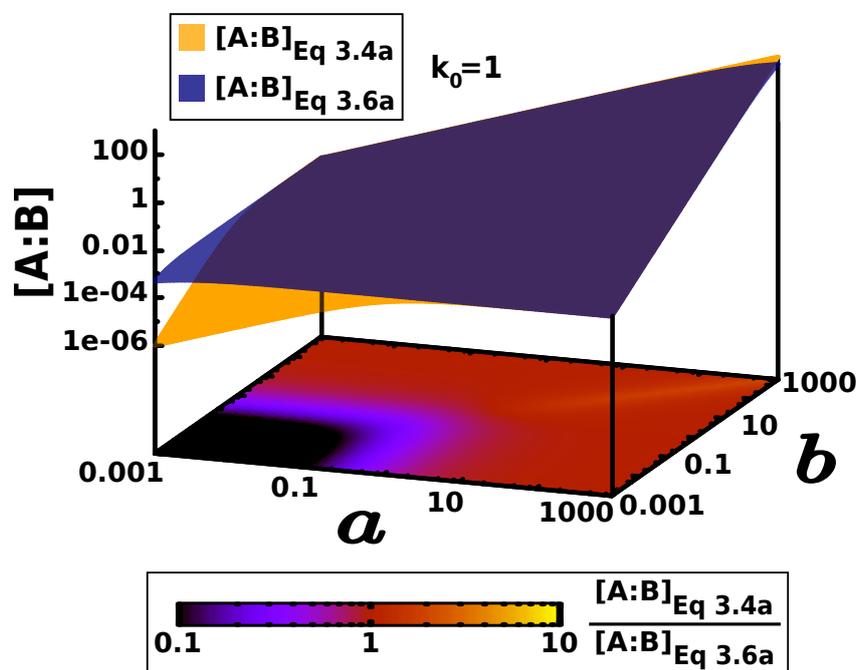


FIGURE 3.2 – Vérification de la validité de l'approximation réalisée dans la réduction du modèle de survie cellulaire en réponse au stress thermique. Les surfaces en 3D représentent la variation de la concentration du complexe $[A : B]$ en fonction des concentrations totales a et b suivant les équations (3.4) et (3.6). Le graphique sur la base illustre la variation du ratio des deux équations précédentes en fonction de a et de b (voir code couleur). k_0 est fixé à 1.

Afin de réduire le modèle *RRCT*, l'association et dissociation des hétérodimères sont considérées comme suivant une relation d'équilibre pour des concentrations données de *MFP*, *HSP* et *HSF1*, dans une réaction en chaîne telle que : les *HSP* s'associent aux *MFP*, puis les *HSF1* s'associent aux *HSP* libres. Une fois appliquée à la réaction dominante de formation d'hétérodimères $HSP + MFP \rightarrow MFP : HSP$, l'élimination adiabatique donne :

$$[MFP] = \frac{[MFP]_T^2}{[MFP]_T + [HSP]_T} \quad (3.7a)$$

$$[MFP : HSP] = \frac{[MFP]_T [HSP]_T}{[MFP]_T + [HSP]_T} \quad (3.7b)$$

$$[HSP] = \frac{[HSP]_T^2}{[MFP]_T + [HSP]_T} \quad (3.7c)$$

Décrivant respectivement la concentration des protéines dénaturées libres (*MFP*), des hétérodimères (*MFP : HSP*), et des (*HSP*) libres avant l'association avec les (*HSF1*).

Sous ces approximations, le modèle de survie cellulaire couplant le modèle *RRCT* et l'équation de population (Eq. 2.4 - 2.5) est finalement réduit à un système de deux équations différentielles qui décrivent respectivement l'évolution temporelle de la quantité de protéines dénaturées (P^*) et le nombre de cellules viables (N) :

$$\tau_P \frac{dP^*}{dt} = \underbrace{f(T(t))}_{\text{denaturation}} - \underbrace{P^*(t) \frac{P^*(t)}{P^*(t)+1}}_{\text{degradation}} - \underbrace{f(T^*) \frac{P^*(t)}{P^*(t)+1}}_{\text{renaturation}} \quad (3.8)$$

$$\frac{dN}{dt} = \gamma N - \alpha P^*(t) N \quad (3.9)$$

où $\tau_P \equiv 1/\delta_{MFP}$.

Dans ce modèle réduit, P^* représente la concentration des protéines dénaturées normalisée par rapport à la concentration des protéines chaperons $P^* \equiv [MFP]_T/[HSP]_T$, et est donc une grandeur adimensionnelle : $P^* > 1$ veut dire que le nombre de protéines dénaturées excède celui des protéines chaperons de manière à ce que la renaturation sature à $f(T^*)$, et les protéines dénaturées sont lentement dégradées plutôt que rapidement renaturées.

L'équation (3.8) décrit la dynamique de la concentration des protéines dénaturées (P^*) en considérant trois procédés :

1. **La dénaturation**, qui transforme les protéines thermosensibles en protéines dénaturées dysfonctionnelles avec un taux dépendant de la température.
2. **La dégradation**, qui détruit toutes les protéines dénaturées qui n'ont pas été réparées.
3. **La renaturation**, qui répare les protéines dénaturées et qui est limitée par la quantité de chaperons.

Dans l'équation (3.8), $f(T(t)) = k_d 1,4^{T(t)-37}$ est le taux de dénaturation des protéines simplifié et dépendant de la température, $P^* \frac{P^*(t)}{P^*(t)+1}$ est le taux de dégradation des protéines dénaturées, et $f(T^*) \frac{P^*}{P^*+1}$ est le taux de renaturation qui est limité par la valeur maximale $f(T^*)$ en raison de la quantité limitée des protéines chaperons.

3.2.1 Reproduction des résultats du modèle de survie cellulaire en réponse au choc thermique avec le modèle réduit

A présent que le modèle réduit est formulé, ses paramètres doivent être ajustés pour reproduire les mêmes données de survie des cellules *HeLa* [1] précédemment utilisées pour calibrer

le modèle de survie cellulaire en réponse au choc thermique. Le modèle réduit donne des résultats similaires à ceux du premier modèle en matière de qualité de l'ajustement des données. Le meilleur ajustement est obtenu pour la gamme de paramètres suivante : $\tau_p = 0,183\text{h}$, $k_d = 4,47$, $T^* = 43,07^\circ\text{C}$, et $\alpha = 0,15\text{h}^{-1}$ (Fig. 3.3A). Il reproduit qualitativement et quantitativement les résultats du modèle original de l'effet d'asymétrie de la survie cellulaire dans l'espace des profils temporels trapézoïdaux et du ratio de survie des protocoles rapide-lent et lent-rapide (Comparer les Fig. 2.9 et 2.10A avec 3.3B et 3.3C respectivement).

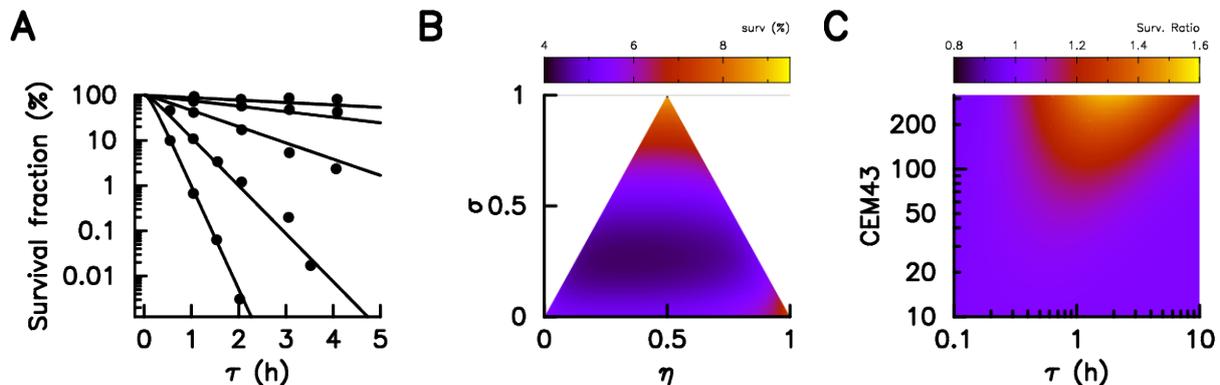


FIGURE 3.3 – **Le modèle réduit reproduit les résultats du modèle dynamique de survie cellulaire.** A - Estimation des paramètres du modèle réduit par ajustement des données de survie cellulaire en réponse aux chocs thermiques de profils rectangulaires de [1] (en points), les lignes noires représentent les prédictions du modèle. B et C sont similaires aux figures (2.9) et (2.10A) à l'exception que les prédictions sont faites avec le modèle réduit.

Le fait qu'il est possible de reproduire ces effets avec un modèle réduit comportant uniquement la production, la dégradation et la renaturation des protéines dénaturées démontre que l'effet d'asymétrie de la survie cellulaire est intimement lié aux ressources limitées des procédés de renaturation assurés par les protéines chaperons, les mettant ainsi au centre de la réponse et du destin cellulaire résultants d'une exposition au choc thermique.

3.3 L'inhibition des chaperons augmente la sensibilité au choc thermique

Le modèle réduit souligne le fait que les ressources de réparation limitées sont l'ingrédient clé décrivant la survie cellulaire suite à une exposition au choc thermique. Il est donc très tentant de moduler, et plus précisément, d'inhiber, ces ressources de réparation, qui sont les protéines chaperons *HSP*, dans le but d'augmenter l'effet létal du protocole d'hyperthermie par exemple. Expérimentalement, cette inhibition peut être réalisée par l'utilisation d'une molécule inhibant les protéines chaperons, et plus particulièrement les *HSP70* qui sont les principales protéines impliquées dans le processus de renaturation des protéines dénaturées [134]. L'inhibition des protéines *HSP70* a déjà été suggérée comme stratégie anti-cancéreuse [52,53], et plusieurs inhibiteurs ont été identifiés [135–137]. Une étude a aussi démontré que l'inhibition des *HSP* peut sensibiliser les cellules de mélanome au stress thermique [138].

Dans le modèle réduit, une modulation des protéines chaperons est possible au moyen de l'introduction d'un facteur r ($r = 1$ étant le cas de contrôle sans aucune modulation) dans l'équation (3.8) :

$$\tau_P \frac{dP^*}{dt} = f(T(t)) - P^*(t) \frac{P^*(t)}{P^*(t) + r} - f(T^*) r \frac{P^*(t)}{P^*(t) + r} \quad (3.10)$$

Alors que l'équation (3.9) reste inchangée.

Pour étudier les effets de synergie entre un protocole d'hyperthermie et une molécule inhibant les *HSP*, des simulations de l'effet d'une modulation transitoire des *HSP* appliquée pour une durée de 10h en parallèle au choc thermique sont réalisées. Le procédé de modulation consiste à fixer le paramètre r durant les premières 10 heures à une valeur constante inférieure à 1, correspondant à une diminution des *HSP*. Une fois les 10 heures passées, le paramètre r revient à sa valeur de contrôle ($r = 1$). Le changement du paramètre r dans les simulations est instantané et non pas graduel.

Il est à noter que les mêmes résultats et conclusions peuvent être obtenus pour n'importe quelle durée d'inhibition des *HSP* à condition qu'elle soit supérieure à la durée du protocole hyperthermique τ . Nous considérons également que le protocole hyperthermique et la modulation transitoire des *HSP* sont appliqués au même moment, et ce, pour éviter l'ajout d'un autre paramètre décrivant le décalage temporel entre les deux. Enfin, des simulations sont réalisées pour définir un groupe de contrôle qui n'est soumis ni à la modulation des *HSP* ni au choc thermique pour décrire une fraction de survie cellulaire.

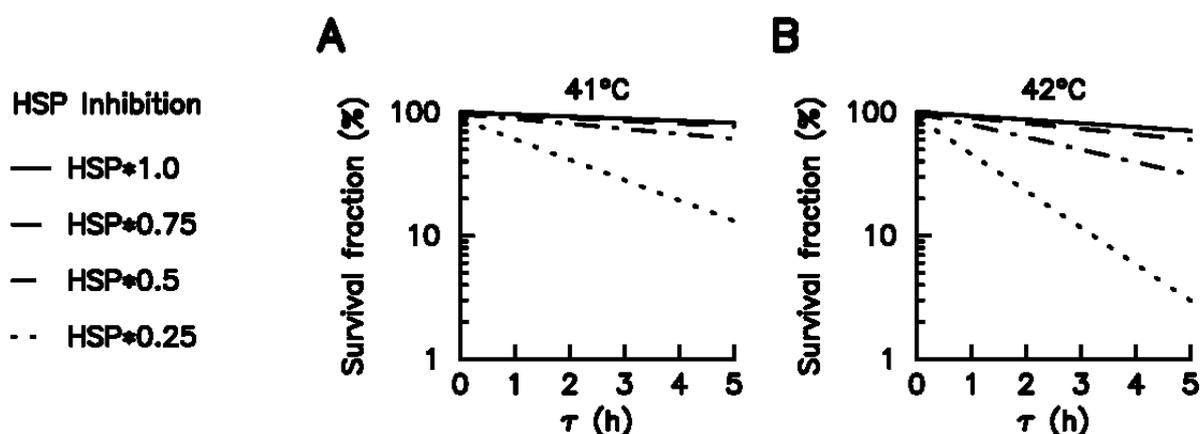


FIGURE 3.4 – L'inhibition des *HSP* augmente la sensibilité cellulaire au stress thermique. La survie cellulaire est simulée par le modèle réduit en réponse à une impulsion de stress thermique en combinaison avec une inhibition transitoire des chaperons d'une durée de 10h, et d'intensités variables : contrôle $r = 1$, $r = 0,75$, $r = 0,5$ et $r = 0,25$. A- La fraction de survie est calculée pour $T_{max} = 41^\circ\text{C}$ à plusieurs durées τ . B- Similairement à (A), avec $T_{max} = 42^\circ\text{C}$.

Dans un premier temps, un stress thermique sous forme d'impulsion (profil temporel rectangulaire) est appliqué. Des simulations de la fraction de survie cellulaire correspondant à plusieurs durées τ et amplitudes T_{max} du stress thermique, et quatre valeurs (1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25) du paramètre de modulation r des *HSP* sont réalisées (Fig. 3.4). Si ($\tau = 0$), la fraction de survie cellulaire obtenue correspond à la réponse au traitement d'inhibition des chaperons seulement. Dans ce cas, aucune diminution significative de la survie cellulaire n'est constatée : même pour une forte inhibition ($r = 0,25$), une durée de 10h donne une fraction de survie de 80%. Cependant, pour un protocole d'hyperthermie donné ($\tau > 0$), le modèle prédit une décroissance significative de la fraction de survie cellulaire avec la diminution des chaperons (augmentation de l'inhibition). Par exemple, 2h à 41°C donne une fraction de survie de 92% pour ($r = 1$) mais seulement 41% si ($r = 0,25$), c'est à dire, quand la quantité de chaperons est divisée par un facteur 4.

L'impact de l'inhibition temporaire des *HSP* sur la fraction de survie cellulaire en réponse au choc thermique montre un effet de seuil vis-à-vis du niveau d'inhibition. Pour caractériser cet

effet, des simulations avec une durée d'exposition au choc thermique τ et une amplitude T_{max} de l'impulsion fixées, et un niveau d'inhibition des *HSP* variable allant de ($r = 1$) à ($r = 0$) sont effectuées (Fig. 3.5). La fraction de survie résultante varie de manière non-linéaire avec le paramètre de modulation r , et elle diminue significativement quand $r < 0,5$, donc pour une inhibition des *HSP* à hauteur de 50%.

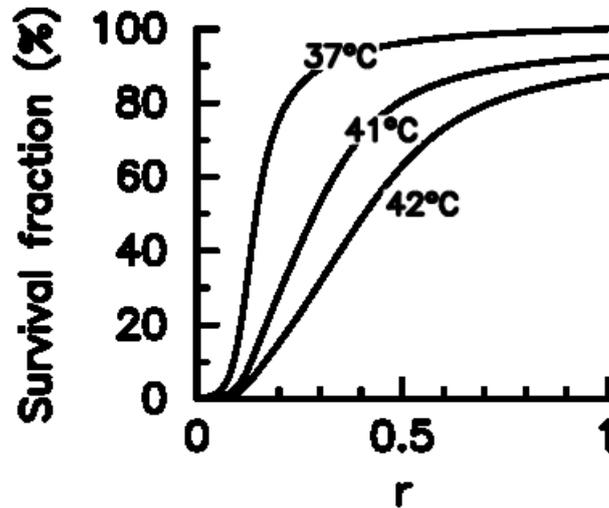


FIGURE 3.5 – Le modèle réduit prédit un effet de seuil de l'inhibition des chaperons. La fraction de survie cellulaire est calculée en fonction de l'intensité de l'inhibition des *HSP* pour plusieurs températures. La durée du protocole hyperthermique est fixée à $\tau = 2h$. Les courbes correspondent aux différentes T_{max} (37, 41 et 42°C).

Enfin, l'impact de la modulation transitoire des *HSP* sur l'effet d'asymétrie entre les deux profils triangulaires précédemment étudiés ($\sigma = 0, \eta = 0$) et ($\sigma = 0, \eta = 1$) reste à définir. Pour ce faire, le ratio de survie (ρ_S) avec inhibition des *HSP* pour une durée de 10h est calculé. La figure (3.6) montre les résultats des simulations : sans modulation des *HSP* ($r = 1$), l'effet d'asymétrie survient principalement quand $T_{max} > 43^\circ\text{C}$ (Fig. 3.3C), alors que dans le cas d'une inhibition transitoire des chaperons, l'effet d'asymétrie apparaît quand $T_{max} < 43^\circ\text{C}$. Plus l'inhibition est forte, moins élevée est la température T_{max} requise pour atteindre l'effet d'asymétrie. A titre d'exemple, pour une durée de protocole hyperthermique de 2h et une dose de 20CEM43 (ce qui donne $T_{max} = 43^\circ\text{C}$), le ratio de survie est égal à 1 pour le cas de contrôle ($r = 1$), 1,06 pour $r = 0,5$, et 1,09 pour $r = 0,25$. Pour $T_{max} > 43^\circ\text{C}$, l'inhibition transitoire des chaperons a tendance à diminuer le ratio de survie.

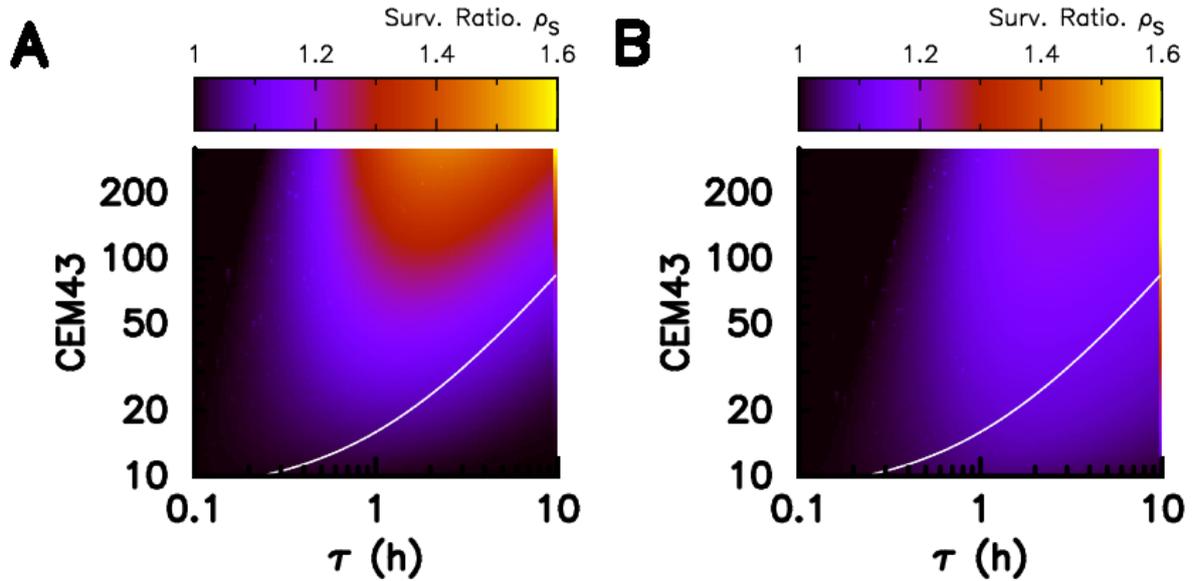


FIGURE 3.6 – **Effet d'asymétrie avec inhibition des HSP.** Le ratio de survie ρ_S (défini comme étant le ratio des fractions de survie cellulaire correspondantes aux deux profils triangulaires $[\sigma = 0, \eta = 0]$ et $[\sigma = 0, \eta = 1]$) est calculé pour des stress thermiques de doses et durées τ variables, et sous une inhibition temporaire des chaperons d'une durée de 10h. A- $r = 0,5$, la quantité de chaperons est divisée par un facteur 2. B- $r = 0,25$, la quantité de chaperons est divisée par un facteur 4.

3.4 Ajustement des courbes de survie de différentes lignées cellulaires

Une continuation idéale pour cette étude est d'utiliser ce modèle réduit basé sur un mécanisme générique de réponse au choc thermique pour reproduire les données de survie cellulaire de différentes lignées. Le fait que les paramètres de ce modèle aient une signification biologique plus ou moins claire, peut aider par la suite à mieux comprendre la cause de la différence dans la réponse entre les diverses lignées cellulaires. En effet, certaines lignées sont plus résistantes ou plus sensibles au choc thermique que d'autres, et l'ajustement des paramètres du modèle réduit pour chacune d'elle, permet éventuellement d'explorer les différentes possibilités provoquant ces natures en fonction des jeux de paramètres.

Pour ce faire, des données de fraction de survie de plusieurs lignées cellulaires en réponse au stress thermique, toutes techniques confondues, ont été réunies de la littérature. Les données de survie ayant des échelles semi-logarithmiques sont plus fiables en comparaison aux échelles linéaires en terme de précision de l'extraction quand les mesures expérimentales sont très proches, notamment dans le cas des fractions de survie très basses. Par ailleurs, dans certains cas et pour une même lignée, les températures sont tellement élevées et proches que le chevauchement des points de mesures rend l'extraction impossible, et cette partie des données a donc été exclue pour ne pas fausser l'ajustement. En outre, toutes les données collectées concernent des stress thermiques dont le profil temporel est considéré comme étant de forme rectangulaire. Chaque point de mesure se repère ainsi par trois coordonnées incluant la température maximale du stress thermique, sa durée, et la fraction de survie cellulaire résultante. De plus, chaque jeu de données résulte d'un protocole impliquant un stress de température et durée données, et d'une durée de "récupération" à température normale qui s'en suit; cette dernière doit être prise en compte dans les simulations.

Les lignées cellulaires (humaines) considérées dans cette partie de l'étude sont : *HeLa* (nouveau jeu de données) [139], *HTB66* (mélanome malin humain) [140], *PC3* (cancer de la prostate) et *RWPE1* (cellules saines de la prostate) [141], *MCF7* (cancer du sein) [142]. Comme pour la figure (3.3A), les paramètres du modèle réduit sont ajustés pour essayer de reproduire au mieux les données expérimentales de survie des lignées cellulaires citées. Le procédé inclut un simple balayage de valeurs couplé à une fonction de score de type *RMSE*. La figure (3.7) présente les résultats de cette opération et le tableau (3.1) contient les jeux de paramètres avec lesquels les meilleures reproductions des données des différentes lignées sont obtenues.

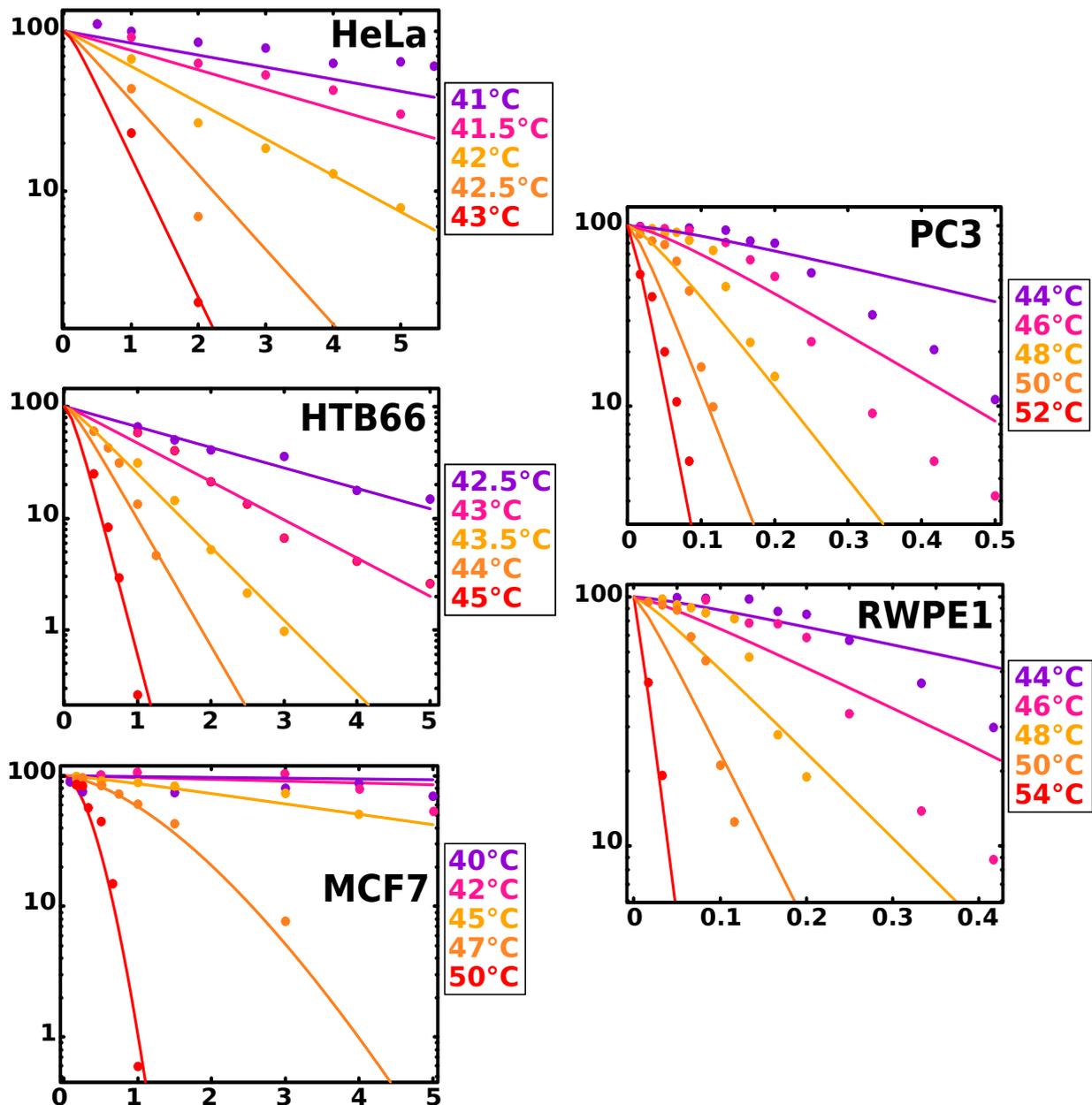


FIGURE 3.7 – Reproduction par le modèle réduit des données de survie en réponse au stress thermique de plusieurs lignées cellulaires. Pour toutes les lignées, l'axe des abscisses représente la durée du stress, celui des ordonnées la fraction de survie. Les températures maximales du stress thermique appliqué sont représentées par le code couleur disposé à droite de chaque panneau. Les paramètres correspondant à chaque ajustement sont regroupés dans le tableau (3.1).

TABLE 3.1 – Jeux de paramètres de l’ajustement des données de survie des différentes lignées cellulaires

Lignée	τ_P (h)	T^* (°C)	k_d	α (h^{-1})
<i>HeLa</i>	0,183	41,2	10	0,1
<i>HTB66</i>	0,183	42,51	6,2	0,126
<i>PC3</i>	0,183	40	3,0	0,11
<i>RWPE1</i>	0,183	39,1	2,1	0,1
<i>MCF7</i>	10	51,6	8,8	0,115

Bien que la qualité de l’ajustement est acceptable pour les cinq lignées précédentes, ces résultats sont uniquement préliminaires. En effet, l’amélioration de la qualité de reproduction des données de ces lignées et de bien d’autres est envisagée au moyen des algorithmes de *Levenberg-Marquardt* et de *Monte Carlo* par chaînes de *Markov*. Pour rappel, le but est de voir s’il est possible de reproduire les données de survie avec ce modèle uniquement basé sur un mécanisme de saturation des espèces réparatrices mais également de chercher une éventuelle corrélation entre les paramètres optimaux et la nature thermosensible ou thermorésistante des lignées cellulaires correspondantes.

Cette différence de sensibilité peut par exemple être quantifiée par le paramètre α qui lie la fraction de survie à la concentration des dommages dans le modèle, et une valeur plus élevée de ce paramètre témoigne d’une sensibilité accrue au stress thermique. D’un autre côté, les trois autres paramètres restants k_d , τ_P et T^* représentant respectivement une constante modulant le taux de dénaturation/renaturation, l’échelle de temps de la dynamique des dommages, et la température de saturation des ressources de réparation, peuvent être, d’une manière ou d’une autre, liés à la quantité totale de chaperons disponibles, vu que cette dernière est constante par normalisation dans le modèle. Il est donc peut être possible de fixer quelques uns de ces paramètres pour toutes les lignées cellulaires, et de compenser en faisant varier la concentration totale des espèces réparatrices.

3.5 Discussion

Nous avons réduit le modèle de survie cellulaire présenté au chapitre 2 pour en obtenir un nouveau d’une dimensionnalité moindre, qui est donc plus simple et suffisamment générique pour remplacer le *CEM43* dans la dosimétrie des profils temporels variables dans les protocoles d’hyperthermie. Contrairement au modèle *CEM43*, les paramètres de ce modèle réduit ont un sens biologique bien défini, lié aux taux de production, de renaturation et de dégradation des protéines dénaturées, qui peuvent tous être mesurés expérimentalement. Ce modèle dynamique de faible dimensionnalité est pour cette raison un atout pour combler l’écart entre les modèles descriptifs simples et ceux plus détaillés et plus compliqués à utiliser. Il présente un énorme potentiel dans l’élaboration des protocoles et la compréhension des phénomènes biologiques.

Comme il a été montré dans le chapitre précédent, les modèles de réseaux dynamiques sont très utiles dans l’étude de la réponse d’un système à des stress de profils temporellement variables. Mais plus généralement dans la description plus précise des effets de seuil. Les données expérimentales révèlent une transition abrupte dans la réponse de survie (aux environs de 43°C pour les cellules *HeLa*) dans plusieurs lignées cellulaires [143–145]. Le modèle dynamique réduit rend compte de cette transition via un mécanisme de saturation dans les procédés de renatura-

tion assurés par les chaperons au-delà d'un seuil de température.

Ainsi, une élévation rapide de la température dépassant le seuil sature rapidement le système de renaturation, et ce, pour une certaine durée, même si la température repasse en-dessous de la température du seuil, cet effet est désigné comme étant le *step-down heating* [146–148]. Pour un protocole thermique dont la température reste en-dessous du seuil, la forme temporelle du protocole n'a pas d'effet significatif sur la survie, et le *CEM43* reste valide dans ce cas.

Par la suite, le modèle réduit a permis l'étude de la potentielle synergie entre les protocoles d'hyperthermie et les molécules thérapeutiques qui ciblent les chaperons moléculaires et qui inhibent de ce fait les procédés de renaturation. Bien que l'idée stipulant que l'inhibition des *HSP* réduise la survie cellulaire en réponse à l'hyperthermie soit assez simple, des résultats préliminaires révèlent que la synergie entre les deux traitements n'est pas aussi triviale, montrant un effet de seuil en fonction du niveau d'inhibition des chaperons, et un effet d'asymétrie pour des températures plus basses que pour le cas de contrôle sans inhibition des chaperons. En modulant la température du seuil de saturation, il est donc possible de modifier la létalité du protocole thermique.

Enfin, le modèle a été utilisé dans la reproduction des données de survie cellulaire résultantes d'un traitement de stress thermique de plusieurs lignées. Bien que l'ajustement de ces données s'est uniquement réalisé par un simple balayage des valeurs des paramètres, sa qualité est plutôt acceptable. Nous planifions d'aller plus loin dans ce sens en utilisant des algorithmes d'optimisation plus sophistiqués dans la perspective de trouver une éventuelle corrélation entre les paramètres (qui, rappelons le, ont une définition biologique claire) et la nature résistante ou sensible au choc thermique des lignées cellulaires étudiées.

Chapitre 4

Modélisation de la mort cellulaire par apoptose

4.1 Introduction

Parmi les quelques dizaines de milliers de milliards de cellules qui constituent nos organes, quelques centaines de milliards meurent chaque jour, et d'autres sont créées pour les remplacer. Ce procédé nécessite un certain équilibre entre la mitose (division cellulaire) et l'apoptose (suicide cellulaire) [149], un excès de mitose peut conduire à la formation de tumeurs, et un excès d'apoptose peut entraîner la dégénérescence tissulaire. Contrairement à la nécrose, l'apoptose est un type de mort cellulaire dit programmé [65, 150, 151] en raison de son extrême organisation, elle est essentielle pour l'élimination du superflu cellulaire et des cellules potentiellement dangereuses pour leur voisinage. Elle présente l'avantage d'un évitement de réponse inflammatoire vu qu'à l'issue du processus, le contenu cellulaire n'est pas déversé dans le milieu extracellulaire.

Il existe deux voies de l'apoptose cellulaire : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque [80], deux chemins différents qui mènent à la même destination, à savoir l'activation des *Caspases-3*, qui par une cascade de réactions, conduit à la mort cellulaire et à la décomposition de la cellule en corps apoptotiques. Le réseau de l'apoptose a été très largement étudié, et présente encore à ce jour un immense intérêt en raison de son implication et de ses avantages (l'évitement de l'inflammation par la préservation de la membrane) dans les problématiques thérapeutiques [59–61, 152–154]. Les réseaux de signalisation de l'apoptose ont également été abondamment modélisés [68, 79, 155–158]. Dans ces modèles, le mécanisme de **bistabilité irréversible** [111] qui présente deux états stables pour le système revient souvent. Ce mécanisme permet le passage du système d'un état à l'autre une fois un seuil de signal dépassé (seuil qui peut présenter une quantité de dommages subis par la cellule suite à une exposition au stress par exemple), et le caractère irréversible assure l'accomplissement de l'auto-destruction cellulaire une fois la décision de mort prise, autrement, une décision réversible peut avoir un impact néfaste.

Dans les chapitres précédents, la réponse de survie cellulaire d'une colonie à l'issue d'une exposition au stress thermique a été modélisée, pour ce faire, le modèle *RRCT* a été couplé à une équation de population comportant une fonction de mort probabiliste. Dans cette partie, l'intérêt est plutôt orienté vers la réponse au stress d'une cellule unique, qui a une issue binaire de mort ou de survie, et un modèle minimal de l'apoptose intrinsèque est construit en s'inspirant du modèle de *Legewie* [79]. Ce modèle se base sur un comportement bistable irréversible dont les deux états stables correspondent à la survie et à la mort, définis respectivement par des fractions de *Caspase-3* basse et élevée. Il sera couplé au modèle *RRCT* dans la suite de nos travaux pour étudier la réponse d'une cellule unique en remplaçant l'équation de population et la fonction de mort probabiliste.

4.2 Modélisation de l'apoptose intrinsèque

En modélisation des réseaux de signalisation biologiques, la première étape consiste dans la compréhension et la caractérisation avec le plus de précision possible du système étudié, il faut donc identifier les espèces clés et les mécanismes de leurs interactions, sans quoi, il est difficile de reproduire les observations expérimentales. Le modèle de l'apoptose intrinsèque doit rester le plus simple possible, quelques approximations seront donc faites par la suite et permettront de réduire sa dimensionnalité sans pour autant altérer la réponse qui en sortirait. L'étude est ainsi entamée avec l'exploration de la voie intrinsèque de l'apoptose cellulaire pour cerner les espèces impliquées et la nature de leurs interactions, notamment, les activations, les inhibitions et les rétroactions. Une fois que le réseau est modélisé, ses paramètres doivent être fixés par estimation ou optimisation en considérant les contraintes du phénomène biologique qu'il doit décrire. Le but est de construire un modèle minimal de la mort cellulaire programmée pour remplacer l'équation de population et la fonction de mort probabiliste utilisées dans le chapitre 2, afin de décrire la réponse au choc thermique d'une cellule unique.

4.2.1 Identification des espèces clés du réseau apoptotique intrinsèque et construction du modèle

Les deux voies de l'apoptose (intrinsèque et extrinsèque) suivent deux protocoles différents, mais ciblent le même résultat, qui est l'activation des caspases effectrices. Le but n'est pas de modéliser le réseau apoptotique en détail, mais d'essayer de le simplifier tout en gardant les caractéristiques principales de la réponse [68], à savoir :

1. Une insensibilité vis-à-vis des stress faibles : la voie apoptotique doit s'enclencher uniquement quand un certain seuil de dommages est atteint.
2. Une irréversibilité de la décision de mort : une fois les caspases effectrices activées et suffisamment accumulées, le programme d'auto-destruction doit être mené à terme.
3. Le modèle doit présenter un certain délai entre l'exposition au signal (stress) et la réponse de mort, ce délai doit être d'autant plus court que le stress est élevé.

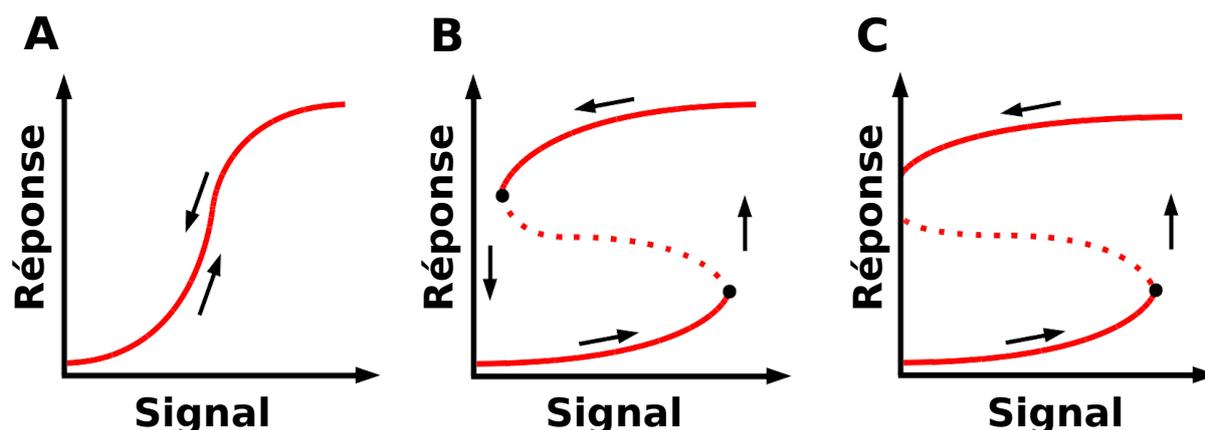


FIGURE 4.1 – Courbes signal-réponse présentant différentes caractéristiques. A- Ultra-sensibilité de la réponse en fonction d'un seuil de signal (monostabilité). B- Bistabilité réversible, quand le signal augmente et dépasse un seuil donné, le système bascule vers un autre état stable ; si le signal diminue, le système reste dans cet état stable jusqu'à ce que le signal soit trop faible pour le maintenir dedans, et il revient dans ce cas vers le premier état. C- Avec certaines conditions, la bistabilité peut devenir irréversible dans l'intervalle de signal étudié (et biologiquement pertinent).

La première condition nécessite l'implémentation d'un mécanisme de seuil et d'une réponse présentant une ultra-sensibilité au signal. La deuxième condition augmente la contrainte : une réponse irréversible peut être générée par l'introduction d'une boucle de rétroaction positive dans le modèle, permettant d'obtenir de la bistabilité (condition nécessaire mais pas suffisante) [111] avec un état stable représentant la vie et un autre la mort, en plus de la fixation des taux d'activation dans cette boucle à des valeurs suffisamment élevées pour que la bistabilité soit irréversible dans un intervalle de signal biologiquement pertinent (Fig. 4.1C). Quant à la troisième condition, elle est automatiquement satisfaite en raison des échelles de temps de réponse biologiques, mais il est à noter qu'il faut optimiser les paramètres du réseau si le but est de reproduire des temps de mort, résultants de l'exposition au stress, expérimentalement mesurés.

Un modèle du réseau de l'apoptose intrinsèque est construit en s'inspirant du **modèle de Legewie** [79], et en rassemblant toutes les espèces et les réactions (notamment les quelques protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques) intervenant entre l'induction des dommages et l'activation de la *Caspase-9*, dans un seul module appelé *DET*, et qui est directement activé par les dommages subis en cas d'exposition au stress (Fig. 4.2). Ce module existe dans deux états : un état inactif (*DET*) et un état actif (*DET**) qui peut activer la *Caspase-9*. Les caspases 9 et 3 ont également deux états, un inactif sous forme de procaspases (respectivement *pC9* et *pC3*), et un actif (respectivement *C9** et *C3**). *XIAP* séquestre (de manière réversible) les caspases uniquement dans leur état actif pour former les complexes (*X : C9**) et (*X : C3**), et est inhibé par *DET**. Une boucle de rétroaction positive est introduite entre les caspases actives, et la probabilité de mort cellulaire est supposée comme étant directement proportionnelle à la fraction de la *C3**.

Pour rappel, ce modèle minimal doit respecter les caractéristiques du réseau apoptotique précédemment citées, et donc, bien que *DET* est directement activé par les dommages (dépendance proportionnelle), le modèle dans son ensemble doit présenter une propriété de bistabilité irréversible et basculer de l'état de survie vers l'état de mort uniquement si *DET** atteint un certain seuil (bifurcation de nœud de selle) (Fig. 4.1 C).

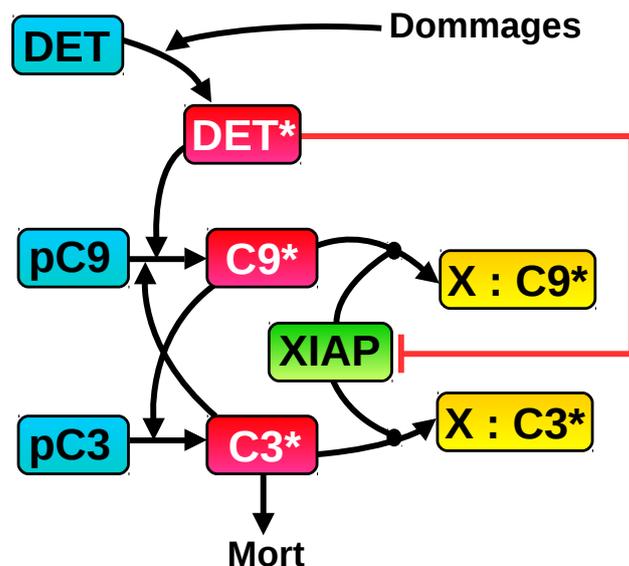


FIGURE 4.2 – Schéma explicatif du modèle du réseau d'apoptose intrinsèque. Les espèces pro-apoptotiques sont représentées en rouge, les anti-apoptotiques en vert, les espèces inactives en bleu et les complexes de séquestration en jaune. Les flèches symbolisent une régulation positive (activation) et les flèches à tête plate une régulation négative (inhibition).

4.2.2 Système d'équations différentielles décrivant le modèle

Le modèle de la voie intrinsèque de l'apoptose précédemment présenté peut être traduit en un système de 8 équations différentielles en considérant les dommages subis comme signal d'entrée et en appliquant la loi d'action de masse. Dans ce système, les procaspases 9 et 3 ainsi que *XIAP* sont synthétisées et dégradées de manière constante. *DET**, *C9** et *C3** sont activés en réponse aux dommages uniquement et sont également dégradables. La concentration totale de *DET* est normalisée à 1. Le tableau (4.1) regroupe l'ensemble des interactions du modèle, où les paramètres δ_u sont les taux linéaires de dégradation (u est un indice d'espèce), les K_u^\pm sont les constantes cinétiques de l'hétérodimérisation (association/dissociation) et les μ_u sont les taux basaux de synthèse. Les paramètres α , β , γ , δ sont respectivement les taux d'activation de *DET** par les dommages, de la *Caspase-3* par la *Caspase-9*, de la *Caspase-9* par la *Caspase-3*, et de la *Caspase-9* par *DET**.

TABLE 4.1 – Liste des réactions biochimiques et des taux correspondants

#	Réaction biochimique	Taux de réaction
R1	$\emptyset \longrightarrow XIAP$	μ_{XIAP}
R2	$\emptyset \longrightarrow pC9$	μ_{pC9}
R3	$\emptyset \longrightarrow pC3$	μ_{pC3}
R4	$XIAP \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{XIAP} [XIAP] + \delta_{DET^*:X} [DET^*] [XIAP]$
R5	$pC9 \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{pC9} [pC9]$
R6	$pC3 \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{pC3} [pC3]$
R7	$DET + \text{Dommages} \longrightarrow DET^* + \text{Dommages}$	α
R8	$DET^* \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{DET^*} [DET^*]$
R9	$DET^* + pC9 \longrightarrow DET^* + C9^*$	δ
R10	$2C9^* + pC3 \longrightarrow 2C9^* + C3^*$	β
R11	$C3^* + pC9 \longrightarrow C3^* + C9^*$	γ
R12	$C9^* + XIAP \longrightarrow X : C9^*$	$K_{XIAP:C9^*}^+ [C9^*] [XIAP]$
R13	$C3^* + XIAP \longrightarrow X : C3^*$	$K_{XIAP:C3^*}^+ [C3^*] [XIAP]$
R14	$X : C9^* \longrightarrow XIAP + C9^*$	$K_{XIAP:C9^*}^- [X : C9^*]$
R15	$X : C3^* \longrightarrow XIAP + C3^*$	$K_{XIAP:C3^*}^- [X : C3^*]$
R16	$X : C9^* \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{X:C9^*} [X : C9^*]$
R17	$X : C3^* \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{X:C3^*} [X : C3^*]$
R18	$C9^* \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{C9^*} [C9^*]$
R19	$C3^* \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{C3^*} [C3^*]$
R20	$DET^* \longrightarrow \emptyset$	$\delta_{DET^*} [DET^*]$

Il est à noter que dans la réaction (R4), la dégradation totale de *XIAP* est séparée en deux parties : une dégradation linéaire avec un taux ($\delta_{XIAP} [XIAP]$), et une dégradation due à la présence de *DET** avec un taux ($\delta_{DET^*:X} [DET^*] [XIAP]$). Ceci s'explique par le fait que *XIAP*

est séquestré par *Smac* [75], cependant, dans notre modèle, le *cytochrome-c* et *Smac* sont tous les deux inclus dans le module DET^* , et vu que c'est uniquement *Smac* qui séquestre *XIAP* et non pas le *cytochrome-c*, il serait impertinent que DET^* séquestre *XIAP*. C'est pourquoi ce mécanisme de séquestration est représenté dans le modèle par une dégradation de *XIAP* avec un taux proportionnel à la concentration de DET^* . Il est également à noter qu'un mécanisme de **coopérativité** est inclus dans l'activation de la *Caspase-3* par la *Caspase-9* (Réaction *R10*) [68,156]. Enfin, la probabilité d'apoptose est considérée comme directement proportionnelle à la fraction de $C3^*$, ce qui est une hypothèse très raisonnable.

Ainsi, en appliquant tout naturellement la loi d'action de masse, le système d'équations différentielles 4.1 définissant le modèle est obtenu. Tous les paramètres du modèle seront fixés par la suite, notamment, les taux de synthèse et de dégradation seront ceux utilisés dans le modèle de *Legewie* [79]. Les paramètres d'activation α , β , γ , δ et le taux de dégradation de DET^* (δ_{DET^*}) introduits en conséquence de la modification du modèle de *Legewie*, seront quant à eux optimisés pour générer une réponse bistable irréversible.

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}[DET^*] &= \delta_{DET^*}(\alpha (DET_{tot} - [DET^*])[Dommages] - [DET^*]) \\
\frac{d}{dt}[XIAP] &= \mu_{XIAP} - \delta_{XIAP}[XIAP] - K_{XIAP:C9^*}^+ [C9^*][XIAP] \\
&\quad - K_{XIAP:C3^*}^+ [C3^*][XIAP] + K_{XIAP:C9^*}^- [X : C9^*] \\
&\quad + K_{XIAP:C3^*}^- [X : C3^*] - \delta_{DET^*.X}[DET^*][XIAP] \\
\frac{d}{dt}[pC9] &= \mu_{pC9} - \delta_{pC9}[pC9] - \gamma[pC9][C3^*] \\
\frac{d}{dt}[pC3] &= \mu_{pC3} - \delta_{pC3}[pC3] - \beta[pC3][C9^*]^2 \\
\frac{d}{dt}[C9^*] &= -\delta_{C9^*}[C9^*] - K_{XIAP:C9^*}^+ [C9^*][XIAP] + K_{XIAP:C9^*}^- [X : C9^*] \\
&\quad + \delta[DET^*][pC9] + \gamma[pC9][C3^*] \\
\frac{d}{dt}[C3^*] &= -\delta_{C3^*}[C3^*] - K_{XIAP:C3^*}^+ [C3^*][XIAP] + K_{XIAP:C3^*}^- [X : C9^*] \\
&\quad + \beta[pC3][C9^*]^2 \\
\frac{d}{dt}[X : C9^*] &= K_{XIAP:C9^*}^+ [C9^*][XIAP] - K_{XIAP:C9^*}^- [X : C9^*] \\
&\quad - \delta_{X:C9^*}[X : C9^*] \\
\frac{d}{dt}[X : C3^*] &= K_{XIAP:C3^*}^+ [C3^*][XIAP] - K_{XIAP:C3^*}^- [X : C3^*] \\
&\quad - \delta_{X:C3^*}[X : C3^*]
\end{aligned} \tag{4.1}$$

avec : $DET_{tot} = 1$

4.3 Paramétrage du modèle de l'apoptose intrinsèque

Une partie des paramètres du réseau est fixée en s'aidant du modèle de *Legewie* [79], qui se base sur des concentrations totales expérimentalement mesurées des caspases 9 et 3 et de *XIAP* [72,159–162], et un ajustement des taux de synthèse avec un taux de dégradation constant (pour simplifier) pour obtenir ces mêmes concentrations (Table. 4.2). Le seul paramètre estimé dans le modèle est le ($\delta_{DET^*.X}$) représentant le taux de dégradation de *XIAP* due à DET^* (pour rappel, cette dégradation de *XIAP* par DET^* vient du fait que *XIAP* est séquestré par *Smac* mais pas par le *cytochrome-c*), et qui est supposé comme étant égal à trois fois le taux de dégradation "naturelle" de *XIAP* ($\delta_{DET^*.X} = 3 \delta_{XIAP}$).

TABLE 4.2 – Paramètres fixés du modèle de l'apoptose intrinsèque

Paramètre	Définition	Valeur fixée
μ_{XIAP}	taux de synthèse de $XIAP$	0,144 ($\mu\text{M h}^{-1}$)
δ_{XIAP}	taux de dégradation de $XIAP$	3,6 (h^{-1})
μ_{pC9}	taux de synthèse de $pC9$	0,072 ($\mu\text{M h}^{-1}$)
δ_{pC9}	taux de dégradation de $pC9$	3,6 (h^{-1})
μ_{pC3}	taux de synthèse de $pC3$	0,72 ($\mu\text{M h}^{-1}$)
δ_{pC3}	taux de dégradation de $pC3$	3,6 (h^{-1})
δ_{C9^*}	taux de dégradation de $C9^*$	3,6 (h^{-1})
δ_{C3^*}	taux de dégradation de $C3^*$	3,6 (h^{-1})
$\delta_{X:C3^*}$	taux de dégradation de $X : C3^*$	3,6 (h^{-1})
$\delta_{X:C9^*}$	taux de dégradation de $X : C9^*$	3,6 (h^{-1})
$K_{X:C9^*}^+$	affinité d'association de $XIAP/C9^*$	3,6E+03 ($\mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$)
$K_{X:C3^*}^+$	affinité d'association de $XIAP/C3^*$	10,8E+03 ($\mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$)
$K_{X:C9^*}^-$	taux de dissociation de $XIAP/C9^*$	3,6 (h^{-1})
$K_{X:C3^*}^-$	taux de dissociation de $XIAP/C3^*$	3,6 (h^{-1})
$\delta_{DET^*:X}$	taux de dégradation de $XIAP$ par DET^*	10,8 ($\mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$)

4.3.1 Bistabilité irréversible et analyse de bifurcation

Dans ce qui suit, le signal d'entrée est désigné comme étant la concentration de DET^* au lieu des dommages, et nous considérons qu'il faut au moins l'activation de 50% de DET_{tot} (choix arbitraire) pour enclencher la machinerie de l'apoptose. En effectuant ce changement de signal d'entrée (*Dommages* \rightarrow DET^*), les paramètres α (taux d'activation de DET par les dommages) et δ_{DET^*} (taux de dégradation de DET^*) ne nécessitent pas d'être optimisés pour le moment, mais ils serviront par la suite à coupler le modèle de l'apoptose avec le modèle *RRCT* pour reproduire des données expérimentales de la mort fractionnelle suite à une exposition au stress thermique dans le chapitre 5. Ainsi, et à présent que le réseau de réactions biochimiques modélisant l'apoptose est construit et que les paramètres de synthèse et de dégradation sont fixés, les paramètres β , γ et δ représentant respectivement le taux d'activation de la *Caspase-3* par la *Caspase-9*, le taux d'activation de la *Caspase-9* par la *Caspase-3* et le taux d'activation de la *Caspase-9* par DET^* , doivent être ajustés dans le but de générer une réponse bistable irréversible.

Comme précédemment mentionné, la probabilité de mort par apoptose est supposée être directement proportionnelle à la fraction de $C3^*$, et donc, le système doit présenter deux états stables (bistabilité) : un état de survie avec une très basse fraction de $C3^*$, et un état de mort

avec une fraction de $C3^*$ élevée. Le seuil auquel le système bascule du premier état vers le deuxième est arbitrairement fixé à $DET^* = 0,5$ (50% de DET_{tot}) et représente ainsi un point de bifurcation. Une fois que le système se trouve dans l'état de mort avec une fraction suffisamment élevée de $C3^*$, il doit y rester, même si le signal diminue et atteint zéro (irréversibilité de la réponse). La figure (4.3) schématise ce comportement.

Sur cette figure, les points fixes instables du système sont représentés par la courbe en pointillés. Le point fixe instable correspondant à $DET^* = 0$ détermine le seuil de la fraction de $C3^*$ nécessaire pour arriver à l'état de mort même en absence de signal. Quand DET^* augmente, la fraction de $C3^*$ augmente également, mais si après une certaine durée DET^* revient à son niveau basal d^* en dessous du seuil de bifurcation ($DET^* = 0,5 = \frac{1}{2} DET_{tot}$), la fraction de $C3^*$ qui "aura eu le temps" de s'accumuler détermine le destin du système :

- Si elle est supérieure au seuil (point fixe instable correspondant au niveau basal de DET^*), les $C3^*$ accumulées peuvent entretenir la boucle de rétroaction positive avec les $C9^*$ et l'état de mort est atteint.
- Sinon, le système survit car la fraction de $C3^*$ accumulées n'est pas suffisante pour mener à terme le processus, et elles sont éliminées par dégradation ou séquestrées par $XIAP$.

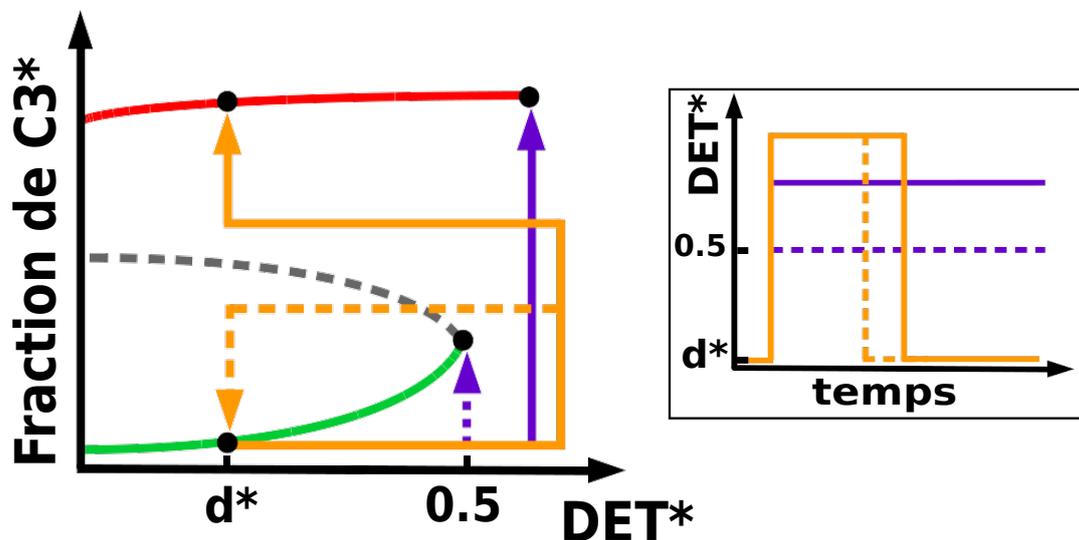


FIGURE 4.3 – Schéma explicatif de la réponse bistable irréversible du système en fonction de DET^* . La courbe en vert désigne l'état de survie, celle en rouge l'état de mort, et celle en pointillés gris les points fixes instables. d^* représente un niveau basal de DET^* inférieur à 0,5 (qui est le seuil de bifurcation). Les profils temporels du signal DET^* se distinguent par un code couleur (orange, violet) et par des courbes pleines ou en pointillés.

Pour certaines valeurs des paramètres (β, γ, δ) , le modèle de l'apoptose intrinsèque présente une réponse (fraction de $C3^*$) bistable irréversible avec seuil de bifurcation à $DET^* = 0,5$. Dans un premier temps, ces paramètres sont fixés à $(5,01E+05; 707,95; 0,88)$ respectivement. La figure (4.4) présente l'évolution de la fraction de $C3^*$ au point fixe en fonction des amplitudes du signal de type "marche" de DET^* . En augmentant l'amplitude du signal, la fraction de $C3^*$ augmente graduellement, et quand le signal dépasse la valeur seuil ($DET^* = 0,5$), la fraction de $C3^*$ augmente brusquement. Si on diminue l'amplitude du signal par la suite, la fraction de $C3^*$ garde sa valeur élevée, et ce, même si le signal repasse en-dessous du seuil, ce qui correspond à un caractère irréversible. En fonction des combinaisons de paramètres (β, γ) , en supposant que δ est fixé en conséquence pour avoir une bifurcation à $DET^* = 0,5$, les points fixes stables et instables du système varient, et permettent d'obtenir des variantes de la courbe de la figure (4.4).

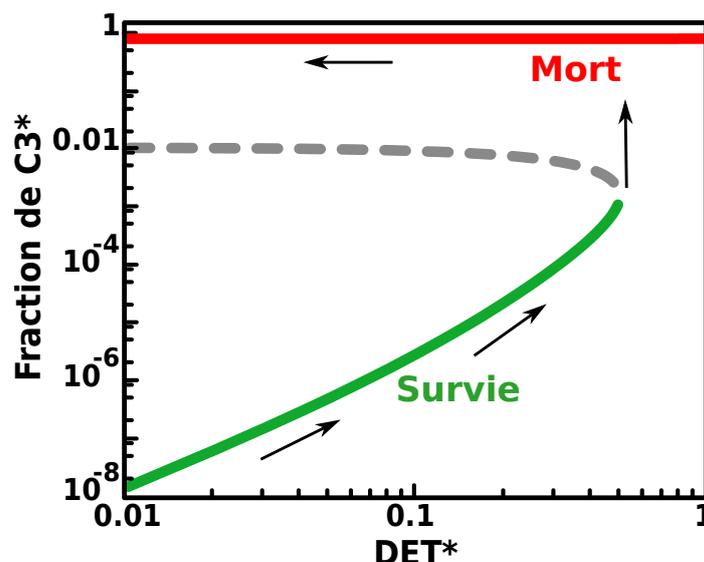


FIGURE 4.4 – Fraction de $C3^*$ au point fixe en réponse à des "marches" de DET^* de différentes amplitudes. Cette évolution correspond à des valeurs de paramètres : $(\beta; \gamma; \delta) = (5,01E+05; 707,95; 0,88)$. La fraction de $C3^*$ et l'amplitude de DET^* sont en échelle logarithmique. La courbe en vert représente l'état de survie, celle en rouge l'état de mort. La courbe en pointillés désigne les états instables. Les flèches désignent la trajectoire du système en fonction de l'amplitude de DET^* .

Il est cependant à noter que dans la suite des travaux, quand ce modèle de l'apoptose sera couplé au modèle *RRCT*, les paramètres α et δ_{DET^*} seront tout aussi déterminants du destin cellulaire car ils contrôlent la dynamique de DET^* en la liant à celle des dommages, qui sont les protéines dénaturées dans ce modèle. Par exemple, en augmentant le paramètre δ_{DET^*} , DET^* est dégradé plus rapidement, et ceci diminue les chances d'apoptose. D'un autre côté, en augmentant α et pour une même concentration de dommages, DET^* augmente et les probabilités de mort avec.

4.3.2 Dynamique des espèces clés du modèle

Toujours en utilisant le même jeu de paramètres $(\beta; \gamma; \delta) = (5,01E+05; 707,95; 0,88)$, des simulations de l'évolution temporelle des acteurs clés de la réponse : $XIAP$, $C9^*$ et $C3^*$ en réponse à une "marche" de DET^* sont réalisées (Fig. 4.5). Si DET^* est inférieur au seuil de 0,5, les fractions des caspases 9 et 3 actives restent très basses et la fraction de $XIAP$ diminue mais reste assez élevée, car cette dernière se lie au caspases activées pour les séquestrer, et sa dégradation est parallèlement activée par DET^* (équivalent d'une séquestration par *Smac*).

Par contre, si DET^* est supérieur au seuil de 0,5, les caspases activées commencent à s'accumuler et leurs fractions augmentent. La fraction de la protéine $XIAP$ diminue alors significativement. Une fois la saturation atteinte (il ne reste plus de protéines $XIAP$ libres), les caspases activées restent libres, s'activent mutuellement et complètent le procédé d'apoptose. Il est à noter que la fraction de $C9^*$ au point fixe est supérieure à celle de $C3^*$ parce que l'affinité d'association de $XIAP/C9^*$ est inférieure à celle de $XIAP/C3^*$ (Table. 4.2). Par ailleurs, au-dessus du seuil de 0,5, plus l'amplitude de DET^* est élevée, plus rapidement l'état de mort est atteint (comparer les tracés temporels de $C3^*$ sur la figure 4.5), ce qui correspond à une sensibilité du système vis-à-vis de la sévérité du stress, présentant un délai de réponse même quand $DET^* = DET_{tot} = 1$.

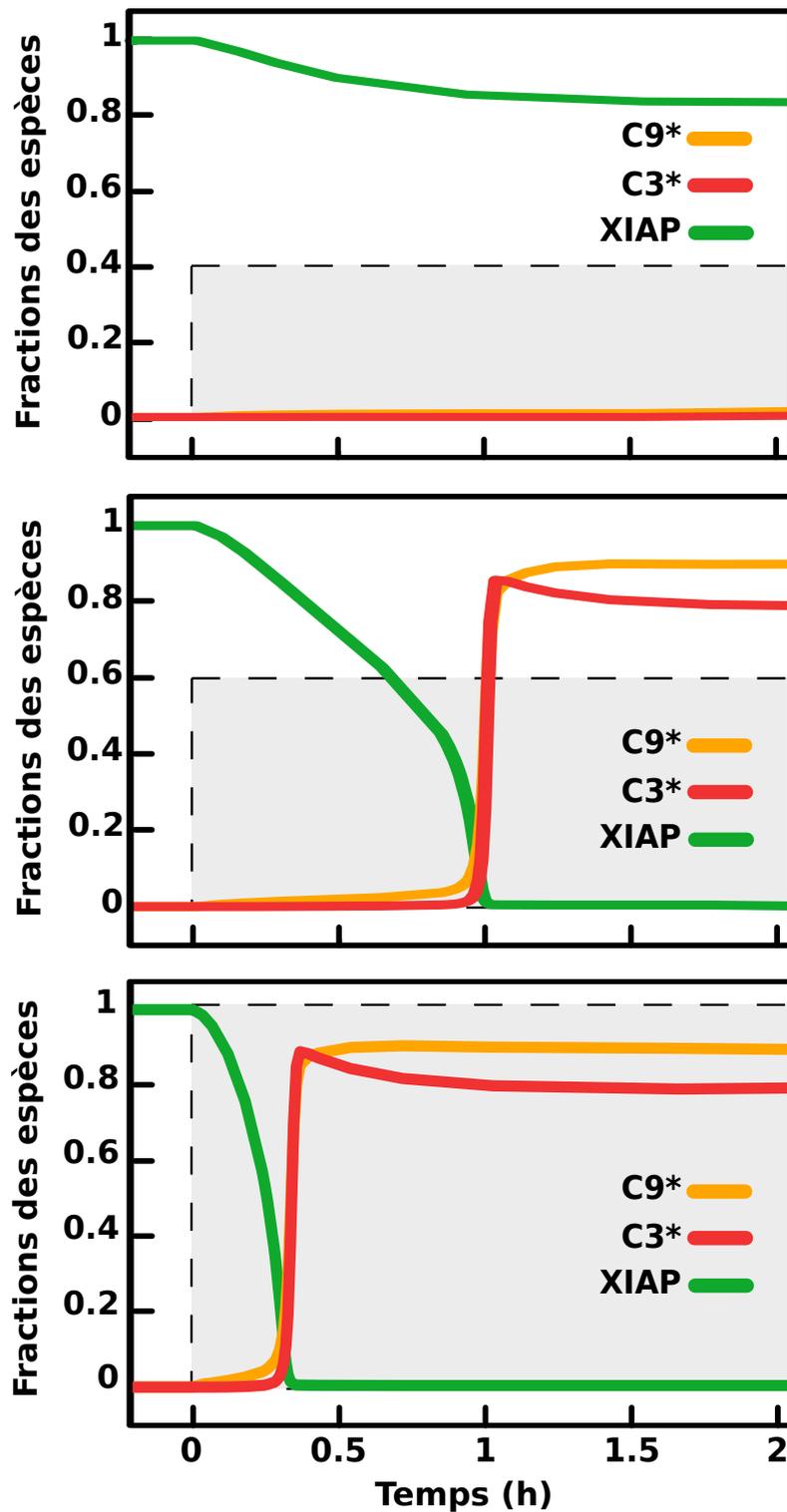


FIGURE 4.5 – Tracés temporels des fractions de $XIAP$, $C9^*$ et $C3^*$ en réponse à une "marche" de DET^* . Cette évolution correspond à des valeurs de paramètres : $(\beta; \gamma; \delta) = (5,01E+05; 707,95; 0,88)$. La zone grise représente le profil dynamique de DET^* (de type "marche"). Plus l'amplitude de DET^* est élevée, plus rapidement l'état de mort (fraction élevée de $C3^*$) est atteint.

4.3.3 Combinaisons de paramètres (β, γ, δ) pour une bistabilité irréversible

Nous allons maintenant déterminer, en procédant par un balayage logarithmique des valeurs, les différentes combinaisons (β, γ, δ) dans l'espace des paramètres qui permettent d'avoir une réponse bistable et irréversible en fonction de la fraction de $C3^*$, et avec un point de bifurcation $DET^* = 0,5$ (Fig. 4.3). Quelques contraintes sont ajoutées par la suite par souci de cohérence avec les données expérimentales biologiques.

Bistabilité irréversible avec une fraction de $C3^*$ élevée dans l'état de mort

Les simulations sont réalisées à partir du principe suivant : les paramètres β et γ sont d'abord fixés (par balayage logarithmique), des signaux de DET^* de type "marche" sont ensuite appliqués et prennent des amplitudes croissantes, les combinaisons qui donnent une réponse bistable et irréversible, avec deux états bien distincts en fonction des fractions de $C3^*$ sont enregistrées. Cependant, il est à noter que seuls les états de mort avec $C3^* > 0.1 C3_{tot}$ (au moins 10% des *Caspases-3* doivent être activées pour avoir de la mort) sont considérés. Par ailleurs, pour chaque combinaison (β, γ) , la valeur du paramètre δ est fixée de telle façon à assurer un basculement du système de l'état de vie à l'état de mort quand le seuil $DET^* = 0,5$ est atteint, tout en gardant le caractère irréversible de la réponse. La figure (4.6) présente la fraction de $C3^*$ dans l'état de mort obtenue pour chaque combinaison (β, γ) . Cette fraction augmente en fonction des deux paramètres.

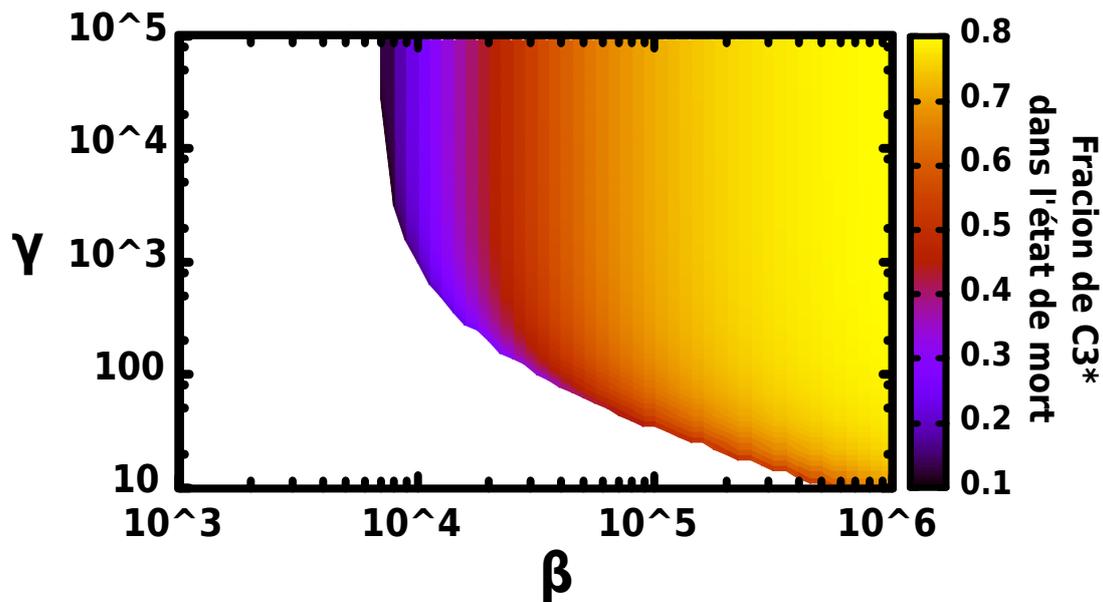


FIGURE 4.6 – Fraction de $C3^*$ de l'état de mort en fonctions des combinaisons (β, γ) . Le code couleur indique la fraction de $C3^*$ de l'état de mort en échelle linéaire. La zone blanche indique l'absence de bistabilité irréversible.

Une fraction de $C3^*$ raisonnablement basse au point de bifurcation

Sous exposition au stress, la fraction des caspases activées augmente avec un taux dépendant de la sévérité du stress (vitesse d'accumulation des dommages) jusqu'à atteindre le point de bifurcation où l'augmentation est très brusque. Toutefois, une dernière contrainte est à imposer : la fraction de $C3^*$ juste avant le basculement vers l'état de mort doit être basse puisque le seuil ($DET^* = 0,5$) n'est pas encore atteint à ce moment là, néanmoins, elle ne doit pas être trop basse. Autrement, cela n'aurait aucune pertinence du point de vue biologique. La figure (4.7) montre la variation de cette fraction en fonction des combinaisons (β, γ) . Cette fraction décroît

quand les paramètres β et γ augmentent, vu qu'en augmentant, ils renforcent la rétroaction positive entre les caspases activées et rendent donc la transition d'un état à l'autre plus brusque. *A contrario*, quand β et γ diminuent, la transition est plus "douce", et la fraction de $C3^*$ au point de bifurcation est un peu plus élevée.

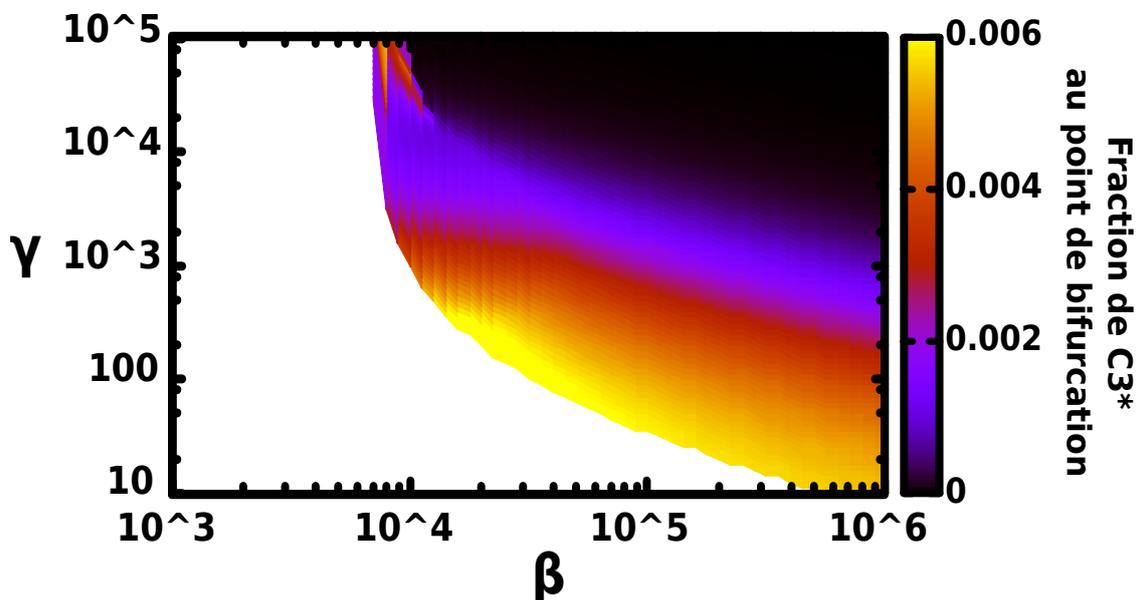


FIGURE 4.7 – Fraction de $C3^*$ au point de bifurcation ($DET^* = 0.5$) en fonction des combinaisons (β, γ) . Le code couleur indique la fraction de $C3^*$ au point de bifurcation $DET^* = 0.5$ en échelle linéaire. La zone blanche indique l'absence de bistabilité irréversible.

4.3.4 Subdivision de l'espace des paramètres

Les combinaisons (β, γ) permettant au modèle de l'apoptose intrinsèque d'avoir un comportement bistable irréversible ont été déterminées. Ceci-dit, ces combinaisons diffèrent dans la valeur que prend la fraction de $C3^*$ dans l'état de mort et au point de bifurcation. Conséquemment, il est possible de subdiviser l'espace des paramètres (β, γ) en zones satisfaisant différents critères vis-à-vis de ces deux fractions. Pour ce faire, la cohérence entre les contraintes de subdivision de l'espace des paramètres concernant la fraction de $C3^*$ et les données expérimentales biologiques doit être toutefois assurée.

En effet, le nombre total des protéines dans une cellule de la lignée *HeLa* est estimé à 2×10^9 /cellule environ [163], et le nombre de gènes exprimés dans cette même lignée à 10^4 au moins [164]. Nous estimons ainsi le nombre de copies par type de protéines à 10^5 copies/cellule. Il faut donc prendre une fraction de $C3^*$ au point de bifurcation au moins supérieure à 10^{-5} , autrement, cela n'aurait aucun sens du point de vue biologique. En outre, il a été montré que la fraction de $C3$ clivée (activée) varie de 10 à 80% dans les cellules apoptotiques de la lignée *EC109* (cancer de l'œsophage) en fonction de la dose du stimulus (*adénosine*) [165].

En prenant en compte ces points, l'espace des paramètres peut être restreint pour ne considérer, par exemple, que les combinaisons (β, γ) donnant une fraction de $C3^*$ supérieure à 50% dans l'état de mort, et supérieure à 0,1% (10^{-3}) au point de bifurcation ($DET^* = 0,5$). L'espace des paramètres (β, γ) peut donc être dans ce cas subdivisé en 5 zones (Fig. 4.6, 4.7, 4.8) :

1. La zone 1 (jaune) contient des combinaisons (β, γ) donnant au moins une fraction de $C3^*$ de 50% dans l'état de mort.

2. La zone 2 (bleue), présente les combinaisons donnant au moins une fraction de $C3^*$ de 0,1% au point de bifurcation ($DET^* = 0,5$).
3. La zone 3 (rayures jaunes et bleues), représente un chevauchement des zones 1 et 2, et présente donc les combinaisons satisfaisant les deux contraintes précédemment citées.
4. Les combinaisons de la zone 4 (grise) ne satisfont aucune des deux contraintes, la fraction de $C3^*$ est inférieure à 50% dans l'état de mort et inférieure à 0,1% au point de bifurcation.
5. La zone 5 (blanche) représente la partie de l'espace des paramètres où le comportement bistable irréversible n'est pas obtenu.

Les fractions de 0,1 et 50% utilisées dans la subdivision ne sont qu'un exemple, et d'autres valeurs donnent un autre schéma de subdivision de l'espace des paramètres. En absence de données expérimentales concernant la dynamique de la $C3^*$ durant le processus d'apoptose induit par une exposition au choc thermique, la seule solution est de prendre des estimations "intuitivement acceptables" qui restent néanmoins cohérentes avec les données expérimentales disponibles mentionnées précédemment.

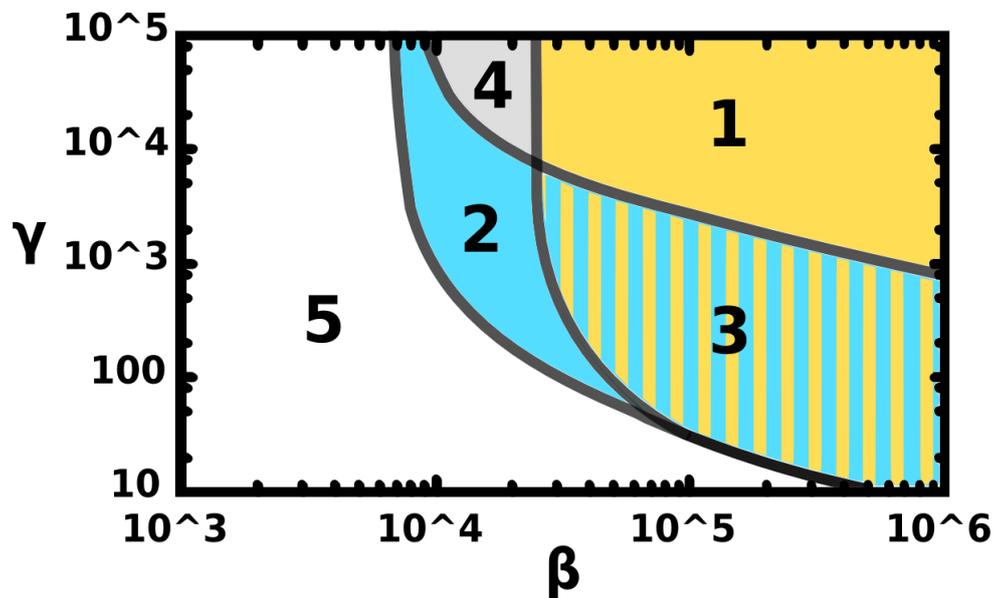


FIGURE 4.8 – **Subdivision de l'espace des paramètres (β, γ) en zones satisfaisant différents critères.** Zone 1 (jaune) → une fraction de $C3^* > 0,5$ dans l'état de mort. Zone 2 (bleue) → une fraction de $C3^* > 0,001$ au point de bifurcation ($DET^* = 0,5$). Zone 3 (rayures) → chevauchement des zones 1 et 2. Zone 4 → aucune des deux contraintes précédentes n'est satisfaite. Zone 5 → pas de bistabilité irréversible.

4.4 Discussion

Le modèle minimal de la voie intrinsèque de l'apoptose cellulaire donne une réponse bistable irréversible avec un point de bifurcation à $DET^* = 0,5$ en fonction des combinaisons de paramètres (β, γ, δ) . Chaque combinaison satisfait trois contraintes, à savoir, une fraction de $C3^*$ basse dans l'état de survie et élevée dans l'état de mort, un seuil de bifurcation de l'état de survie vers l'état de mort fixé à $DET^* = 0,5$, et une irréversibilité de la réponse une fois l'état de mort atteint même en absence de signal. En outre, ce modèle présente une sensibilité vis-à-vis de la sévérité du stress en termes de temps de réponse (présence d'un délai entre l'application

du stimulus et la mort). Le but à présent est d'utiliser ce modèle simple en le couplant au modèle *RRCT* pour décrire la réponse au stress thermique d'une cellule unique, et potentiellement reproduire des données expérimentales de mort cellulaire fractionnelle suite à l'exposition à un choc thermique. Le phénomène de la mort fractionnelle est très étudié et plusieurs causes ont été rapportées [99, 166, 167], notamment, la variabilité des concentrations de certaines protéines entre les cellules d'une colonie [100].

Chapitre 5

Modélisation de la mort fractionnelle en réponse au choc thermique

5.1 Introduction

Dans les thérapies anti-cancer, la variabilité de la réponse tumorale constitue un obstacle de taille : pour un même protocole de traitement, des cellules cancéreuses constituant la tumeur meurent, alors que d'autres survivent. Ceci vient du fait que la tumeur à éradiquer est constituée d'une population cellulaire hétérogène [168–171], et même si toutes les cellules sont génétiquement identiques et appartiennent au même tissu, chaque cellule est différente des autres. Cette différence appelée variabilité cellulaire, peut avoir plusieurs sources [172], classées comme étant source intrinsèque ou extrinsèque [173, 174]. Les sources intrinsèques désignent la stochasticité dans les procédés biochimiques comme par exemple la transcription ou la traduction [175], les sources extrinsèques quant à elles, représentent les différences d'une cellule à une autre en termes de quantité des composants cellulaires [91–93, 176], de phases du cycle cellulaire dans lesquelles elles se trouvent [177] ou de conditions environnementales [178].

Cette hétérogénéité et son impact sur la survie cellulaire à l'issue d'une exposition au stress présente un intérêt majeur et a été extensivement étudiée [100, 156, 179–182]. L'une des hypothèses qui revient souvent est celle de la différence dans les concentrations des espèces clés du réseau de réponse au stress et/ou du réseau apoptotique [93, 94], qui fait que certaines cellules peuvent mieux "gérer" les situations de stress et donc survivre. En effet, des études ont mis en évidence le fait que les concentrations des protéines sont distribuées suivant une **loi normale logarithmique** [183] au sein d'une population cellulaire monoclonale avec un coefficient de variation CV [184] dans l'intervalle $[0.2 - 0.3]$ [100, 185].

Dans le chapitre 2, le modèle dynamique du *RRCT* a été couplé à une équation de population pour reproduire les données de fraction de survie d'une colonie cellulaire à l'issue d'un protocole thermique. Dans ce chapitre, l'impact d'une variabilité au niveau de la concentration des protéines chaperons *HSP*, puis des protéines anti-apoptotiques *XIAP*, au moment de l'exposition au stress thermique, sur le destin cellulaire est quantifié ; en partant de l'hypothèse que cette variabilité peut causer de la mort fractionnelle. Pour ce faire, le modèle de l'apoptose intrinsèque développé au chapitre 4 est couplé au modèle *RRCT* pour décrire la réponse au stress thermique d'une cellule unique. Puis, une variabilité de la concentration des protéines citées est introduite via une distribution log-normale de ces dernières. Le but étant de reproduire des données expérimentales de mort fractionnelle en réponse à différents protocoles d'hyperthermie de [1]. Contrairement donc au premier modèle de survie cellulaire impliquant une fonction de mort probabiliste, le modèle de l'apoptose intrinsèque est utilisé afin de générer une réponse binaire de survie ou de mort conditionnée par la concentration initiale des protéines clés.

5.2 Couplage du modèle de l'apoptose intrinsèque au modèle *RRCT*

La première étape consiste à trouver une manière biologiquement justifiée de lier le modèle de l'apoptose intrinsèque au modèle *RRCT*. La voie intrinsèque de l'apoptose peut être déclenchée en réponse à divers stimuli, entre autres, l'accumulation des protéines dénaturées. Des études expérimentales ont démontré que l'hyperthermie peut induire la mort cellulaire par apoptose [186,187] par le biais des espèces réactives de l'oxygène (*ROS*, *Reactive Oxygen Species*) et du stress du réticulum endoplasmique [188]. En effet, dans les conditions normales, le réticulum endoplasmique transmet un flux de Ca^{2+} vers la mitochondrie servant à la régulation de la production d'*ATP* et du métabolisme [189]. L'accumulation des protéines dénaturées peut saturer la machinerie contrôle-qualité du réticulum endoplasmique et causer ainsi un stress. Le stress du réticulum endoplasmique crée une surcharge de Ca^{2+} dans la mitochondrie, conduisant à l'augmentation des *ROS* et à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, enclenchant la voie apoptotique intrinsèque [190,191].

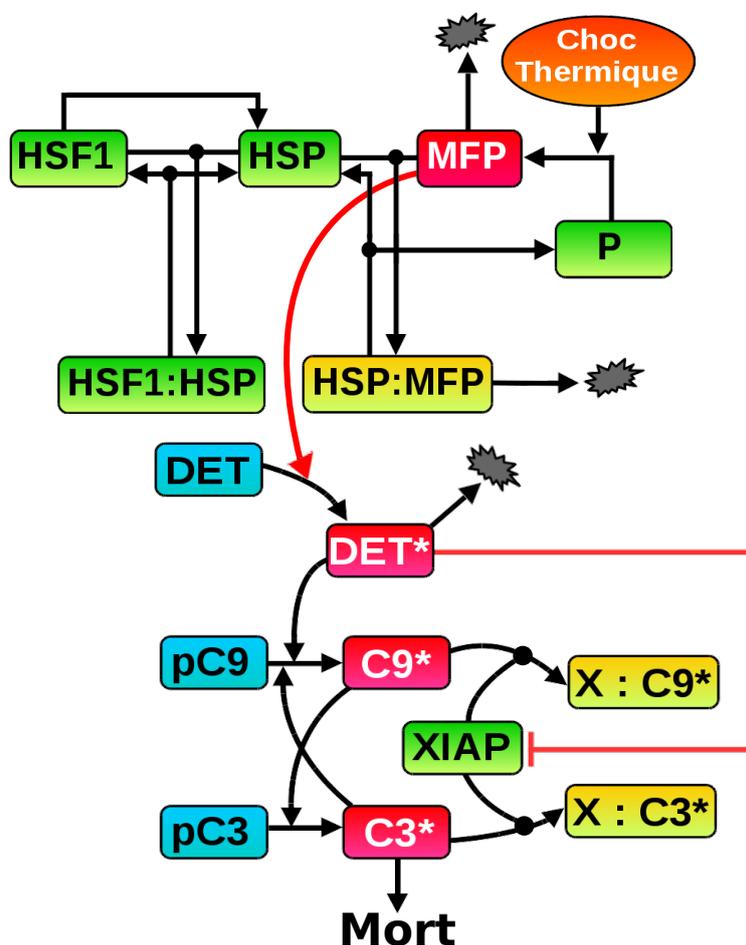


FIGURE 5.1 – Couplage du modèle *RRCT* au modèle de l'apoptose intrinsèque. Les deux modèles sont couplés via une activation du module *DET* par les protéines dénaturées *MFP* (flèche rouge) induites par le stress thermique. Il en résulte donc un modèle de réponse cellulaire au choc thermique d'une cellule unique (réponse binaire survie/mort).

Dans le modèle *RRCT*, l'unique dommage induit par le stress thermique est la dénaturation des protéines. Nous considérons que les protéines dénaturées activent le module *DET* du modèle de l'apoptose, et les deux modèles sont donc couplés en se basant sur cette hypothèse (Fig. 5.1).

Il s'en suit que plus le stress est intense et long, plus les protéines dénaturées s'accumulent, et plus les probabilités de mort augmentent. Pour rappel, le modèle apoptotique présente un comportement bistable irréversible avec un seuil arbitrairement fixé à $DET^* = 0,5$ (en fonction des paramètres β, γ, δ). Le couplage du modèle *RRCT* avec le modèle de l'apoptose donne un modèle global représentant la réponse d'une cellule unique au choc thermique. Une première simulation faisant intervenir ce modèle global est réalisée pour illustrer sa réponse dynamique. Les paramètres ($\beta; \gamma; \delta$) sont fixés aux valeurs précédemment utilisées ($5,01E+05; 707,95; 0,88$) dans le chapitre 4, les paramètres α (taux d'activation de *DET* par les *MFP*) et δ_{DET^*} (taux de dégradation de *DET^**) sont arbitrairement fixés à 1, et les paramètres du modèle *RRCT* restent inchangés. Le système est par la suite exposé à un stress de 43°C pour une durée de $3h$. La figure (5.2) présente l'évolution dynamique de la concentration des *MFP*, de *DET^** et de la fraction de *C3^** résultante. La dynamique de *DET^** suit celle des *MFP* avec un certain délai. De son côté, la *C3^** s'accumule jusqu'à atteindre l'état de mort qui est permanent (irréversible). Le temps de mort T_{mort} désigne le moment où la fraction de *C3^** atteint sa valeur de l'état de mort dépendante des paramètres (β, γ, δ).

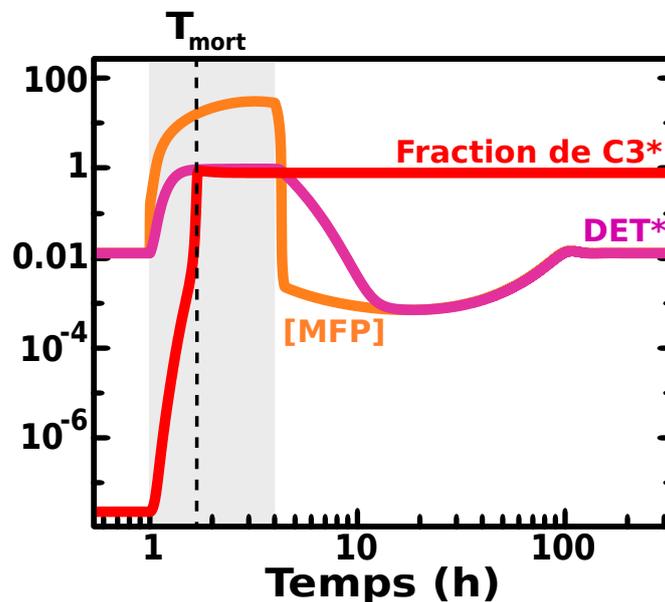


FIGURE 5.2 – Dynamique du modèle global en réponse à un stress de 43°C $3h$. Les paramètres du modèle *RRCT* sont inchangés. Pour le modèle de l'apoptose, les paramètres ont été fixés à $(\alpha; \delta_{DET^*}; \beta; \gamma; \delta) = (1; 1; 5,01E+05; 707,95; 0,88)$. La concentration des *MFP* est en (μM), celles de *DET^** et de *C3^** sont normalisées. La zone grise représente la fenêtre temporelle d'exposition au stress thermique (43°C , $3h$). Le temps de mort T_{mort} désigne le moment où la fraction de *C3^** atteint sa valeur de l'état de mort.

Le temps de mort varie en fonction de l'intensité et de la durée du stress. Le résultat des simulations où le système est exposé à des stress d'intensités allant de 41 à 45°C et des durées allant de 0 à $5h$ est présenté sur la figure (5.3). Le temps de mort décroît quand la température augmente et varie entre $0,5$ et $1,7h$ (par exemple, le code couleur de cette figure indique qu'une exposition de $1h$ à 45°C donne un temps de mort de $0,5h$). Pour une température fixée, le temps de mort ne varie plus au-delà d'une certaine durée d'exposition (par exemple, au-delà de 30min à 43°C), ceci s'explique par le fait que l'état de mort est atteint avant la fin du stress et du retour aux conditions normales. Toutefois, il est à noter que le temps de mort et sa variation en fonction de la durée et de l'intensité du stress thermique dépendent du jeu de paramètres utilisé, et en absence de données expérimentales concernant le choc thermique, le choix d'un jeu de paramètres de manière à calibrer le modèle n'est pas évident. Cette simulation est donc purement illustrative.

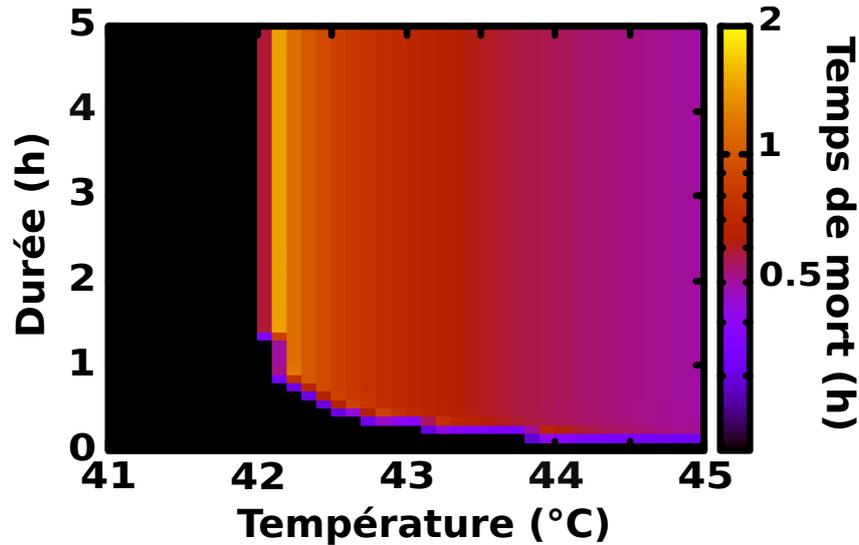


FIGURE 5.3 – Temps de mort en fonction de l'intensité et de la durée du stress thermique. Les paramètres du modèle *RRCT* sont inchangés. Pour le modèle de l'apoptose, les paramètres ont été fixés à $(\alpha ; \delta_{DET^*} ; \beta ; \gamma ; \delta) = (1 ; 1 ; 5,01E+05 ; 707,95 ; 0,88)$. Le code couleur en échelle logarithmique représente le temps de mort. La zone noire représente les combinaisons durée-intensité pour lesquelles la cellule survit.

5.3 Distribution des HSP dans une colonie de cellules *HeLa*

La concentration des protéines chaperons *HSP72* est expérimentalement mesurée dans une colonie de cellules *HeLa* sous les conditions normales à 37°C. Une distribution normale logarithmique [192, 193] avec un coefficient de variation $CV = 0,32$ est constatée (Fig. 5.4A). De plus, des expériences d'imagerie de fluorescence par *GFP* ont permis de mesurer l'activité transcriptionnelle de *HSF1* en réponse à des stress thermiques de différentes températures [94]. Cette activité varie significativement d'une cellule à une autre, et ce, en réponse au même stress (Fig. 5.4B). Ce constat peut être expliqué par le fait qu'en raison de la variabilité de la concentration des chaperons *HSP* d'une cellule à une autre au moment de l'exposition au choc thermique, les dommages induits par le stress peuvent être maîtrisés avec différents niveaux de régulation transcriptionnelle des *HSP* par *HSF1*, dans la mesure où les cellules ayant le plus de chaperons au départ, ont moins besoin de cette régulation pour en produire. Dans la suite de cette étude, l'intérêt n'est pas orienté vers les causes de cette hétérogénéité au niveau de la concentration des chaperons mais uniquement vers les conséquences de celle-ci vis-à-vis de la réponse au stress thermique en termes de destin cellulaire.

Notre hypothèse de travail est que cette différence de concentration des protéines chaperons au moment de l'exposition au stress thermique entraîne une différence de réponse (destin cellulaire) à l'issue de l'expérience : les cellules ayant le plus de protéines chaperons ont plus de chances de survivre, expliquant ceci par le fait qu'avoir des protéines réparatrices déjà prêtes au moment de l'induction des dommages permet à la cellule de "réagir" rapidement et de s'affranchir du temps de réponse lié à la production de ces protéines et donc d'éviter l'accumulation et l'agrégation toxique des protéines dénaturées. De plus, plusieurs travaux ont montré l'implication des *HSP* dans l'inhibition de la voie apoptotique [194–197].

Suivant cette logique, il y aurait donc sur la distribution (normale logarithmique) des concentrations des *HSP* dans une colonie cellulaire, et en fonction de chaque combinaison durée-intensité du choc thermique, une concentration "départageante" : les cellules avec une concen-

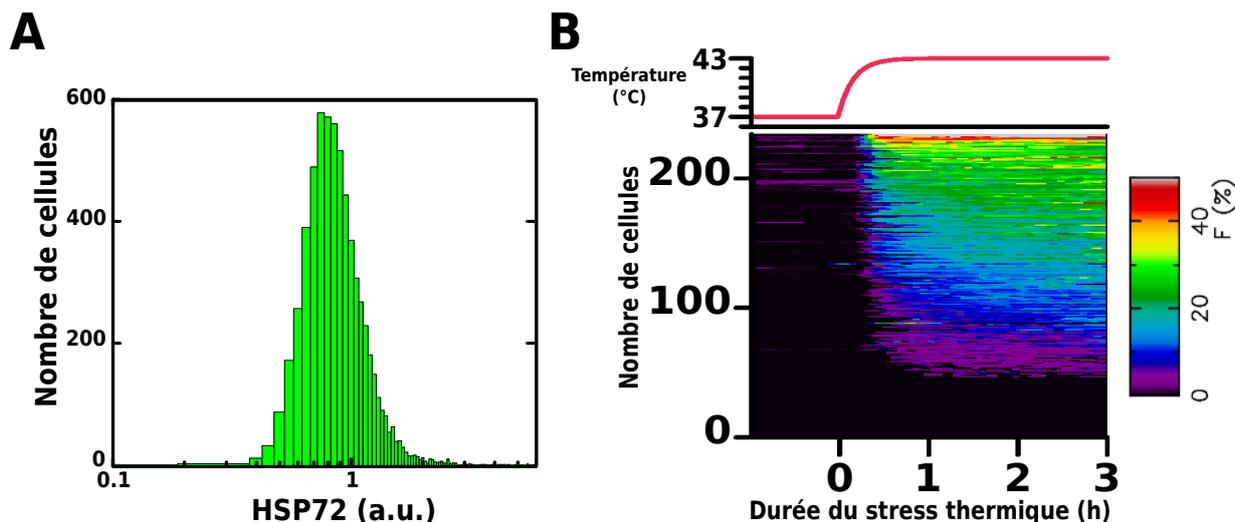


FIGURE 5.4 – Variabilité des niveaux de *HSP72* dans une colonie cellulaire *HeLa* à 37°C. A- La distribution suit une loi normale logarithmique. Le coefficient de variation est de 0,32. B- Variabilité et dynamique de l'activité transcriptionnelle de *HSF1* (par mesure de fluorescence, voir code couleur) pour un stress thermique à 43°C, chaque ligne sur l'axe des ordonnées représente une cellule (figure provenant de [94]).

tration inférieure à celle-ci meurent, et les cellules avec une concentration des *HSP* qui lui est supérieure survivent (Fig. 5.5). Il est par ailleurs logique de penser que plus la sévérité du stress augmente, plus cette concentration "départageante" augmente (car la quantité de chaperons nécessaires à la maîtrise des dommages induits augmente), et plus la fraction de survie cellulaire diminue.

5.4 Distribution normale logarithmique des *HSP* et calcul de la fraction de survie

Considérons les deux variables X et $Y = \log_{10}(X)$. Si Y est distribuée selon une loi normale avec une moyenne μ_{log} et un écart-type σ_{log} , il s'en suit que la densité de probabilité de X est donnée par :

$$P(X) = \frac{\log_{10}(e)}{X \sigma_{log} \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(\log_{10}(X) - \mu_{log})^2}{2\sigma_{log}^2} \right] \quad (5.1)$$

et les paramètres de la distribution de $X(\mu, \sigma)$ peuvent être exprimés en fonction de $(\mu_{log}, \sigma_{log})$ comme suit [192] :

$$\mu = \exp \left[\mu_{log} \log_e 10 + \frac{\sigma_{log}^2}{2} (\log_e 10)^2 \right] \quad (5.2)$$

$$\begin{aligned} \sigma &= \sqrt{\exp \left[2 \mu_{log} \log_e 10 + \sigma_{log}^2 (\log_e 10)^2 \right] \left(\exp \left[\sigma_{log}^2 (\log_e 10)^2 \right] - 1 \right)} \\ &= \mu \sqrt{\left(\exp \left[\sigma_{log}^2 (\log_e 10)^2 \right] - 1 \right)} \end{aligned} \quad (5.3)$$

Une notion très utile dans la biostatistique est le coefficient de variation CV , représentant une mesure relative de la dispersion, et défini comme étant le résultat de division de l'écart-type σ par la moyenne μ d'une distribution. Dans le cas d'une distribution normale logarithmique de

base 10, ayant un écart-type σ_{log} et une moyenne μ_{log} , l'expression du CV donne [192, 193] :

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} = \sqrt{\exp[\sigma_{log}^2 (\log_e 10)^2] - 1} \quad (5.4)$$

Si la distribution des HSP dans une colonie suit une loi normale logarithmique de base 10, et dans laquelle leur concentration est normalisée par rapport à une concentration de référence HSP_{REF} (pour la commodité du calcul), l'équation suivante définit la densité de probabilité correspondante à chaque concentration des chaperons :

$$P(HSP) = \frac{\log_{10}(e)}{10^R \sigma_{log} \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(R - \mu_{log})^2}{2\sigma_{log}^2} \right] \quad (5.5)$$

avec :

$$R = \log_{10} \left(\frac{[HSP]}{[HSP]_{REF}} \right) \quad (5.6)$$

Pour rappel, notre hypothèse de travail stipule que la variabilité de la concentration des HSP peut induire de la mort fractionnelle : en réponse à un stress thermique de durée et intensité données, une fraction des cellules meurt et une autre survit (Fig. 5.5), en considérant qu'il existe une concentration "dépasse" des HSP (dépendante de la sévérité du stress) qui est la limite entre les cellules survivantes et celles mortes, notée R_{DS} . En utilisant la fonction de répartition de la loi normale logarithmique, il est possible de calculer la fraction cellulaire morte DF (pour *Dead Fraction*) :

$$DF = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{R_{DS} - \mu_{log}}{\sigma_{log} \sqrt{2}} \right) \quad (5.7)$$

où erf est la fonction d'erreur. La fraction cellulaire survivante SF est donc :

$$SF = 1 - DF = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{R_{DS} - \mu_{log}}{\sigma_{log} \sqrt{2}} \right) \quad (5.8)$$

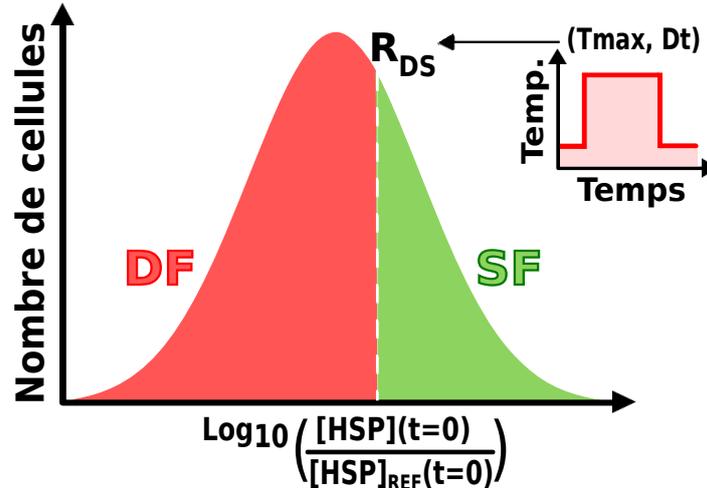


FIGURE 5.5 – **Distribution log-normale des HSP introduite dans les simulations et hypothèse de la concentration départageante.** La concentration départageante limitant les fractions cellulaires mortes et survivantes à l'issue du stress thermique (R_{DS}) dépend des paramètres durée-intensité du protocole, supposé comme ayant un profil temporel rectangulaire (impulsion).

Les simulations sont réalisées sur le principe suivant : en introduisant une variabilité sur la concentration initiale des *HSP*, et à chaque stress de durée et d'intensité données, la concentration départageante R_{DS} correspondante est déterminée. Par la suite, le meilleur ajustement des mesures de survie cellulaire de [1] doit être effectué en optimisant l'écart-type et la moyenne de la distribution logarithmique (Eq. 5.8). Enfin, le coefficient de variation résultant est calculé pour voir si la distribution résultante est biologiquement acceptable ($CV \approx 0,3$).

5.5 Calibration du modèle pour la reproduction des données de mort fractionnelle

A présent, le but est de calibrer le modèle global (couplant le modèle *RRCT* et le modèle de l'apoptose intrinsèque) pour reproduire les données de mort fractionnelle suite à l'exposition au choc thermique de [1]. Pour commencer, nous considérons uniquement le modèle *RRCT* auquel est ajoutée l'équation différentielle de DET^* (première équation du système 4.1), dans laquelle les dommages sont remplacés par la concentration des protéines dénaturées *MFP* (Eq. 5.9). Le seuil définissant le critère de mort est fixé à $DET^* = 0,5$ (qui est le point de bifurcation du modèle de l'apoptose). Le signal d'entrée du système résultant est le stress thermique (durée-intensité) et la réponse est la survie ou la mort dépendamment du seuil $DET^* = 0,5$.

$$\frac{d}{dt}[DET^*] = \delta_{DET^*}(\alpha (DET_{tot} - [DET^*])[MFP] - [DET^*]) \quad (5.9)$$

Par ailleurs, une distribution normale logarithmique en base 10 de la concentration initiale des protéines chaperons *HSP* est considérée (normalisée par rapport à une valeur de référence HSP_{REF} qui est la concentration des chaperons au point fixe à 37°C du modèle *RRCT*), et caractérisée par une moyenne et un écart type $(\mu_{log}, \sigma_{log})$ permettant de calculer le coefficient de variation CV . Les seuls autres paramètres à ajuster sont le taux d'activation de DET par les protéines dénaturées *MFP* (α) et le taux de dégradation de DET^* (δ_{DET^*}) (les paramètres du modèle *RRCT* restent inchangés). Ainsi, dans les simulations, pour chaque combinaison durée-intensité du stress thermique utilisée dans [1], et pour chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) obtenue par un balayage logarithmique des valeurs, l'algorithme trouve, via la méthode de dichotomie, la concentration des *HSP* départageant les cellules mortes et les survivantes notée R_{DS} (Fig. 5.5), et les combinaisons optimales $(\mu_{log}, \sigma_{log})$ définissant la distribution initiale des *HSP* reproduisant au mieux les mesures expérimentales de survie cellulaire au moyen d'une fonction *RMSE*. Enfin, une dernière optimisation locale utilisant *MINPACK* [198] est réalisée sur les paramètres μ_{log} et σ_{log} . La fraction de survie est calculée à l'aide de l'équation (5.8).

La figure (5.6) présente le score d'ajustement obtenu par la fonction *RMSE* en fonction des valeurs de α et δ_{DET^*} , et l'existence de deux vallées optimales en fonction des combinaisons est constatée. Cependant, pour les valeurs élevées de α ($\alpha \approx 80$), une discontinuité du score (variation brusque) apparaît. Ceci est dû au fait que le protocole utilisé dans [1] implique une période de récupération à 37°C , après l'exposition au stress, de $336h$ (deux semaines), et c'est seulement à ce moment là que la fraction de survie est mesurée. Ce protocole a été reproduit dans les simulations, et cette durée de récupération assez longue fait que la concentration des *HSP* dans le modèle revient à sa valeur du point fixe à 37°C peu importe sa valeur dans les conditions initiales (pour rappel, les paramètres du modèle *RRCT*, notamment les taux de synthèse et de dégradation des chaperons, sont inchangés dans les simulations). Ce retour au point fixe à 37°C implique donc la suppression de la variabilité au niveau de la concentration des chaperons introduite dans les conditions initiales, et la concentration devient ainsi la même dans toute la colonie. Conséquemment, il en est de même pour la concentration des protéines dénaturées *MFP*, et pour les valeurs élevées du paramètre α , cette concentration de *MFP* (du point fixe à 37°C) est suffisante pour tuer toutes les cellules éliminant ainsi le phénomène de mort fractionnelle

et causant une discontinuité du score. *A contrario*, pour les valeurs de α moins élevées, la concentration des *MFP* à 37°C n'est pas suffisante pour faire atteindre DET^* le seuil de 0,5 qui est le critère de mort, et tout se joue donc sur la quantité de protéines dénaturées par le stress thermique. Pour illustrer ceci, la figure (5.7) présente les fractions de survie cellulaire à 37°C, correspondant à chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) , et résultant de la distribution optimale des chaperons reproduisant les données de [1] pour chacune de ces combinaisons.

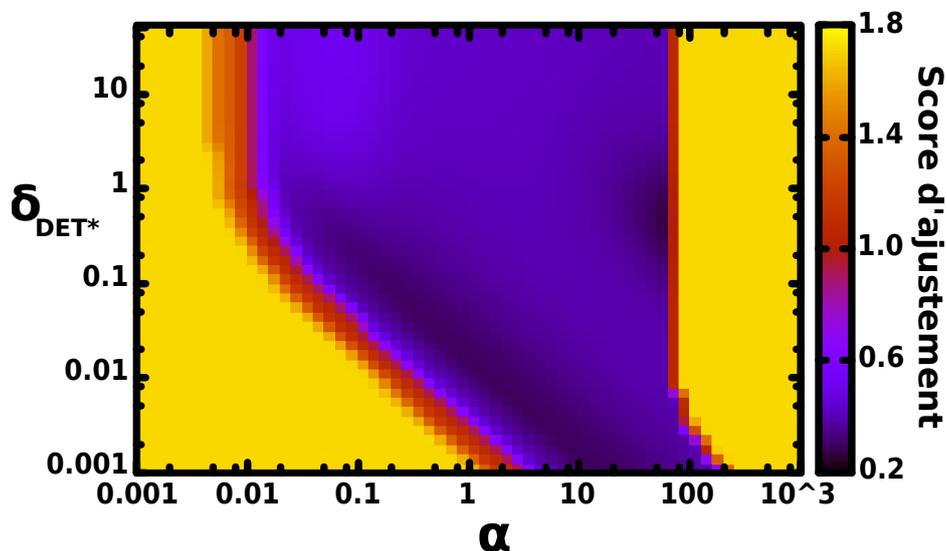


FIGURE 5.6 – Score d'ajustement des données expérimentales en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) . Le score est calculé par une fonction d'erreur quadratique moyenne *RMSE* : plus le score est élevé, moins bonne est la reproduction des données expérimentales. L'existence de deux vallées d'optimalité est constatée. Le score maximal (couleur jaune) est plafonné et correspond à une situation où toutes les cellules survivent ou meurent (pas de mort fractionnelle).

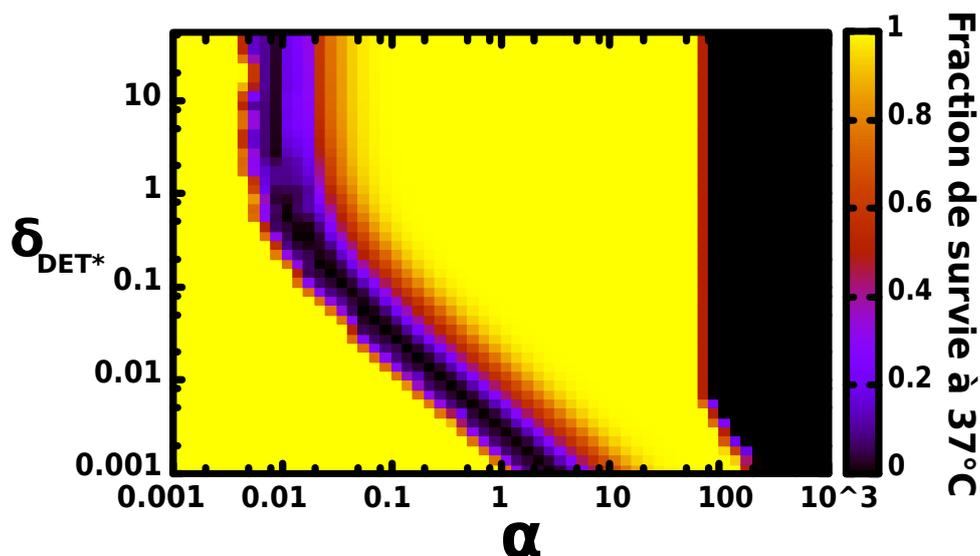


FIGURE 5.7 – Fraction de survie cellulaire à 37°C en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) . La fraction de survie résulte des distributions optimales des chaperons pour l'ajustement des données et correspondant à chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) . Cette fraction est nulle dans la zone de discontinuité du score de la figure (5.6) où le paramètre α prend des valeurs élevées.

Comme il a été précédemment mentionné, il existe clairement deux vallées d'optimalité sur la figure (5.6). Et pour rappel, l'algorithme trouve la distribution normale logarithmique optimale de la concentration initiale des chaperons correspondante à chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) . Il s'en suit qu'à chaque combinaison de ces deux paramètres, correspond une combinaison $(\mu_{log}, \sigma_{log})$, convertible en (μ, σ) (Eq. 5.2 et 5.3), donnant le score d'ajustement présenté dans la figure (5.6). Les figures (5.8) et (5.9) illustrent respectivement la moyenne μ et le CV optimaux en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) . La moyenne μ de la distribution initiale des chaperons augmente quand le paramètre α augmente, car en augmentant α , le seuil $DET^* = 0,5$ est atteint pour une concentration de MFP moins importante que dans le cas où α est petit, et le système a donc besoin de plus de chaperons pour réparer les protéines dénaturées. Le CV augmente quand α (et conséquemment μ) diminue, les hautes valeurs de α présentent donc une distribution plus étroite que les basses valeurs.

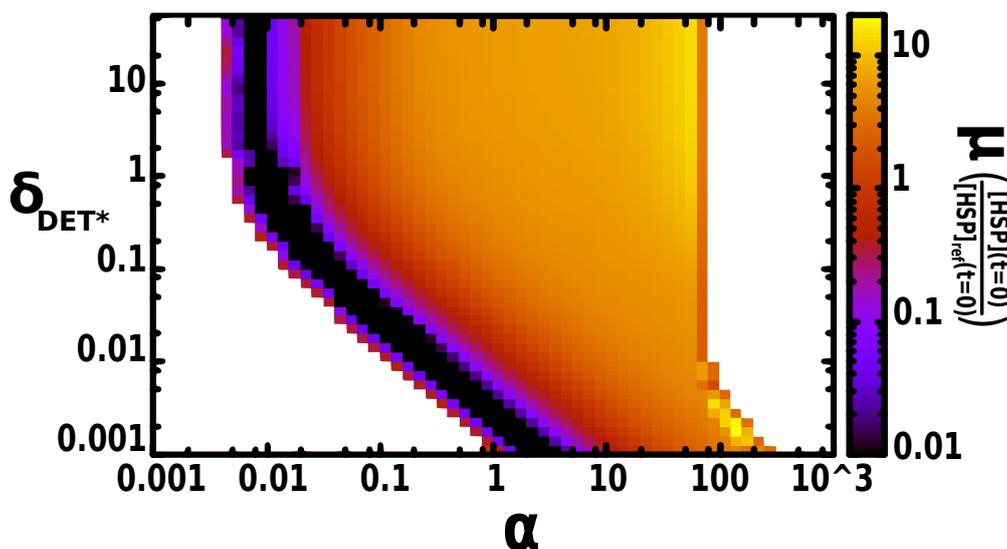


FIGURE 5.8 – Moyenne optimale de la distribution initiale des HSP en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) . Pour chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) , une optimisation par balayage puis par $MINPACK$ fixe les valeurs de la moyenne et de l'écart-type de la distribution initiale des HSP . Les zones blanches désignent une absence de mort fractionnelle (toutes les cellules meurent ou survivent).

Dans chacune des deux vallées d'optimalité, une combinaison (α, δ_{DET^*}) doit être choisie afin de déterminer les courbes de la fraction de survie correspondantes en fonction des paramètres du stress. Pour le cas de la vallée aux hautes valeurs de α , les valeurs du CV restent raisonnables (inférieures à 1), et la combinaison choisie est donc celle présentant le meilleur score $(\alpha; \delta_{DET^*})=(63,09; 0,5)$, ayant un CV de 0,69. Le choix est un peu plus compliqué dans la vallée d'optimalité aux basses valeurs de α en raison du CV élevé, et il faut conséquemment trouver une combinaison satisfaisant un compromis entre score d'ajustement et coefficient de variation. La combinaison $(\alpha; \delta_{DET^*})=(0,25; 0,25)$ présentant un CV de 1,81 est finalement choisie. La figure (5.10) présente les courbes de survie résultant de ces deux jeux de paramètres. L'ajustement est suffisamment bon pour les deux combinaisons, mais il est meilleur pour la combinaison $(\alpha, \delta_{DET^*})=(63,09; 0,5)$.

Les deux distributions initiales des protéines chaperons correspondantes aux deux combinaisons (α, δ_{DET^*}) précédentes et engendrant les courbes de survie cellulaire de la figure (5.10) sont exposées côte à côte sur la figure (5.11). Quand α augmente, d'une part la moyenne de la distribution augmente également pour "gérer" les protéines dénaturées car une concentration basse de

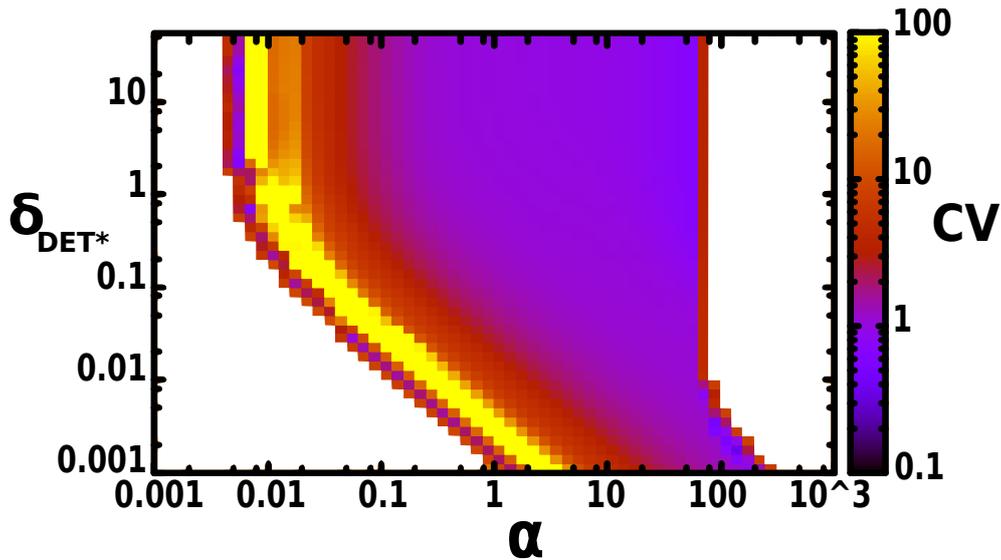


FIGURE 5.9 – CV de la distribution initiale optimale des *HSP* en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) . Pour chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) , le CV est calculé à partir de la moyenne et de l'écart-type de la distribution initiale optimale des *HSP*. Les zones blanches désignent une absence de mort fractionnelle (toutes les cellules meurent ou survivent).

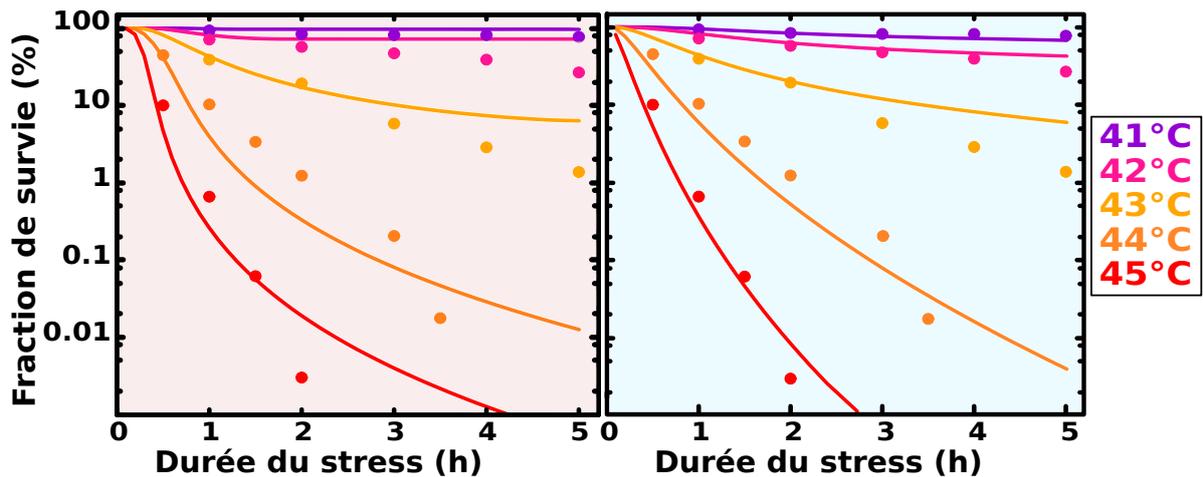


FIGURE 5.10 – Ajustement des données de [1] avec les combinaisons optimales (α, δ_{DET^*}) . Les points représentent les mesures expérimentales et les courbes les résultats de simulation, le code couleur représente les températures maximales du stress thermique appliqué. A gauche : $(\alpha; \delta_{DET^*})=(0,25; 0,25)$. A droite : $(\alpha; \delta_{DET^*})=(63,09; 0,5)$.

ces dernières peut être suffisante pour déclencher la mort, et d'autre part la distribution devient plus étroite. Rappelons que ces distributions sont normalisées par rapport à une concentration de référence fixée comme étant la concentration des chaperons au point fixe à 37°C du modèle *RRCT*.

Le but est d'explorer l'hypothèse de la potentielle implication de la variabilité au niveau de la concentration des protéines chaperons entre les cellules d'une même colonie dans le phénomène de la mort fractionnelle à l'issue d'une exposition au stress thermique. Comme constat préliminaire, bien que les distributions optimales pour la reproduction des données expérimentales soient trop larges pour être biologiquement pertinentes (une cause potentielle est l'absence de toute autre source de variabilité pouvant accentuer la différence de réponse), les simulations

montrent qu'uniquement une variabilité sur la concentration initiale des chaperons couplée à un mécanisme de seuil déclenchant la voie apoptotique peut générer une différence significative dans la réponse cellulaire au stress thermique provoquant ainsi de la mort fractionnelle.

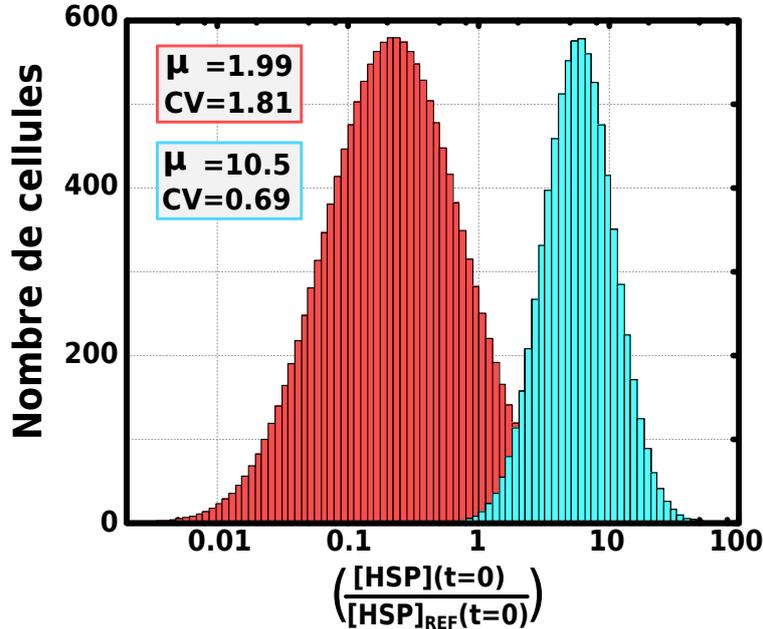


FIGURE 5.11 – Distributions de la concentration initiale des *HSP* issues des simulations d'optimisation. La distribution en rouge correspond au jeu $(\alpha ; \delta_{DET^*})=(0,25 ; 0,25)$, celle en cyan au jeu $(\alpha ; \delta_{DET^*})=(63,09 ; 0,5)$. Le lien est à faire avec la figure (5.10).

5.6 Couplage complet des deux modèles (*RRCT* et apoptose)

Toutes les équations différentielles du modèle de l'apoptose restantes et représentant l'évolution des concentrations de *XIAP*, *pC9/C9**, *pC3/C3**, $X : C3^*$ et $X : C9^*$ (système d'équations 4.1) sont maintenant ajoutées au système (*RRCT+DET**). Les combinaisons (β, γ, δ) du modèle de l'apoptose intrinsèque qui donnent une réponse bistable irréversible avec un basculement de l'état de survie à l'état de mort à la valeur seuil de $DET^* = 0,5$ ont été déterminées dans le chapitre précédent, et le système (*RRCT+DET**) est calibré à travers les paramètres (α, δ_{DET^*}) pour reproduire les données de [1], où deux combinaisons (α, δ_{DET^*}) optimales sont obtenues et correspondent à deux vallées d'optimalité sur la figure (5.6).

En couplant le modèle *RRCT* au modèle de l'apoptose au complet, et en gardant les deux combinaisons (α, δ_{DET^*}) précédemment trouvées, un balayage des combinaisons (β, γ, δ) permettant une bistabilité irréversible avec bifurcation à $DET^* = 0,5$ est réalisé. Pour chaque combinaison $(\alpha, \delta_{DET^*}, \beta, \gamma, \delta)$ résultante, une optimisation par *MINPACK* des paramètres de la distribution initiale des chaperons $(\mu_{log}, \sigma_{log})$ est effectuée pour reproduire les mêmes données de mort fractionnelle en changeant uniquement le critère de mort, qui est cette fois défini par une fraction élevée de *C3** correspondant à l'état de mort en fonction des combinaisons (β, γ) (Fig. 4.6). Le score obtenu pour chacune des deux combinaisons (α, δ_{DET^*}) en fonction des combinaisons (β, γ, δ) est illustré sur la figure (5.12).

Sur cette figure, pour les deux combinaisons $(\alpha ; \delta_{DET^*})=(0,25 ; 0,25)$ et $(\alpha ; \delta_{DET^*})=(63,09 ; 0,5)$, le score varie peu en fonction de β et γ et l'ajustement reste bon (comparer les scores des

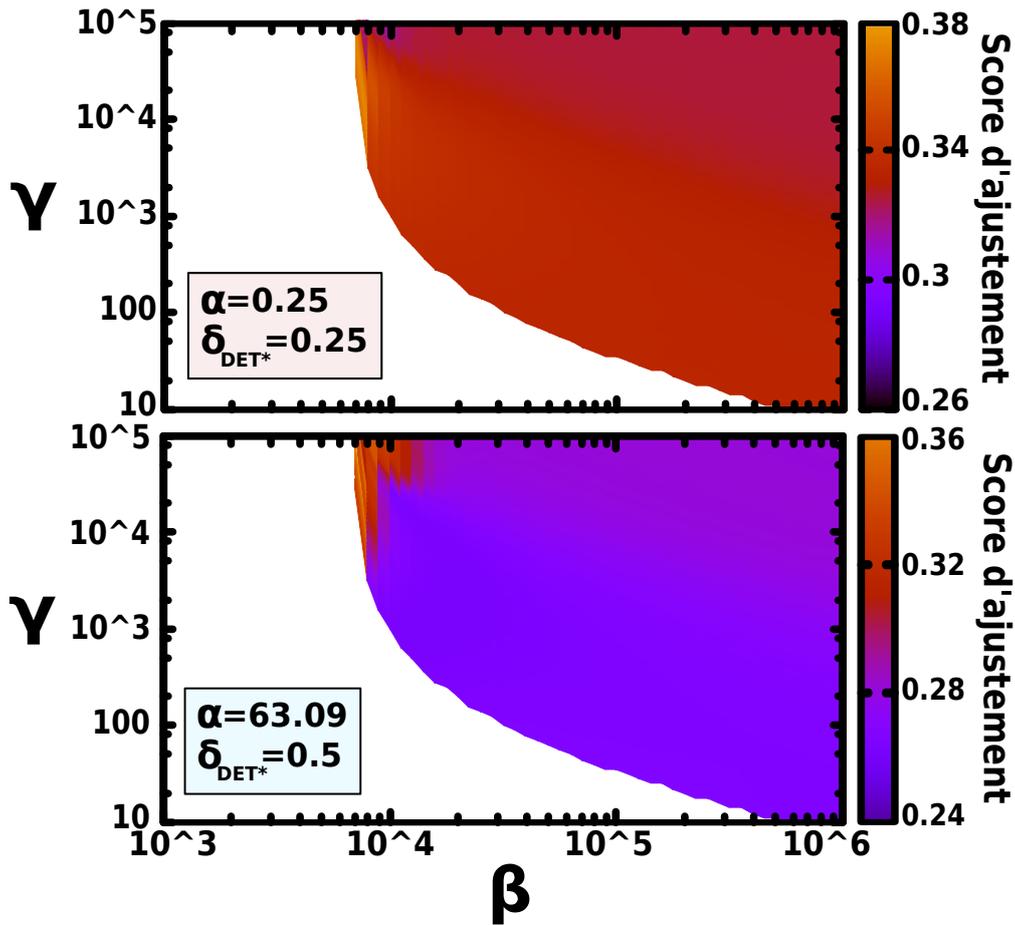


FIGURE 5.12 – Score d’ajustement des données de [1] en fonction des paramètres (β, γ) du modèle de l’apoptose. Le score est calculé par une fonction d’erreur quadratique moyenne $RMSE$ et est illustré par le code couleur. Les deux figures correspondent aux deux combinaisons (α, δ_{DET^*}) des deux vallées d’optimalité.

Fig. 5.12 et 5.6). Les figures (5.13) et (5.14) présentent respectivement, en fonction de (β, γ) , l’évolution de la moyenne μ et du CV optimaux pour les deux combinaisons (α, δ_{DET^*}) optimales. Enfin, une combinaison (β, γ) est choisie pour chacune des deux combinaisons (α, δ_{DET^*}) et pour laquelle le score, la moyenne μ et le CV sont similaires à ceux trouvés dans la partie où le modèle $RRCT$ a été couplé à l’équation différentielle de DET^* uniquement, afin de voir l’ajustement obtenu avec le modèle global couplant le modèle $RRCT$ au modèle de l’apoptose et le comparer au premier illustré sur la figure (5.10).

Ainsi, pour $(\alpha; \delta_{DET^*})=(0, 25; 0, 25)$, le jeu de paramètres choisi est $(\beta; \gamma)=(22387, 21; 2511, 89)$, et parallèlement, pour $(\alpha; \delta_{DET^*})=(63, 09; 0, 5)$, le jeu $(\beta, \gamma)=(17782, 8; 1258, 92)$. Il est à noter que pour les combinaisons précédentes, quand α (taux d’activation de DET par les MFP) diminue, β (taux d’activation des $C3^*$ par les $C9^*$) et γ (taux d’activation des $C9^*$ par les $C3^*$) augmentent pour reproduire les mêmes données de fraction de survie. Les courbes de fraction de survie résultantes de ces deux jeux de paramètres sont exposées dans la figure (5.15), et en comparaison à la figure (5.10), les courbes obtenues sont très similaires. L’accord des résultats de reproduction des données entre la première partie où le $RRCT$ a seulement été couplé à l’équation différentielle de DET^* et la deuxième où il a été couplé au modèle apoptotique complet confirme que le mécanisme de seuil sur DET^* détermine le destin cellulaire dans le modèle de la voie apoptotique intrinsèque.

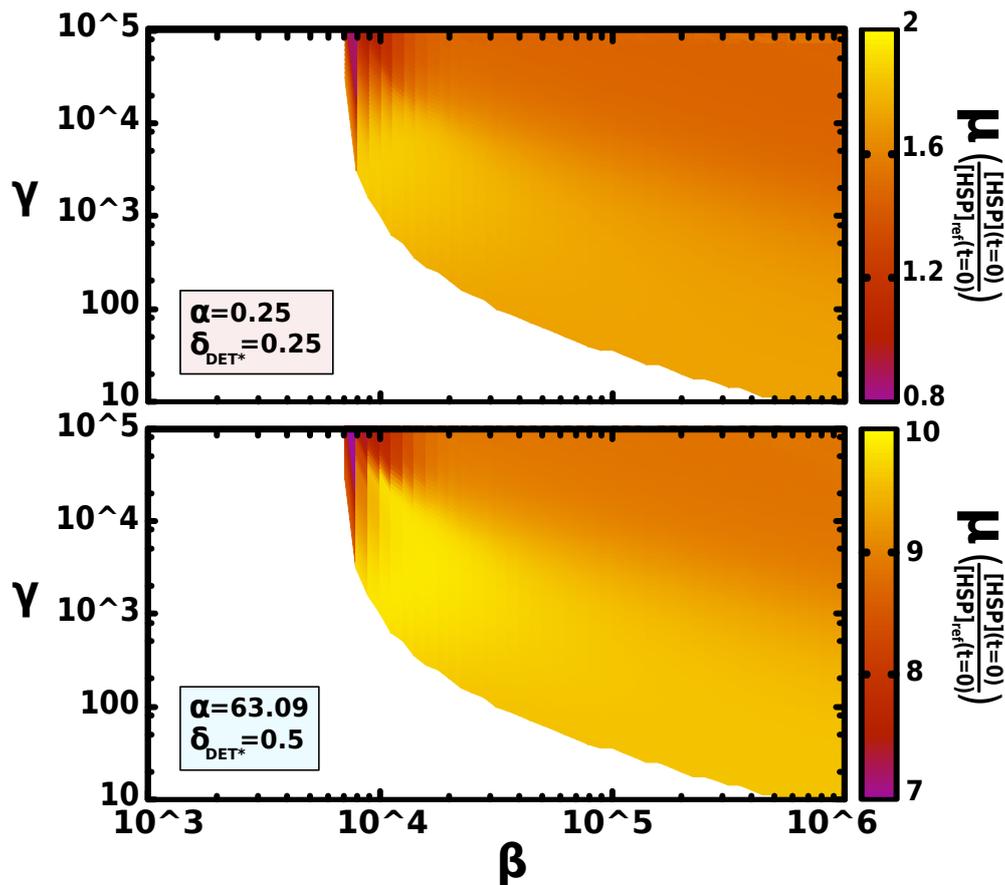


FIGURE 5.13 – Variation de la moyenne μ de la distribution initiale des *HSP* optimale en fonction des paramètres (β, γ) du modèle de l'apoptose. La moyenne μ est optimisée par *MINPACK* pour chaque combinaison (β, γ) . Les deux figures correspondent aux deux combinaisons (α, δ_{DET^*}) des deux vallées d'optimalité.

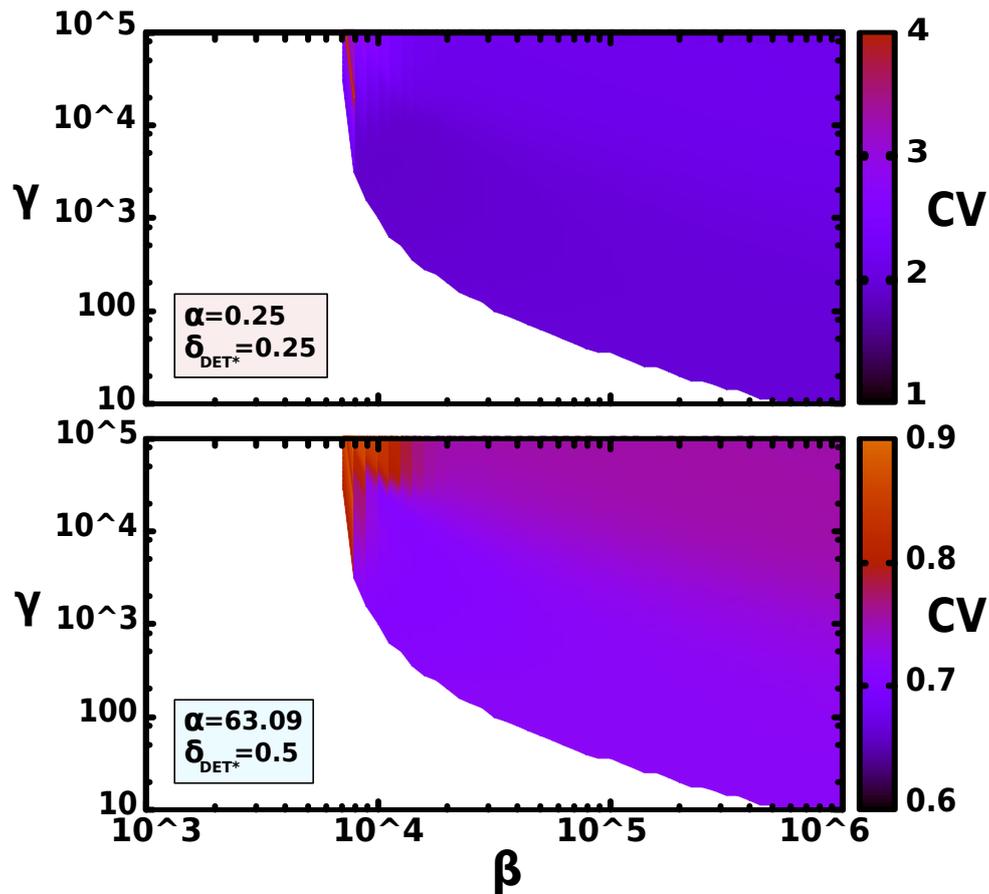


FIGURE 5.14 – Variation du CV de la distribution initiale des HSP optimale en fonction des paramètres (β, γ) du modèle de l'apoptose. Le CV illustré par le code couleur est calculé à partir de la moyenne μ et de l'écart-type σ optimaux fixés par $MINPACK$ pour chaque combinaison (β, γ) . Les deux figures correspondent aux deux combinaisons (α, δ_{DET^*}) des deux vallées d'optimalité.

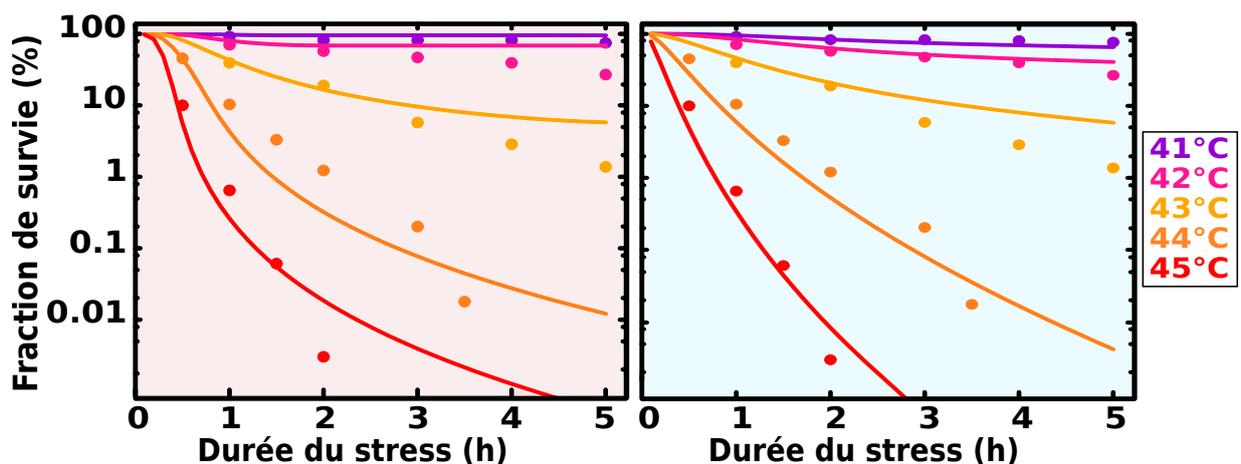


FIGURE 5.15 – Ajustement des données de [1] avec les combinaisons $(\alpha, \delta_{DET^*}, \beta, \gamma)$. Les points représentent les mesures expérimentales et les courbes les résultats de simulation, le code couleur représente les températures maximales du stress thermique appliqué. A gauche : $(\alpha; \delta_{DET^*}; \beta; \gamma) = (0,25; 0,25; 22387,21; 2511,89)$. A droite : $(\alpha; \delta_{DET^*}; \beta; \gamma) = (63,09; 0,5; 17782,8; 1258,92)$. A comparer avec la figure (5.10).

5.7 Variabilité de la concentration de *XIAP*

Une autre piste à explorer concerne la différence des niveaux de la protéine anti-apoptotique *XIAP* entre les cellules de la colonie. En effet, cette protéine inhibe les caspases initiateuses et effectrices, et il est intuitivement acceptable qu'une concentration élevée de *XIAP* favorise la survie cellulaire. De plus, une étude a rapporté que la variabilité des niveaux de cette protéine peut atteindre un *CV* de 0,6 dans les cellules cancéreuses du colon [93]. Nous partons ainsi de l'hypothèse que la variabilité entre les cellules en termes de concentration de *XIAP* peut expliquer le phénomène de mort fractionnelle suite à un stress thermique. Il est néanmoins à noter que cette hypothèse est simplificatrice, car même dans le cas où la concentration de *XIAP* est suffisante pour arrêter le processus de l'apoptose, et si les dommages sont assez importants, d'autres mécanismes de la mort cellulaire peuvent éventuellement prendre le relais [84].

Dû au fait que la dynamique de *XIAP* dans le modèle global est plus rapide que celle des protéines du réseau *RRCT*, notamment les *HSP*, une variation sur les conditions initiales ne peut pas être suffisante pour reproduire les données de mort fractionnelle, car le système revient rapidement vers son point fixe correspondant à la concentration de référence de *XIAP* du point fixe à 37°C. Une solution à ce problème est de faire varier le taux de synthèse de cette protéine de manière à introduire une distribution normale logarithmique sur sa concentration, distribution qui sera optimisée par la suite pour l'ajustement des données. De cette manière, la différence des niveaux de *XIAP* peut être conservée tout au long de la simulation. Mis à part ce changement, la même méthodologie que pour les *HSP* précédemment est utilisée, en commençant par une fixation des paramètres $(\beta; \gamma; \delta) = (5,01E+05; 707,95; 0,88)$. Ensuite, pour chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) fixée par balayage logarithmique des valeurs, l'algorithme trouve la distribution optimale de *XIAP* reproduisant au mieux les données de mort fractionnelle (en prenant comme critère de mort cellulaire une fraction élevée de la *C3**). La figure (5.16) présente le score d'ajustement pour les différentes combinaisons (α, δ_{DET^*}) . Une vallée optimale des combinaisons est clairement distinguable sur cette figure (plus le score est bas, meilleur est l'ajustement) et correspond à des valeurs basses du paramètre α .

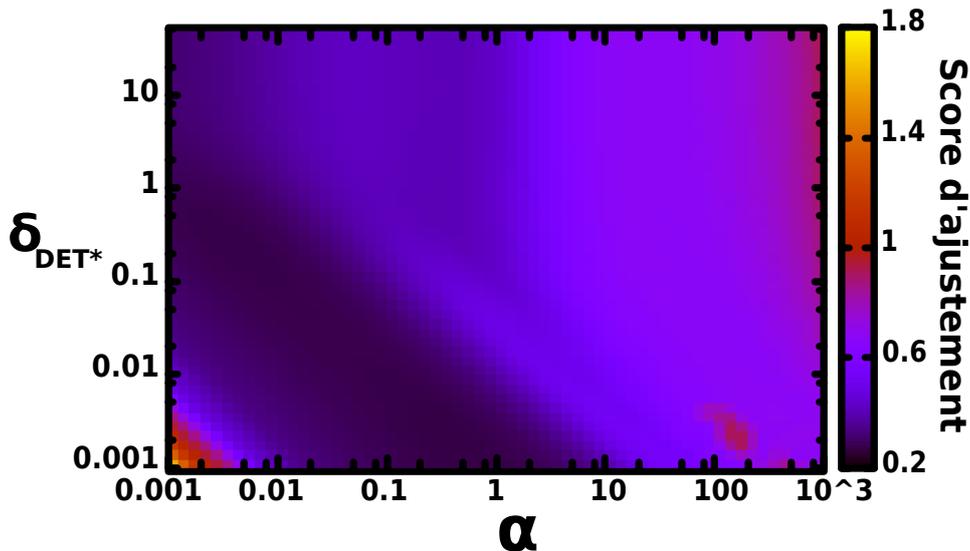


FIGURE 5.16 – Score d'ajustement des données de [1] en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) . Le score est calculé par une fonction d'erreur quadratique moyenne *RMSE* : plus le score est élevé, moins bonne est la reproduction des données expérimentales. L'existence d'une seule vallée d'optimalité est constatée. Les paramètres $(\beta; \gamma; \delta)$ sont fixés à $(5,01E+05; 707,95; 0,88)$ respectivement.

Comme pour le cas de la variabilité sur les niveaux des HSP , les fractions de survie en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) dans les conditions normales à 37°C sont également vérifiées, en prenant toujours comme critère de mort un niveau élevé de la $C3^*$, et avec $(\beta; \gamma; \delta) = (5, 01E + 05; 707, 95; 0, 88)$. La figure (5.17) présente le résultat de ces simulations, qui montrent que dans la vallée d'optimalité de la figure (5.16), la fraction de survie à 37°C est très proche de 100%. Il est donc possible, *a priori*, de choisir n'importe quelle combinaison dans cette vallée. Mais avant de faire cela, il est important de regarder également l'évolution de la moyenne μ et du CV des distributions optimales de $XIAP$ en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) (Fig. 5.18 et 5.19).

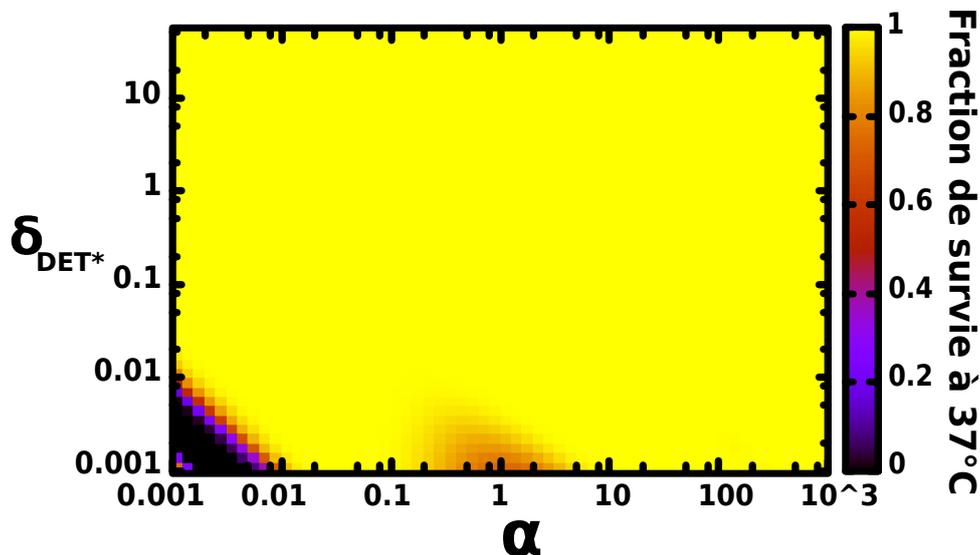


FIGURE 5.17 – Fraction de survie cellulaire à 37°C en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) . La fraction de survie résulte des distributions optimales de $XIAP$ pour l'ajustement des données et correspondant à chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) . Cette fraction est très proche voire égale à 100% dans la totalité de la vallée d'optimalité de la figure (5.16).

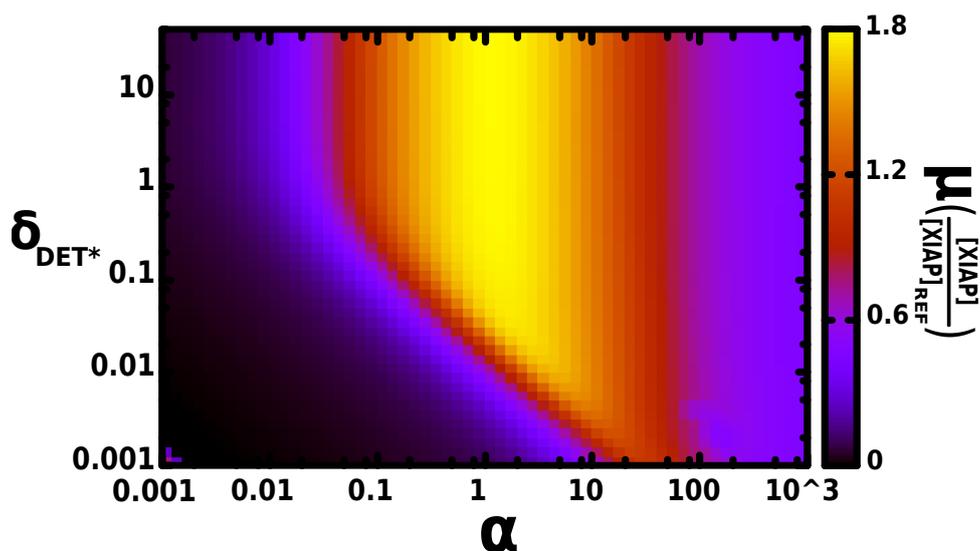


FIGURE 5.18 – Moyenne μ de la distribution optimale de $XIAP$ en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) . Pour chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) , une optimisation par balayage puis par $MINPACK$ fixe les valeurs de la moyenne et de l'écart-type de la distribution optimale de $XIAP$.

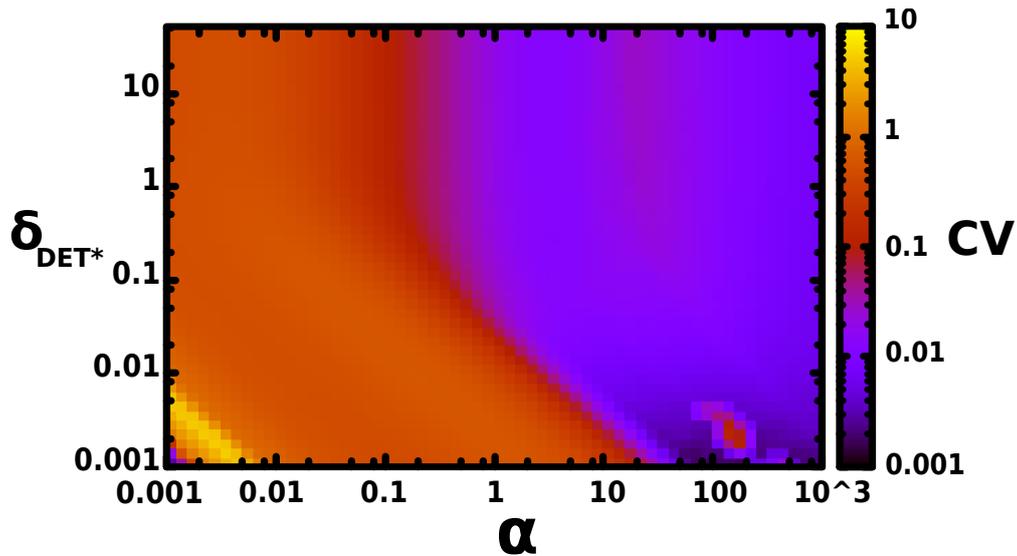


FIGURE 5.19 – CV de la distribution optimale de $XIAP$ en fonction des combinaisons (α, δ_{DET^*}) . Pour chaque combinaison (α, δ_{DET^*}) , le CV optimal est calculé à partir de la moyenne et de l'écart-type de la distribution optimale (pour l'ajustement des données) de $XIAP$. Le code couleur est en échelle logarithmique.

La figure (5.19) montre que le CV varie très peu ($\approx 0,5$) dans la vallée d'optimalité. La moyenne μ d'un autre côté varie significativement (dans l'intervalle approximatif $[5 \times 10^{-2} - 0, 2]$) dans cette vallée (Fig. 5.18). Pour définir les courbes de fraction de survie, la combinaison de paramètres (α, δ_{DET^*}) choisie dans la vallée d'optimalité doit donc satisfaire un compromis entre le score d'ajustement et la moyenne μ de la distribution de $XIAP$. Le choix est finalement porté sur la combinaison $(\alpha; \delta_{DET^*}) = (6, 31 \times 10^{-3}; 0, 31)$ présentant un CV de 0,57 et une moyenne μ de 0,1 (10% de la concentration de référence). La figure (5.20) montre les courbes de survie résultant de ce jeu de paramètres et de la distribution de $XIAP$ correspondante, qui est elle représentée sur la figure (5.21).

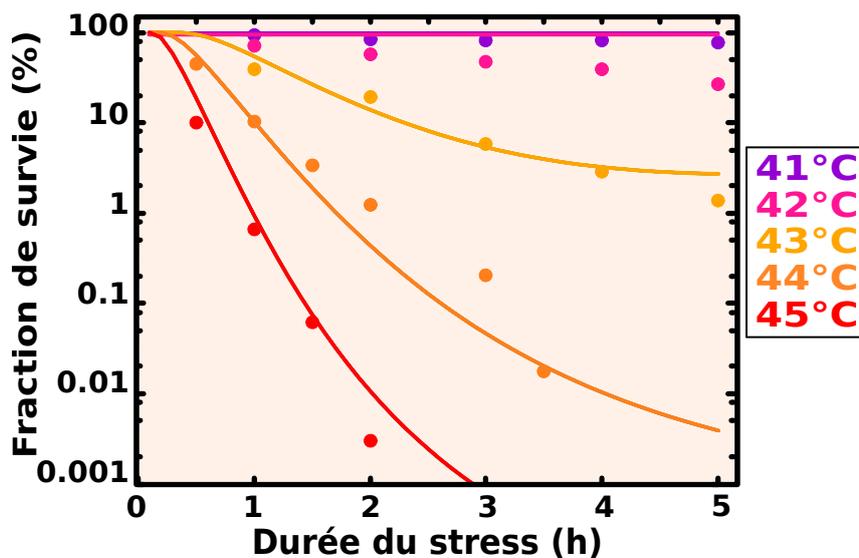


FIGURE 5.20 – Ajustement des données de [1] avec $(\alpha; \delta_{DET^*}) = (6, 31 \times 10^{-3}; 0, 31)$. Les points représentent les mesures expérimentales et les courbes les résultats de simulation, le code couleur représente les températures maximales du stress thermique appliqué.

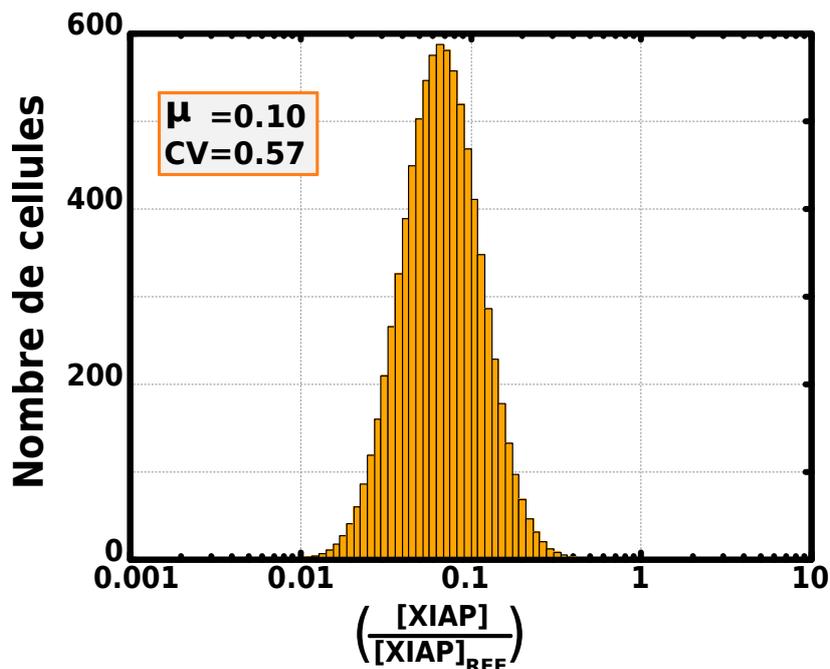


FIGURE 5.21 – **Distribution optimale de $XIAP$.** Cette distribution est optimale pour le jeu de paramètres $(\alpha; \delta_{DET^*}) = (6, 31 \times 10^{-3}; 0, 31)$.

Sur les courbes de survie cellulaire de la figure (5.20), il est constaté qu'une variabilité entre les cellules d'une colonie introduite au niveau de la concentration de la protéine $XIAP$ permet un bon ajustement des données en ce qui concerne les stress à températures maximales allant de 43 à 45°C, mais n'est en revanche pas suffisante pour reproduire les données impliquant les températures plus basses (41 et 42°C) et pour lesquelles il n'y a quasiment pas de mort cellulaire. Ceci est dû au fait que la concentration des protéines HSP ne varie pas entre les cellules dans ces simulations et suit l'évolution quantitative dictée par la dynamique "normale" du modèle $RRCT$ (Fig. 5.3, il n'y a pas de mort à 41 et 42°C, pour $\alpha = \delta_{DET^*} = 1$), mais également à cause de la valeur basse du paramètre α . La robustesse de ces résultats en fonction des paramètres du modèle de l'apoptose (β, γ, δ) est ensuite vérifiée. Pour ce faire, les paramètres $(\alpha; \delta_{DET^*})$ sont fixés à $(6, 31 \times 10^{-3}; 0, 31)$ et les combinaisons (β, γ, δ) permettant une bistabilité irréversible sont balayées. Les simulations montrent que le score d'ajustement, le CV , et la moyenne de distribution μ optimaux varient très légèrement en fonction des paramètres du modèle de l'apoptose et sont présentés dans la figure (5.22).

Pour résumer, selon le modèle global, une variabilité sur la concentration des HSP nécessite soit un CV soit une moyenne de distribution élevés pour pouvoir ajuster les données de mort fractionnelle suite au choc thermique. De son côté, la variabilité des niveaux de $XIAP$ permet d'ajuster les données des hautes températures (43 °C et plus) avec un CV très raisonnable, mais ne reproduit pas les données obtenues avec des températures plus basses. Notre hypothèse qui guidera la future continuation de cette étude est qu'une variabilité simultanée des concentrations de ces deux protéines permettra peut-être une compensation qui aboutira par un meilleur ajustement faisant intervenir des distributions plus acceptables biologiquement.

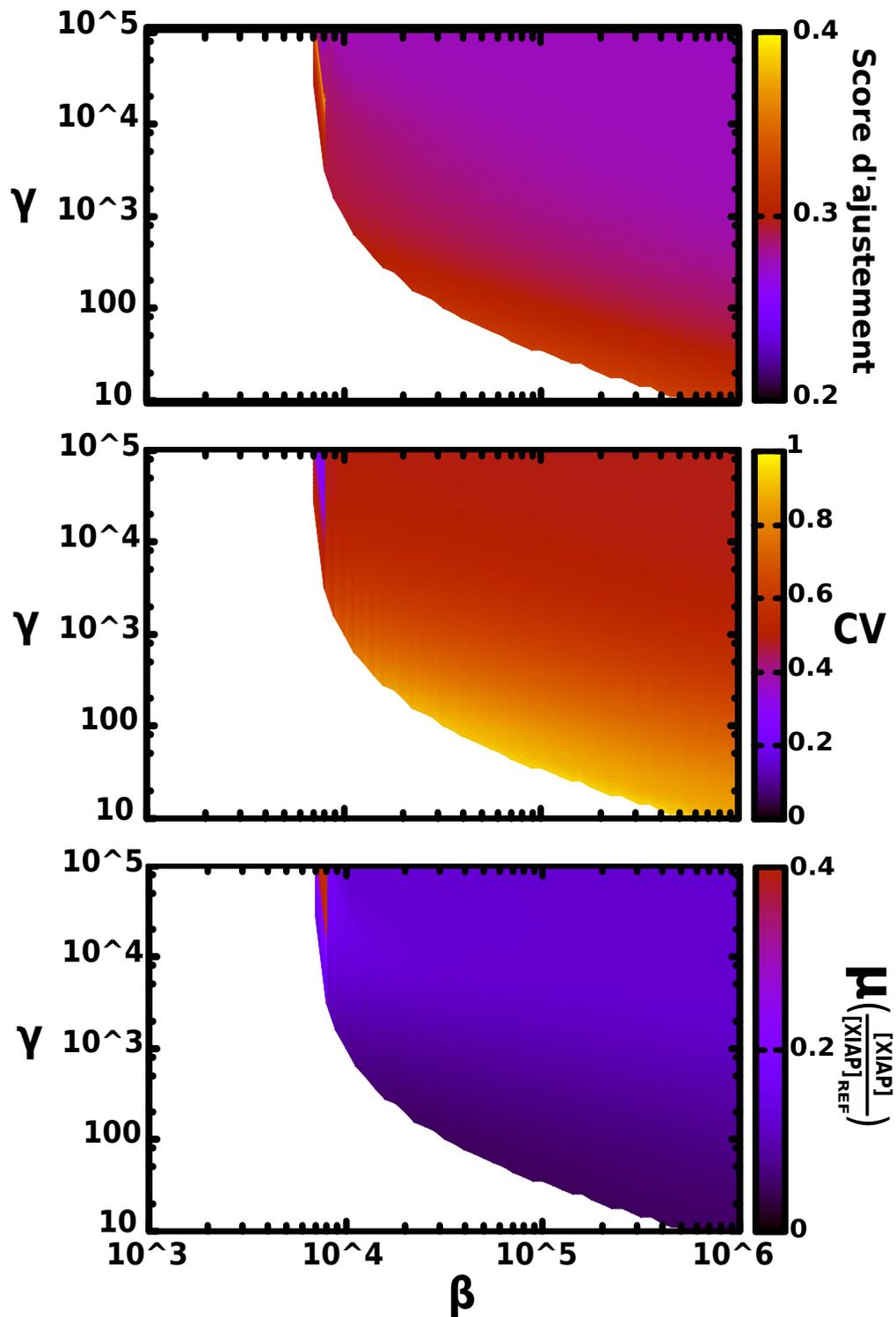


FIGURE 5.22 – Variation du score, du CV et de la moyenne de distribution μ optimaux en fonction des paramètres (β, γ) du modèle de l'apoptose. Pour ces simulations, les paramètres α et δ_{DET^*} sont fixés à $6,31 \times 10^{-3}$ et 0,31 respectivement.

5.8 Discussion

Dans cette partie, le modèle de l'apoptose cellulaire à réponse binaire précédemment développé a été couplé au modèle *RRCT* pour obtenir un modèle global décrivant la réponse au stress thermique d'une cellule unique. Le but était d'étudier l'éventuelle implication de la variabilité des niveaux de protéines entre cellules d'une même colonie dans la différence de destin cellulaire [100] (mort fractionnelle) en réponse au choc thermique. Ainsi, en procédant au couplage des deux modèles et en y injectant une variabilité des concentrations des protéines *HSP* puis *XIAP* suivant une loi normale logarithmique, la fonction de survie probabiliste (Eq. 5.8) utilisée dans le chapitre 2 a été remplacée dans la détermination de la fraction cellulaire survivante au stress thermique. Cependant, bien que les paramètres du modèle *RRCT* ont été estimés à partir de données expérimentales [122], les paramètres du modèle de l'apoptose ont eux été fixés sous une seule contrainte qui est la génération d'une bistabilité irréversible. Ceci fait que le modèle global couplant ces deux modèles est de nature qualitative.

Dans un premier temps, une variabilité entre les cellules a été introduite au niveau de la concentration initiale des protéines chaperons *HSP* [94]. Les paramètres de la distribution des *HSP* ont été ensuite optimisés en fonction des combinaisons de paramètres du réseau apoptotique pour reproduire au mieux les données de mort fractionnelle en réponse à un stress thermique de [1]. Qualitativement, les résultats montrent que la variabilité des protéines chaperons peut engendrer de la mort fractionnelle, et les courbes de survie cellulaire obtenues sont suffisamment fidèles aux données à ajuster. Cependant, d'un point de vue quantitatif, la reproduction de ces données requiert un *CV* ou une moyenne de distribution initiale des *HSP* élevés et peu raisonnables biologiquement. Ainsi, selon le modèle, la distribution des chaperons expérimentalement mesurée n'est pas suffisante pour expliquer les données de mort fractionnelle de [1]. L'une des potentielles explications de ce résultat est l'absence de toute autre source de variabilité dans le modèle pouvant accentuer la différence de réponse en compensant une distribution des chaperons moins large et avec une moyenne moins élevée.

Dans un second temps, la reproduction des mêmes données expérimentales a été tentée en injectant cette fois-ci une variabilité sur les niveaux de la protéine anti-apoptotique *XIAP* [93]. Ce faisant, les données de survie correspondant aux températures élevées (43°C et plus) ont pu être ajustées avec un *CV* de distribution très raisonnable biologiquement, mais pas les données résultant des températures les plus basses (<43°C). En considérant l'ensemble des résultats de l'étude, l'une des pistes à explorer à l'avenir est l'introduction d'une variabilité sur les niveaux des chaperons et de *XIAP* simultanément, ce qui pourrait potentiellement donner des distributions optimales plus cohérentes avec les mesures expérimentales. Par ailleurs, l'introduction d'une variabilité dynamique à travers la stochasticité des procédés de synthèse et de dégradation (bruit intrinsèque) engendrant des fluctuations des niveaux des protéines peut également s'avérer plus appropriée pour la problématique de la mort fractionnelle [167].

Chapitre 6

Modélisation générique de la réponse cellulaire aux stress transitoires

6.1 Introduction

Les stress auxquels la cellule doit constamment faire face sont caractérisées par diverses dynamiques et des échelles de temps variables. Elle y répond en activant ses réseaux de réparation des dommages induits par ces stimuli dans le but de survivre, ou au contraire, en activant les voies de la mort en fonction de la sévérité du stress et de l'état de la cellule au moment où elle y est exposée. L'extrême complexité de ces réseaux intracellulaires donne un caractère non-linéaire à la réponse de la cellule aux signaux (perturbation des conditions) de son environnement. Les réponses d'adaptation et de résistance au stress sont les plus intéressantes d'un point de vue thérapeutique, et la compréhension de leurs mécanismes requiert l'étude des circuits biologiques qui les orchestrent.

Les propriétés dynamiques de ces circuits sont expérimentalement mises à l'épreuve par l'application de stress ayant des profils dynamiques différents tels que des sinusoïdes, des impulsions ou encore des rampes [199–201]. Les approches de fractionnement de dose, de modulation de l'amplitude-durée du stress et du débit de dose ont également été utilisées [1,202]. De ces études, il a été établi que la létalité d'un stress dépend significativement de sa forme temporelle, mais le lien avec les caractéristiques des réseaux de réponse du système exposé reste encore à élucider. D'autre part, les modèles dosimétriques à l'image du *CEM43* pour le choc thermique ou encore du modèle linéaire quadratique pour les radiations ionisantes lient directement le stress de par ses paramètres (durée, intensité, débit de dose...) à la survie cellulaire dans un cadre d'iso-effet biologique [203], sans expliciter clairement les mécanismes intracellulaires corrélant les deux.

La réponse cellulaire de survie/mort issue d'une exposition à des stress thermiques de différents profils temporels, notamment, de forme rectangulaire (impulsion) avec des durées et intensités variables a été étudiée dans les chapitres précédents, et l'impact de la forme temporelle du stress sur la survie cellulaire a été mis en évidence. Dans cette partie des travaux, nous nous proposons d'étudier la variation de la vulnérabilité cellulaire face au stress transitoires de forme impulsionnelle par modulation de leurs durées et intensités, cependant, non pas à partir des courbes de survie, mais à travers l'analyse des courbes iso-effet qui en résultent. Pour ce faire, un modèle dynamique faisant intervenir les processus d'induction des dommages, de réparation et de mort, caractérisés par des échelles de temps significativement différentes, est utilisé.

Dans ce modèle, et sous des conditions de stress, les dommages induits activent deux voies antagonistes : une voie de réparation des dommages basée sur un mécanisme de rétroaction négative, et une voie de mort cellulaire programmée impliquant une boucle de rétroaction positive.

Il prédit qu'en fonction des combinaisons durée-intensité donnant un iso-effet biologique, quatre régimes de réponse avec des sensibilités différentes peuvent émerger, et sont ajustables par des lois de puissance liant l'amplitude du stress à sa durée [204]. Ce constat nous met sur la piste de l'existence d'un profil dynamique de stress optimal pour chaque système biologique, qui serait dépendant des échelles de temps et des taux de régulation régissant les mécanismes impliqués dans ce système.

6.2 Modèle générique de la réponse cellulaire au stress

Dans le but de construire un réseau générique de la réponse cellulaire aux différents types de stress, les réseaux correspondant à chaque type de stress doivent être simplifiés tout en gardant les caractéristiques régulatrices communes. En effet, indépendamment de la nature du stress, les dommages induits activent les voies de réparation ainsi que les voies de mort programmée, toutefois, par le biais de différentes molécules et cascades de réactions biochimiques. Par exemple, le choc thermique augmente la concentration des protéines dénaturées, qui sont réparées par les protéines chaperons *HSP* déjà présentes mais également produites en réponse à l'élévation de température via une régulation transcriptionnelle par leur facteur de transcription *HSF1*. Parallèlement, les dommages induits par le stress thermique peuvent initier la voie apoptotique [186,187]. Pour le cas des radiations ionisantes, elles induisent principalement des cassures simple-brin et double-brin à l'*ADN*, ce qui active les mécanismes de réparation régulés par *ATR* et *ATM* [205]. L'activation de *P53* suite à la détection des cassures double-brin entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et éventuellement l'apoptose si les dommages sont trop importants [151].

Ces réponses cellulaires au stress peuvent être simplifiées en considérant que les dommages induits, et proportionnels à la sévérité du stress, activent les mécanismes de réparation qui tentent alors de les maîtriser avant qu'ils ne s'accumulent suffisamment pour enclencher le processus irréversible de la mort programmée via les espèces pro-apoptotiques. La figure (6.1) expose des schémas représentatifs de la réponse au stress thermique, aux radiations ionisantes et un schéma générique basé sur nos approximations.

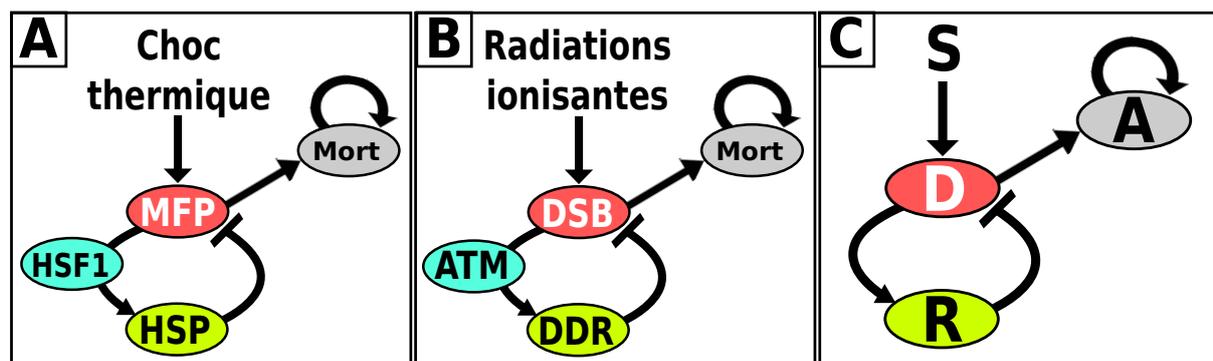


FIGURE 6.1 – Schémas représentatifs des réponses cellulaires aux stress. A- Réponse cellulaire au stress thermique induisant une augmentation des protéines dénaturées (*MFP*) et des protéines chaperons *HSP* via une régulation transcriptionnelle par *HSF1*. B- Réponse cellulaire aux radiations ionisantes induisant des cassures double-brin *DSB* qui activent les processus de réparation de l'*ADN* (*DDR*, pour *DNA Damage Repair*) régulés par *ATM*. C- Schéma générique de la réponse impliquant le stress (*S*), les dommages (*D*), les espèces réparatrices (*R*) et les espèces pro-apoptotiques (*A*). Les flèches ($=>$) indiquent une activation, et les flèches ($=|$) une inhibition.

En partant de ces approximations, un modèle générique peut être construit en considérant que :

1. Les espèces réparatrices sont déjà présentes dans les conditions normales, et sont activées par les dommages induits sous conditions de stress.
2. Les espèces réparatrices activées maîtrisent les dommages et forment ainsi une boucle de rétroaction négative avec ces derniers.
3. Une accumulation importante des dommages enclenche irréversiblement la boucle de rétroaction positive des espèces pro-apoptotiques, ce qui entraîne la mort cellulaire.

Ces principes sont utilisés pour créer un réseau de réactions biochimiques dont les variables sont le stress (S), les dommages (D), les espèces réparatrices (R), et les espèces pro-apoptotiques (A) (Table. 6.1).

TABLE 6.1 – Liste des réactions biochimiques et des taux correspondants

#	Réaction biochimique	Taux de réaction	Définition
R1	$S \longrightarrow S + D$	$b_D S$	Taux d'induction de D par S
R2	$\emptyset \longrightarrow R$	b_R	Taux de production basale de R
R3	$R + D \longrightarrow R$	$d_D R$	Taux de dégradation de D par R
R4	$\alpha D \longrightarrow R + \alpha D$	b_{DR}	Taux de production de R régulée par D
R5	$R \longrightarrow \emptyset$	d_R	Taux de dégradation de R
R6	$A \longrightarrow \emptyset$	d_A	Taux de dégradation de A
R7	$D \longrightarrow A + D$	b_{DA}	Taux de production de A régulée par D
R8	$\emptyset \longrightarrow A$	b_{AA}	Taux de production de A

Ce réseau est ensuite traduit en un système d'équations différentielles couplées en utilisant la loi d'action de masse :

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}D &= b_D S(t) - d_D R D \\
\frac{d}{dt}R &= b_R + b_{DR} D^\alpha - d_R R \\
\frac{d}{dt}A &= b_{DA} D + b_{AA} \frac{A^2}{\kappa_A + A^2} - d_A A
\end{aligned} \tag{6.1}$$

En normalisant les temps ($t' = t d_A$) et les variables ($X' = X/X_0$) dans le but de réduire le nombre de paramètres et en posant : $S_0 = \frac{R_0 D_0 d_D}{b_D}$, $R_0 = \frac{b_R}{d_R} + \frac{b_{DR}}{d_R} D_0^\alpha$, $\tau_D = \frac{d_A}{d_D R_0}$, $\tau_R = \frac{d_A}{d_R}$, $\kappa = \frac{\kappa_A}{A_0^2}$, $D_0 = \frac{\sigma}{b_{DA}}$, $A_0 = \frac{b_{AA}}{d_A}$, $\beta = \frac{b_{DR}}{d_R R_0} D_0^\alpha$, le système suivant est finalement obtenu :

$$\begin{aligned}
\tau_D \frac{d}{dt}D &= S(t) - R D \\
\tau_R \frac{d}{dt}R &= (1 - \beta) + \beta D^\alpha - R \\
\frac{d}{dt}A &= \sigma D + \frac{A^2}{\kappa + A^2} - A
\end{aligned} \tag{6.2}$$

où les paramètres τ_D et τ_R désignent les échelles de temps des dommages et des espèces réparatrices respectivement, β ($\in [0, 1]$) quantifie l'intensité de de la rétroaction négative et α définit la non-linéarité (coopérativité si $\alpha > 1$ ou saturation si $\alpha < 1$), σ et κ déterminent les seuils d'auto-activation des espèces pro-apoptotiques et de la transition vers l'état de mort. Ce modèle présente une topologie relativement simple dans laquelle une boucle de rétroaction négative en amont entre les dommages induits (D) et les espèces réparatrices (R), qui cible une réponse d'adaptation homéostatique, est couplée à une boucle de rétroaction positive sur les espèces apoptotiques (A) en aval dont la bifurcation enclenche un processus irréversible de mort.

6.2.1 Dynamique et bifurcation

L'équation suivante est celle des points fixes des espèces pro-apoptotiques (A) et est constituée d'un terme désignant une boucle d'auto-activation. Par une analyse de stabilité, il s'avère que la boucle est capable de générer de la bistabilité pour des valeurs suffisamment petites de $\kappa < (\frac{3}{4})^3$, et donne donc un état stable de survie (A_0^*), un état stable de mort (A_1^*) et un état instable (A_S^*) (Fig. 6.2) :

$$\sigma D + \frac{(A_{0,1,S}^*(D))^2}{\kappa + (A_{0,1,S}^*(D))^2} - A_{0,1,S}^*(D) = 0 \quad (6.3)$$

Une déstabilisation de l'état stable de survie est possible par le biais d'une bifurcation nœud-col pour un certain seuil de dommages (D_{SN}) qui est fixé à 1 par le paramètre σ . Conséquemment, le système (6.2) se trouve au point fixe de bifurcation pour $S = 1$ où $D^* = 1$ et $R^* = 1$. Cette transition de l'état de vie vers l'état de mort est dite irréversible quand la bistabilité persiste même en absence de dommages ($D = 0$), ce qui est possible pour $\kappa < \frac{1}{4}$ d'après l'analyse de stabilité du système [204].

Par ailleurs, il est pratique d'introduire un paramètre reflétant l'intensité de la rétroaction positive en partant du point fixe instable A_S^* dont la valeur correspondante à $D = 0$ définit un seuil à dépasser pour que la mort soit irréversiblement engagée :

$$\gamma = \frac{\sigma}{A_S^*(D = 0)} \quad (6.4)$$

avec :

$$A_S^*(D = 0) = \frac{(1 - \sqrt{1 - 4\kappa})}{2} \quad (6.5)$$

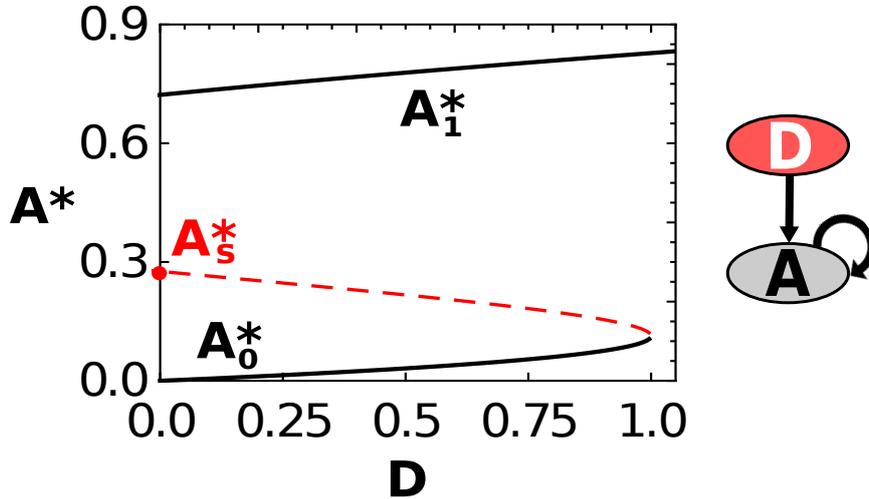


FIGURE 6.2 – **Diagramme de bifurcation avec bistabilité irréversible.** Les lignes pleines noires représentent les états stables du système correspondant à la survie A_0^* et à la mort A_1^* , la ligne en pointillés rouge représente les états instables A_S^* .

De son côté, le module de réparation des dommages implique quatre paramètres α , β , τ_D et τ_R qui caractérisent respectivement la non-linéarité, l'intensité et les échelles de temps de la boucle de rétroaction négative. Il présente une dynamique amortie des dommages dont la forme dépend des paramètres précédemment cités.

6.2.2 Iso-effet et paramètres (durée-intensité) du stress

Un cas très simple de stress transitoire $S(t)$ est caractérisé par un profil dynamique rectangulaire (impulsion) avec une durée T et une intensité S variables :

$$S(t) = S\Pi(t, T) \quad (6.6)$$

où $\Pi(t, T) = 1$ pour $0 < t < T$, et 0 autrement. Pour un stress de profil rectangulaire, il existe une combinaison de T et S pour laquelle le réseau de réponse (système d'équations 6.2) converge, pour des durées temporelles longues, vers le point fixe instable de la bifurcation qui sépare les états de survie et de mort :

$$\lim_{t \rightarrow \infty} A(t) = A_S \quad (6.7)$$

Cette combinaison (S, T) dépend du jeu de paramètres du réseau $\vec{p} = \{\alpha, \beta, \gamma, \tau_D, \tau_R\}$. Donc, l'iso-effet peut être représenté par une fonction f liant l'intensité du stress S à sa durée T comme suit :

$$S = f(T, \alpha, \beta, \gamma, \tau_D, \tau_R) \quad (6.8)$$

Cette combinaison peut être déterminée par intégration du système d'équations (6.2) couplé à l'équation (6.6) avec une condition limite donnée par l'équation (6.7). L'un des buts de l'étude est de voir si la fonction f précédente suit une loi de puissance d'exposant b par rapport à la durée T ($b = 1$ correspond à la règle *Haber* [206]) :

$$b(T) = -\frac{T}{f(T)} \partial_T f(T) \quad (6.9)$$

En outre, et par souci de pertinence biologique, une contrainte sur les échelles de temps régissant les dynamiques des dommages, des espèces réparatrices et des espèces pro-apoptotiques est introduite dans le système d'équations (6.2) telle que :

$$\tau_D \leq \tau_R \leq \tau_A \equiv 1 \quad (6.10)$$

Pour différents types de stress, ces échelles de temps peuvent être estimées à partir des données expérimentales de la dynamique de réponse. En effet, la mort par voie apoptotique est typiquement initiée à partir de $1h$ et jusqu'à $8h$ pour plusieurs inducteurs [100, 207]. A titre de comparaison, l'échelle de temps d'induction des dommages peut être beaucoup plus rapide, de l'ordre de quelques millisecondes pour le H_2O_2 induit par stress oxydant [208], de quelques minutes pour les protéines dénaturées induites par le stress thermique [122], et moins d'une heure pour les dommages de l'*ADN* induits par les radiations ionisantes [209]. Et enfin, l'échelle de temps de l'activation des espèces réparatrices induite par le stress peut être estimée à partir du temps nécessaire pour que ces dernières atteignent leur niveau maximal, qui est par exemple de quelques dizaines de minutes à quelques heures pour les mécanismes de réparation de l'*ADN* [210], et de quelques heures pour l'activation des *HSP* [211].

6.3 Lois de puissance de la relation iso-effet

Dans cette partie, l'hypothèse stipulant que les paramètres de régulation et les échelles de temps qui caractérisent le système peuvent moduler sa sensibilité face à un stress transitoire et que cette modulation peut être démontrée par le calcul de la relation iso-effet $S^*(T)$ dans le cas d'un stress de profil rectangulaire est explorée. En considérant une séparation des échelles de temps telle que $\tau_D = 10^{-6}$ et $\tau_R = 10^{-3}$, les courbes $S^*(T)$ présentant un iso-effet sont définies par un balayage de l'espace à deux dimensions des profils de stress (S, T) en cherchant les combinaisons pour lesquelles la condition définie par l'équation (6.7) est satisfaite. Pour une rétroaction négative suffisamment forte ($\beta > 0$), ces courbes iso-effet $S^* = f(T)$ montrent

clairement quatre régimes ($R_1 \rightarrow R_4$) en fonction de la durée du stress T (Fig. 6.3), et il reste à déterminer les lois de puissance les ajustant. Pour les trois premier régimes, l'hypothèse clé stipulant que $\tau_D \ll \tau_R \ll 1$ et $T \ll 1$ implique que l'accumulation des dommages induite par le stress transitoire retourne à son niveau basal avec une échelle de temps plus rapide que celle régissant la dynamique des espèces pro-apoptotiques. Il s'en suit que, si le stress et les dommages induits sont suffisamment sévères, ils entraînent une augmentation des espèces pro-apoptotiques qui dépend principalement de l'intégrale temporelle des dommages $A(t' < T) \sim \sigma \int_0^{t'} D(t) dt$ et qui atteint éventuellement le seuil A_S^* initiant irréversiblement la mort. Pour un stress de profil dynamique rectangulaire, la relation iso-effet $S^* = f(T)$ peut être déterminée en résolvant l'équation (6.7) :

$$\int_0^T D(t) dt + \int_T^\infty D(t) dt \approx \frac{A_S}{\sigma} = \gamma^{-1} \quad (6.11)$$

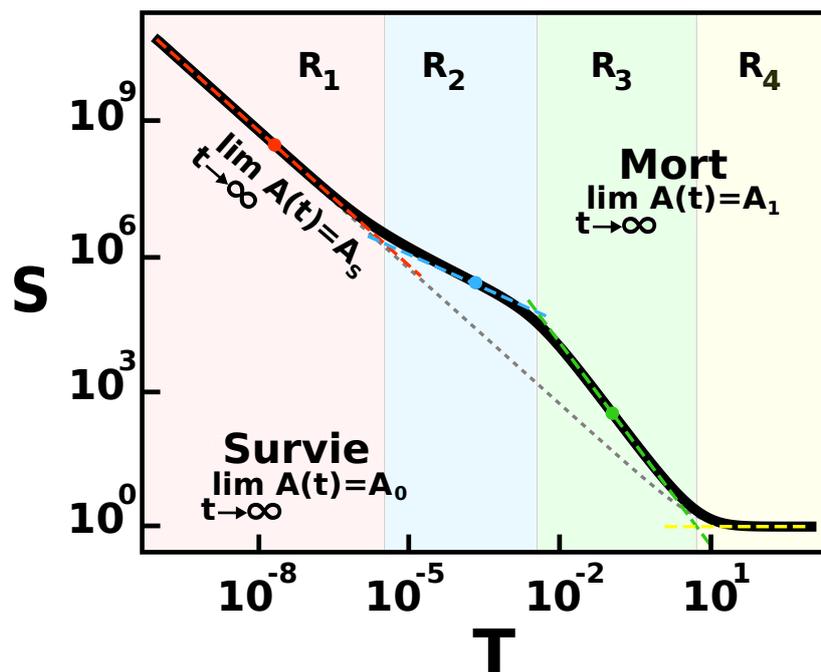


FIGURE 6.3 – Courbe iso-effet $S^* = f(T)$ décrite par quatre régimes distincts. La courbe noire représente la relation d'iso-effet $S^* = f(T)$ avec régulation ($\beta \neq 0$). La ligne en pointillés grise désigne le cas de référence ($\beta = 0$) de l'équation (6.14). Les lignes en pointillés rouge, bleue, verte et jaune représentent les ajustements des quatre régimes. La courbe iso-effet a été obtenue pour le jeu de paramètres suivant : $\tau_D = 10^{-6}$, $\tau_R = 10^{-3}$, $\beta = 1$, $\kappa = 0,2$, $\sigma = 0,052987$ et $\alpha = 0,5$.

Dans l'absence d'une rétroaction négative ($\beta = 0$), les espèces réparatrices peuvent être supposées comme étant dans leur état stationnaire $R = R^* = 1$, et ce, peu importe la sévérité du stress et des dommages induits. De ce fait, l'équation différentielle des dommages dans le système (6.2) devient ($\tau_D \frac{d}{dt} D = S(t) - D$), dont l'intégration donne :

$$D(0 < t < T) = S(1 - \exp^{-t/\tau_D}) \quad (6.12)$$

$$D(T < t) = S(1 - \exp^{-T/\tau_D}) \exp^{-(t-T)/\tau_D} \quad (6.13)$$

Conséquemment, l'équation (6.11) donne :

$$S_{\beta=0} = (\gamma T)^{-1} \quad (6.14)$$

La relation iso-effet $S^* = f(T)$ de ce cas-ci (sans rétroaction négative) définie par l'équation précédente, est prise comme référence pour la suite de l'étude.

6.3.1 Régime R_1 : adaptation après un stress de très courte durée

Dans des conditions de présence de régulation ($\beta \neq 0$), la dynamique des dommages devient plus compliquée et qualitativement différente dépendamment de la durée du stress T et des échelles de temps τ_D et τ_R . Le premier régime qui se distingue dans les courbes iso-effet $S^* = f(T)$ correspond au cas où la durée du stress est tellement courte que la réponse est dominée par la dynamique des dommages et des espèces réparatrices après le stress. En d'autres termes, le second terme de l'équation (6.11) domine le premier. Un stress d'intensité S suffisamment élevée fait que la dynamique des espèces réparatrices R soit essentiellement décrite par leur régulation par les dommages D mais seulement si :

$$\beta \left(\frac{ST}{\tau_D} \right)^\alpha \gg 1 - \beta \quad (6.15)$$

Si cette condition est satisfaite (elle l'est au moins pour $\beta = 1$), la dynamique de relaxation des dommages $D(t)$ après le stress, et donc après une augmentation de leur niveau de condition initiale à $D(T) = \frac{ST}{\tau_D}$ (Fig. 6.4), est principalement décrite par le système réduit suivant :

$$\begin{aligned} \tau_D \frac{d}{dt} D &= -RD \\ \tau_R \frac{d}{dt} R &= \beta D^\alpha \end{aligned} \quad (6.16)$$

La dynamique des dommages présente dans ce cas une relaxation décrite par une fonction hyperbolique (Fig. 6.4) résultante du système précédent :

$$D(t) = \left(\frac{\alpha \tau_R}{\beta \tau_D} C_1 \operatorname{sech}^2(K(t - T + C_2)) \right)^{\frac{1}{\alpha}} \quad (6.17)$$

La dynamique des espèces réparatrices découlant du même système d'équations est décrite par :

$$R(t) = \sqrt{2C_1} \tanh(K(t - T + C_2)) \quad (6.18)$$

avec $K = \frac{\alpha}{\tau_D} \sqrt{\frac{C_1}{2}}$.

Les constantes C_1 et C_2 peuvent être déterminées via les conditions initiales $D(T) = \frac{ST}{\tau_D}$ et $R(T) = 1 - \beta$, donnant ainsi le résultat :

$$\begin{aligned} C_1 &= \frac{\beta \tau_D}{\alpha \tau_R} \left(\frac{ST}{\tau_D} \right)^\alpha + \frac{(1 - \beta)^2}{2} \\ C_2 &= \frac{\tau_D}{\alpha} \sqrt{\frac{2}{C_1}} \operatorname{arctanh} \left(\frac{1 - \beta}{\sqrt{2C_1}} \right) \end{aligned} \quad (6.19)$$

Pour ce premier régime, la relation iso-effet $S^* = f(T)$ peut être déterminée en injectant l'équation de la dynamique des dommages (6.17) dans l'équation (6.11), et nous obtenons finalement (pour le cas $\beta = 1$ satisfaisant la condition 6.15) [204] :

$$S_{R1} = \left(\frac{2\alpha}{\gamma^2 B(\frac{1}{\alpha}, \frac{1}{2})^2} \frac{\tau_D^{1-\alpha}}{\tau_R} \right)^{\frac{1}{(2-\alpha)}} T^{-1} \quad (6.20)$$

où $B(\frac{1}{\alpha}, \frac{1}{2})$ est la fonction *Beta* définie par :

$$B(x, y) = \int_0^1 t^{x-1} (1-t)^{y-1} dt \quad (6.21)$$

Donc, dans le régime R_1 , et en comparaison au cas de référence sans rétroaction négative ($\beta = 0$) de l'équation (6.14), la dose létale reste proportionnelle au produit de l'intensité du stress et de sa durée, mais peut être augmentée ou diminuée en fonction des paramètres de régulation.

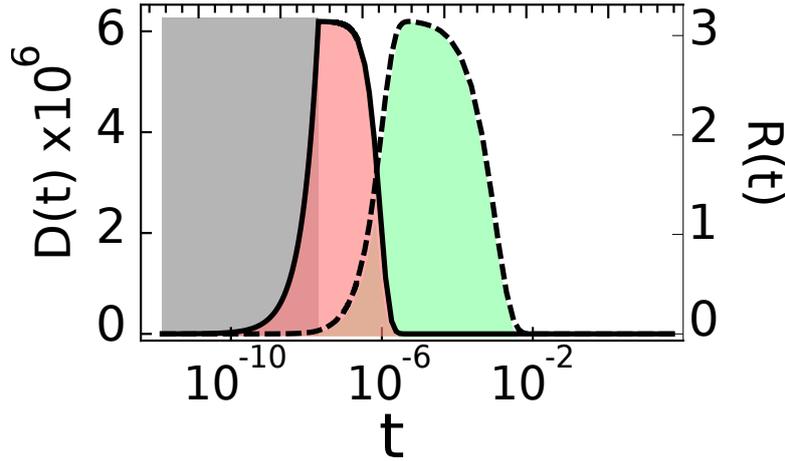


FIGURE 6.4 – Dynamique des dommages et des espèces réparatrices dans le régime R_1 (stress de durée très courte). La ligne pleine désigne la dynamique des dommages D , la ligne en pointillés représente celle des espèces réparatrices R . La zone grise représente le profil temporel du stress.

6.3.2 Régime R_2 : adaptation transitoire à un stress de courte durée

Dans le régime R_2 , la durée du stress est suffisamment longue pour que la contribution dominante des dommages soit celle de leur accumulation durant le stress (Fig. 6.5), c'est à dire que le premier terme domine le second dans l'équation (6.11). Cependant, la durée n'est pas suffisamment longue pour que les dommages atteignent leur valeur du point fixe $D^*(S)$. La dynamique des dommages dans ce cas peut être approximée par son expression de l'état quasi-stationnaire :

$$D(t) = \frac{S}{R(t)} \quad (6.22)$$

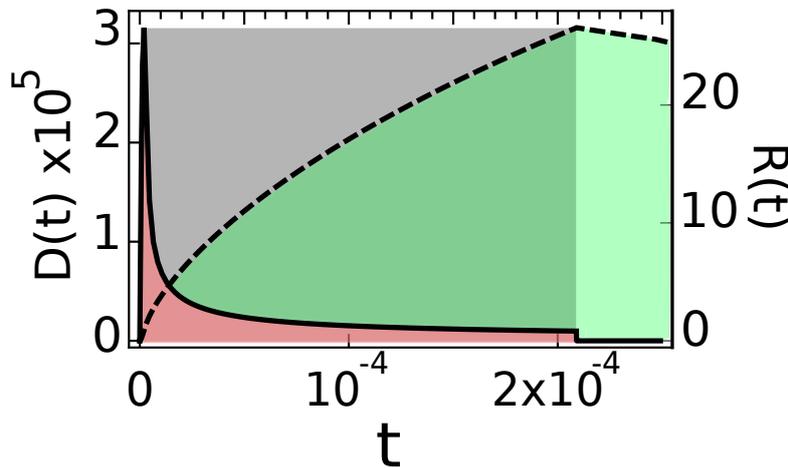


FIGURE 6.5 – Dynamique des dommages et des espèces réparatrices dans le régime R_2 (stress de durée courte). La ligne pleine désigne la dynamique des dommages D , la ligne en pointillés représente celle des espèces réparatrices R . La zone grise représente le profil temporel du stress.

Il s'en suit que la dynamique des espèces réparatrices supposée lente est décrite par :

$$\frac{d}{dt}R = \frac{\beta}{\tau_R} \left(\frac{S}{R} \right)^\alpha \quad (6.23)$$

Ainsi, l'intégration de la dynamique lente des espèces réparatrices donne une solution analytique de la dynamique transitoire de $D(t)$ durant le stress :

$$D(t) = \left(\frac{\tau_R S}{(\alpha + 1)\beta t} \right)^{\left(\frac{1}{\alpha+1}\right)} \quad (6.24)$$

Enfin, en injectant l'équation (6.24) dans l'équation (6.11), il est possible de déterminer la relation iso-effet correspondant au régime R_2 :

$$S_{R2} = \left(\frac{\alpha^{\alpha+1}\beta}{(\alpha + 1)^\alpha \gamma^{\alpha+1} \tau_R} \right) T^{-\alpha} \quad (6.25)$$

Il est à noter que pour le cas particulier où $\alpha = 1$, nous obtenons :

$$S_{R1} = S_{R2} = \left(\frac{\beta}{2\gamma^2 \tau_R} \right) T^{-1} \quad (6.26)$$

6.3.3 Régime R_3 : adaptation stationnaire à un stress de courte durée

Dans le régime R_3 , la durée du stress est suffisamment longue pour que D soit très proche de son point fixe D^* durant la quasi-totalité de l'exposition (Fig. 6.6). Par conséquent, l'équation (6.11) donne :

$$\int_0^T D^*(S) dt = T D^*(S) = \gamma^{-1} \quad (6.27)$$

Et donc :

$$D^*(S) = \frac{1}{\gamma T} \quad (6.28)$$

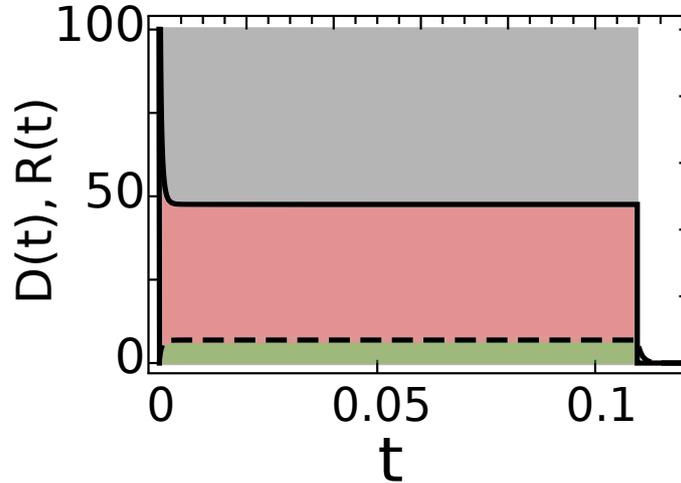


FIGURE 6.6 – Dynamique des dommages et des espèces réparatrices dans le régime R_3 . La ligne pleine désigne la dynamique des dommages D , la ligne en pointillés représente celle des espèces réparatrices R . La zone grise représente le profil temporel du stress.

D'autre part, la condition du point fixe ($\frac{d}{dt}D = \frac{d}{dt}R = 0$) implique que :

$$(1 - \beta) + \beta(D^*(S))^\alpha - \frac{S}{D^*(S)} = 0 \quad (6.29)$$

En injectant l'équation (6.28) dans l'équation (6.29), une relation iso-effet composée de deux lois de puissance est obtenue :

$$S_{R3} = \beta(\gamma T)^{-\alpha-1} + (1 - \beta)(\gamma T)^{-1} \quad (6.30)$$

Le premier terme de cette relation qui désigne l'effet de la rétroaction négative domine pour des valeurs de β suffisamment élevées ($> \beta_C = (1 + (\gamma T)^{-\alpha})^{-1}$). En outre, si $\beta = 0$, nous retrouvons bien la relation iso-effet de référence précédemment présentée (Eq. 6.14).

6.3.4 Régime R_4 : adaptation à un stress de longue durée

En ce qui concerne le dernier régime, la durée du stress est suffisamment longue pour que le système atteigne son point fixe $R^* = D^* = 1$ et $A = A_S^*(D = 1)$, impliquant ainsi un stress $S = 1$. Il est à noter que dans ce régime, la relation iso-effet $S^* = f(T)$ ne dépend donc plus des échelles de temps et des paramètres de régulation du système.

6.4 Effets des paramètres de régulation sur la relation iso-effet

Comme il a été précédemment montré, les relations iso-effet $S^* = f(T)$ des trois premiers régimes dépendent des paramètres du système et de ses échelles de temps (Eq. 6.20, 6.25 et 6.30). Nous nous proposons donc de regarder comment cette relation varie en fonction de ces paramètres, en prenant toujours comme référence le cas où la rétroaction négative est absente ($\beta = 0$) (Eq. 6.14). En ce qui concerne le quatrième régime, cette variation de paramètres ne change rien.

6.4.1 Effet de la variation de β sur la relation iso-effet

Dans un premier temps, l'intérêt est orienté vers le paramètre β désignant l'intensité de la rétroaction entre les dommages et les espèces réparatrices. Des simulations où ce paramètre varie entre 0 et 1 sont réalisées, et la courbe iso-effet $S^* = f(T)$ correspondant à chaque valeur est enregistrée. La figure (6.7) présente les résultats de cette première opération. Il y est facilement constatable que les trois premiers régimes vont temporellement s'étendre ou rétrécir en fonction du paramètre β . Le code couleur montre par ailleurs que le système devient plus résistant au stress quand β augmente, ce qui est logique vu qu'en augmentant ce paramètre, les espèces réparatrices sont activées plus rapidement par les dommages.

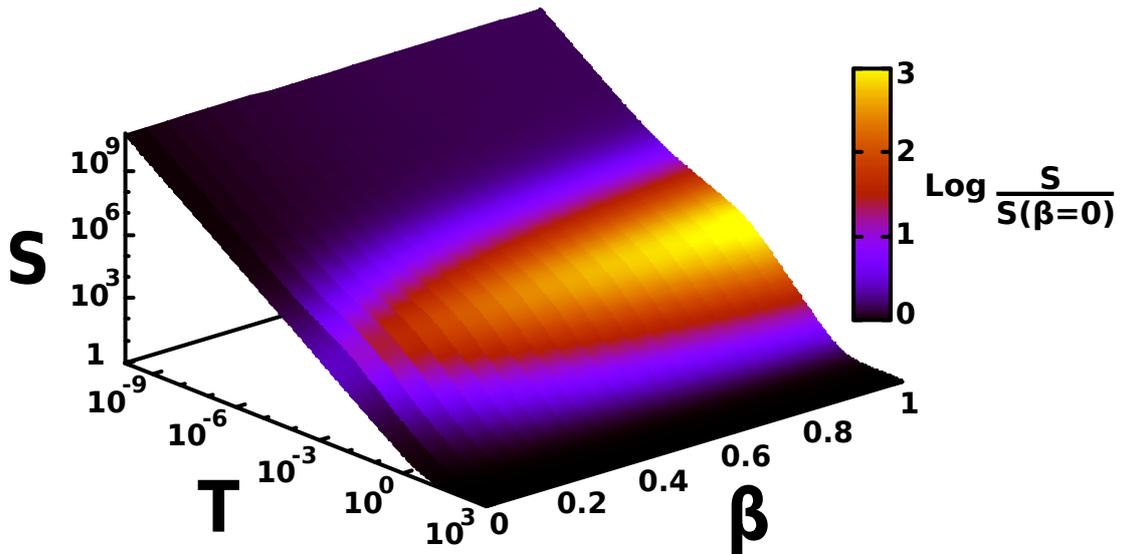


FIGURE 6.7 – Effet du paramètre β sur les régimes de la relation iso-effet. Les échelles de S et de T sont logarithmiques, le code couleur représente la quantité $\log\left(\frac{S}{S(\beta=0)}\right)$. Pour ces simulations numériques, α , τ_R et τ_D ont été respectivement fixés à 0,5, 10^{-3} et 10^{-6} .

6.4.2 Effet de la variation de τ_R sur la relation iso-effet

A présent, nous nous intéressons au paramètre désignant l'échelle de temps des espèces réparatrices τ_R . Pareillement que pour β , des simulations de variation de ce paramètre entre 10^{-6} et 1 donnent les courbes iso-effet pour chaque valeur. La figure (6.8) expose les résultats, et tout comme le cas précédent, l'intervalle de durée caractérisant chaque régime varie en fonction de τ_R . Quand τ_R augmente, la dynamique des espèces réparatrices devient plus lente, il s'en suit que le système devient plus sensible au stress car les dommages ont plus de temps pour s'accumuler.

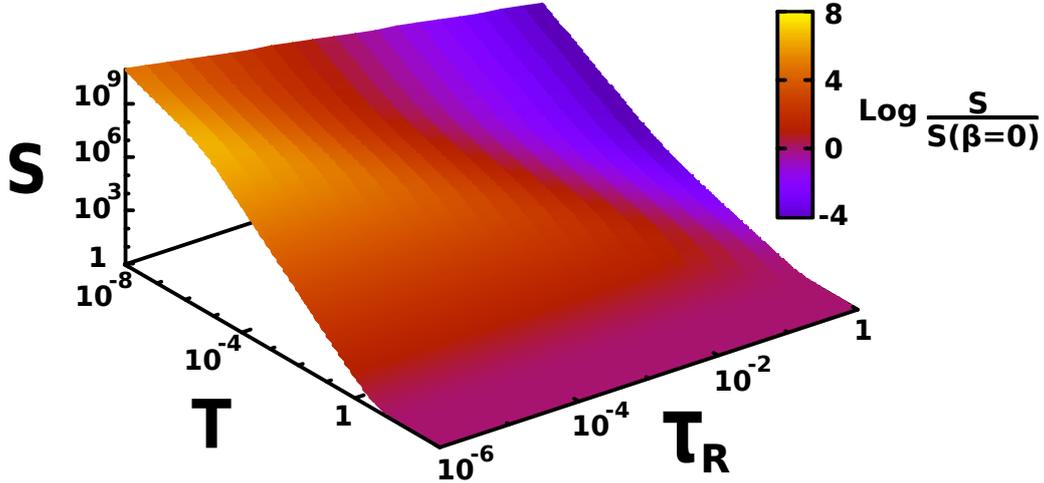


FIGURE 6.8 – Effet du paramètre τ_R sur les régimes de la relation iso-effet. Les échelles sont logarithmiques, le code couleur représente la quantité $\log\left(\frac{S}{S(\beta=0)}\right)$. Pour ces simulations numériques, α , β et τ_D ont été respectivement fixés à 0, 5, 1 et 10^{-6} .

6.4.3 Effet de la variation de α sur la relation iso-effet

Enfin, nous faisons varier le paramètre α entre 0 et 2. Pour rappel, $\alpha < 1$ décrit une saturation et $\alpha > 1$ une coopérativité, régissant l'interaction entre les dommages et les espèces réparatrices. La figure (6.9) montre la variation de l'allure de la courbe iso-effet en fonction de ce paramètre. Le code couleur indique que le système devient plus résistant quand α augmente, car comme pour β , les espèces réparatrices sont activées plus rapidement dans ce cas.

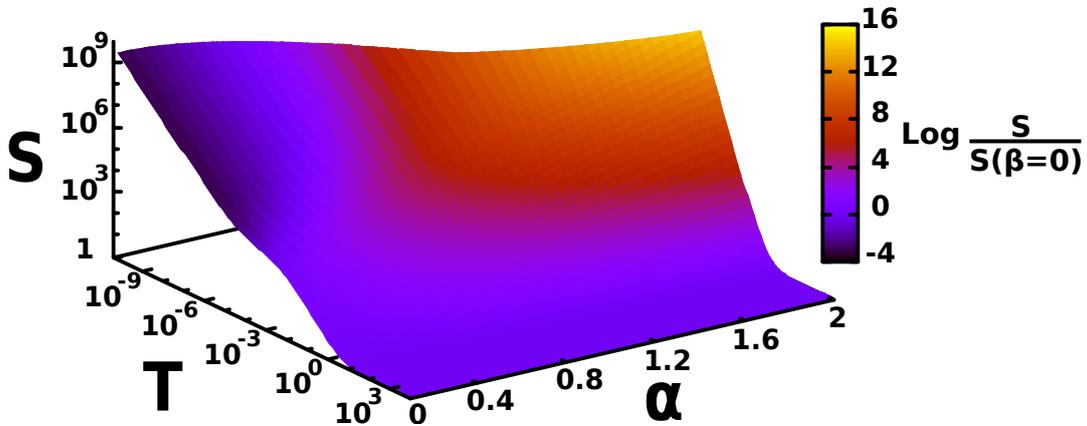


FIGURE 6.9 – Effet du paramètre α sur les régimes de la relation iso-effet. Les échelles de S et de T sont logarithmiques, le code couleur représente la quantité $\log\left(\frac{S}{S(\beta=0)}\right)$. Pour ces simulations numériques, β , τ_R et τ_D ont été respectivement fixés à 1, 10^{-3} et 10^{-6} .

6.5 Discussion

Dans cette étude, un modèle générique de la réponse cellulaire au stress est construit en se basant sur une rétroaction négative entre les dommages et les espèces réparatrices, une auto-activation des espèces pro-apoptotiques activées par les dommages, et avec une séparation des échelles de temps. Le but était de regarder la manière avec laquelle l'iso-effet biologique, considéré ici comme étant un niveau d'espèces pro-apoptotiques suffisant pour atteindre le seuil de mort, dépend de la combinaison de paramètres intensité-durée définissant le stress. Nous avons constaté l'existence de quatre régimes de réponse qui ont été caractérisés par des lois de puissance, et qui dépendent non seulement de l'intensité et de la durée du stress, mais également des paramètres de régulation et des échelles de temps du système. Ces résultats suggèrent que si le système exposé est caractérisé avec précision en termes d'échelles de temps des acteurs clés et des taux de régulation régissant leurs interactions, il est possible de trouver des combinaisons intensité-durée du stress donnant une réponse optimale de survie ou de mort en modulant la sensibilité du système. En outre, cette étude vient souligner de nouveau le fait que la forme temporelle du stress impacte considérablement la réponse et le destin cellulaire.

Conclusion

Nos travaux se focalisent sur la réponse cellulaire au choc thermique, et plus particulièrement en termes de destin cellulaire (mort ou survie) résultant de l'exposition. Nous procédons par des approches de modélisation des réseaux dynamiques intracellulaires de signalisation orientant la réponse. Notre méthodologie se base sur une boucle de rétroaction entre modélisation et expérimentation, permettant une amélioration continue de nos modèles et de leur aspect quantitatif.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'effet de la forme temporelle du stress thermique sur la survie cellulaire. Un modèle dynamique de la survie cellulaire au stress thermique a été construit en combinant un modèle de réseau biologique [122] à une équation de population. Les résultats des simulations, qui ont été par la suite validés expérimentalement, montrent que pour une même dose thermique déterminée par le *CEM43* [16], une rampe de montée de température raide peut être, pour certaines doses, deux fois plus létale qu'une rampe de montée plus lente, phénomène que nous désignons sous le nom d'effet d'asymétrie. Ceci souligne une fois de plus le fait que la létalité d'un protocole ne dépend pas uniquement de la durée et de l'intensité du stress, point que le *CEM43* ne considère pas.

Ce modèle dynamique de survie cellulaire a par ailleurs permis de mettre en lumière le mécanisme régissant l'effet d'asymétrie constaté, ainsi que la brusque transition de la fraction de survie cellulaire aux alentours d'une température spécifique observée dans les études dosimétriques de diverses lignées. Ce mécanisme s'est avéré être la saturation des ressources cellulaires de réparation des dommages induits par le choc thermique quand une température de seuil est atteinte. Il est donc possible de modifier la létalité d'un protocole hyperthermique en modulant cette température de seuil de saturation. Ce mécanisme constitue une limite intrinsèque qui dépend, entre autres, de l'état de la cellule (quantité disponible des ressources nécessaires à la réparation des dommages) au moment où le stress est appliqué.

En effet, dans notre première étude comportant les deux profils de stress triangulaires, l'élévation rapide de la température impliquant le dépassement du seuil sature le système de renaturation des protéines endommagées de la cellule pour une certaine durée, même si la température revient en-dessous de ce seuil. Ce phénomène est désigné sous l'appellation de *step-down heating* [146–148]. En outre, les résultats de simulations montrent que pour un profil dynamique de stress thermique quelconque, et à condition que la température maximale ne dépasse pas le seuil de saturation, les fractions de survie sont équivalentes (absence d'effet d'asymétrie) et le *CEM43* reste valide. Ceci démontre l'utilité des modèles dynamiques de survie cellulaire en comparaison aux modèles dosimétriques, résidant dans la possibilité d'identification et la compréhension des facteurs biologiques déterminant le destin cellulaire, ce qui peut considérablement améliorer la qualité des prédictions concernant les stress de profils dynamiques variables et/ou irréguliers.

Dans un second temps, un modèle réduit essentiellement centré sur ce mécanisme de saturation des espèces réparatrices a été dérivé du premier. Ce modèle réduit a bel et bien reproduit les résultats obtenus avec le premier modèle, confirmant le rôle central de la saturation dans

l'effet d'asymétrie. Il a par la suite été utilisé pour vérifier la possibilité de modulation de la létalité d'un protocole donné en modifiant le seuil de saturation par inhibition des protéines réparatrices. Enfin, vu le caractère générique vis-à-vis de la réponse au choc thermique du modèle réduit, nous avons essayé d'ajuster les données de survie cellulaire de cinq lignées différentes, et bien que le résultat soit encourageant, il reste préliminaire, et une continuation sur cet axe est envisagée.

Un intérêt particulier a ensuite été porté sur les mécanismes de la mort cellulaire par apoptose, et un modèle minimal a été construit, basé sur une bistabilité irréversible avec effet de seuil, donnant une réponse binaire, de mort ou de survie à un stimulus. Ce modèle a été développé afin de remplacer l'équation de population et la fonction de mort probabiliste précédemment utilisées, dans la détermination du sort cellulaire. En couplant le modèle dynamique de la réponse au stress thermique (*RRCT*) à ce modèle de l'apoptose, et en y introduisant une variabilité cellulaire au niveau des concentrations des protéines chaperons *HSP* puis de la protéine anti-apoptotique *XIAP*, l'hypothèse d'une éventuelle corrélation avec le phénomène de la mort fractionnelle à l'issue d'une exposition au choc thermique a pu être explorée.

Qualitativement, les résultats montrent bien que la variabilité des protéines clés du réseau peut expliquer la différence de réponse à un même stress entre les cellules d'une même colonie. Quantitativement, l'ajustement des données dans le cas d'une variabilité des niveaux de chaperons requiert soit une moyenne, soit un coefficient de variation élevés, et donc peu raisonnables biologiquement. Ceci peut potentiellement être expliqué par l'absence de toute autre source de variabilité qui viendrait compenser une distribution des *HSP* moins large et dont la moyenne est moins élevée. Dans le cas d'une variabilité des niveaux de *XIAP*, l'ajustement des données pour les températures élevées ($> 43^{\circ}\text{C}$) était possible avec un coefficient de variation de la distribution plus acceptable, mais les données relatives aux températures plus basses n'ont pas pu être reproduites. Ces résultats nous mettent sur la voie d'une éventuelle variabilité simultanée des deux protéines citées qui pourrait possiblement reproduire les données de mort fractionnelle avec des distributions plus biologiquement cohérentes.

Enfin, le comportement d'un modèle générique de la réponse cellulaire à des impulsions de stress (toutes natures confondues) de différentes intensités et durées a été étudié [204]. Ce modèle se base sur des mécanismes de régulation entre dommages, espèces réparatrices et espèces apoptotiques. Nous avons constaté que pour un iso-effet biologique, plusieurs régimes de sensibilité au stress existent et dépendent des paramètres du stress (durée-intensité), des paramètres de régulation du réseau et de ses échelles de temps. Ceci souligne l'existence de fenêtres temporelles présentant un certain ratio par rapport aux échelles de temps du système, et pour lesquelles la sensibilité au stress peut être maximale ou minimale. Et pour un système donné dont les paramètres et échelles de temps seraient suffisamment caractérisés, il serait donc théoriquement possible de concevoir un protocole thérapeutique engendrant une réponse optimale.

Tous ces résultats mettent en évidence le fait que la réponse au stress et le destin cellulaire résultant sont régis par des phénomènes et des mécanismes biologiques que les modèles dosimétriques descriptifs à l'image du *CEM43* liant l'effet observé à la dose totale du protocole, bien que très pratiques dans certaines limites, ne peuvent toujours élucider. Parallèlement, les modèles dynamiques qui sont généralement plus compliqués à développer, étudier et utiliser, offrent la possibilité d'avoir une vision plus détaillée des réactions biochimiques orientant l'issue de l'exposition. Ils permettent ainsi de réaliser de meilleures prédictions, notamment, dans le cas où des inhomogénéités de diverses natures aussi bien liées au stress qu'au système le subissant, viendraient compliquer la problématique, et de mieux caractériser les courbes dose-effet.

Perspectives

Bien que l'hyperthermie soit aujourd'hui moins "populaire" en tant que thérapie anti-cancer en comparaison à la radiothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie, son impact positif sur le rendement thérapeutique de ces dernières quand elle est utilisée en combinaison est sans appel. De ce fait, l'exploration des diverses pistes mécanistiques du point de vue biologique que cette modalité de traitement propose ainsi que l'amélioration des techniques d'application et des outils de dosimétrie peuvent s'avérer extrêmement profitables.

Pour nos potentiels futurs projets, la problématique peut, dans un premier temps, être centrée sur la modélisation de l'effet de la variabilité des niveaux de chaperons entre les cellules d'une colonie monoclonale sur la réponse au stress thermique, notamment, sur le destin cellulaire résultant, et, le cas échéant, sur le type de mort induit (apoptose/nécrose). Des expérimentations de suivi du destin cellulaire au sein d'une colonie hétérogène en termes de concentration des *HSP70* permettant la recherche d'une possible corrélation sont nécessaires.

De plus, l'utilisation du modèle réduit de survie cellulaire pour l'ajustement des données relatives à différentes lignées (humaines et non-humaines) et l'exploration des éventuelles causes pouvant provoquer les natures thermosensibles et thermorésistantes de ces lignées est également envisagée. Le but étant de corréler ces natures aux différents jeux de paramètres du modèle rendant possible la reproduction des mesures de fraction de survie, et régissant la dynamique des dommages et le procédé de renaturation .

En ce qui concerne le modèle de réponse d'une cellule unique couplant le modèle *RRCT* et le modèle de l'apoptose, une continuation idéale serait de procéder à sa calibration par des expériences de mesure du temps de mort après exposition au choc thermique. Par ailleurs, une modification du modèle de manière à intégrer l'inhibition de l'apoptose par les *HSP* [51,194–197], ou encore pour qu'il puisse générer de la tristabilité (3 états stables) englobant les états de survie, de mort par apoptose et de mort par nécrose, en introduisant deux mécanismes de seuil sur le niveau des dommages, et éventuellement un mécanisme de compétition entre les deux types de mort, est une idée attirante.

En outre, des travaux ont rapporté l'existence d'un solide lien entre le stress thermique et le stress oxydant [47,212,213]. En effet, une exposition au stress oxydant (H_2O_2) sensibilise les cellules au stress thermique, alors qu'une exposition à un choc thermique sublétalement peut augmenter la tolérance cellulaire face à un stress oxydant ultérieur. La construction d'un modèle englobant les réponses cellulaires à ces deux stress et permettant ainsi la simulation du destin cellulaire résultant de protocoles les combinant de diverses manières peut faire émerger des pistes intéressantes.

Enfin, le fractionnement de la dose thermique et la modulation des niveaux de chaperons à travers le phénomène de thermotolérance qui en résulte restent des questions à grand intérêt. Plusieurs études ont rapporté la surexpression des protéines *HSP* dans les cellules cancéreuses [214–216]. Nous émettons l'hypothèse qu'il existe un protocole thermique (durée-intensité)

optimal pour lequel les cellules tumorales n'ont pas besoin de régulation transcriptionnelle et peuvent réparer les dommages uniquement par le biais des chaperons déjà présents au moment de l'exposition, alors que les cellules saines de la même lignée doivent y recourir. Une idée est de moduler la quantité de chaperons pour une certaine durée dans les cellules saines, par la régulation transcriptionnelle, à l'aide de ce traitement de conditionnement sublétal optimal, les avantageant potentiellement par rapport aux cellules cancéreuses une fois exposées à un traitement létal subséquent.

Annexes

Annexe A

Modèle mathématique du *RRCT*

Le modèle du réseau de réponse au choc thermique de [122] comporte 7 variables et 19 paramètres (Table. 2.1 et 2.2). Les variables sont les concentrations des protéines fonctionnelles $[P]$, du facteur de transcription $[HSF1]$, des protéines chaperons $[HSP]$ et de leur *ARN* $[mHSP]$, des protéines dénaturées $[MFP]$, et des complexes de renaturation et de séquestration $[MFP : HSP]$ et $[HSF1 : HSP]$ respectivement. Les paramètres δ_u sont les taux linéaires de dégradation (u indique l'espèce), les K_u^\pm sont les constantes cinétiques de l'hétérodimérisation et les μ_u sont taux basaux de transcription, P_T désigne la concentration totale des protéines fonctionnelles. Le système d'équations différentielles ordinaires du modèle se présente comme suit :

$$\begin{aligned}
 \frac{d}{dt}[P] &= \mu_P - \delta_P [P] + k_r \frac{[MFP : HSP]}{K_M + [MFP : HSP]} - \kappa_d(T) \frac{[P]}{P_T} \\
 \frac{d}{dt}[HSF1] &= \mu_{HSF1} - K_{HSF1:HSP}^+ [HSF1][HSP] + K_{HSF1:HSP}^- [HSF1 : HSP] \\
 &\quad - \delta_{HSF1} [HSF1] \\
 \frac{d}{dt}[mHSP] &= \mu_{HSP} + \lambda_{HSP} \frac{[HSF1]^3}{P_0^3 + [HSF1]^3} - \delta_{mHSP} [mHSP] \\
 \frac{d}{dt}[HSP] &= \beta_{HSP} [mHSP] - \delta_{HSP} [HSP] - K_{HSF1:HSP}^+ [HSF1][HSP] \\
 &\quad + K_{HSF1:HSP}^- [HSF1 : HSP] - K_{MFP:HSP}^+ [HSP][MFP] \\
 &\quad + k_r \frac{[MFP : HSP]}{K_M + [MFP : HSP]} \\
 \frac{d}{dt}[MFP] &= \kappa_d(T) \frac{[P]}{P_T} - K_{MFP:HSP}^+ [HSP][MFP] - \delta_{MFP} [MFP] \\
 \frac{d}{dt}[MFP : HSP] &= K_{MFP:HSP}^+ [HSP][MFP] - k_r \frac{[MFP : HSP]}{K_M + [MFP : HSP]} \\
 &\quad - \delta_{MFP:HSP} [MFP : HSP] \\
 \frac{d}{dt}[HSF1 : HSP] &= K_{HSF1:HSP}^+ [HSF1][HSP] - K_{HSF1:HSP}^- [HSF1 : HSP] \\
 &\quad - \delta_{HSF1:HSP} [HSF1 : HSP]
 \end{aligned} \tag{A.1}$$

Annexe B

Subroutine SEULEX

SEULEX est une implémentation *FORTTRAN* de la méthode d'extrapolation linéaire semi-implicite d'*Euler* à pas adaptatif [217]. Cette subroutine est adaptée aux équations différentielles raides et aux systèmes d'équations différentielles caractérisées par des échelles de temps différentes, ce qui est le cas des modèles biologiques dynamiques que nous utilisons. Le code source de la subroutine peut être obtenu sur "<http://www.unige.ch/~haier/software.html>".

Pour comprendre la méthodologie de résolution de *SEULEX*, considérons l'équation différentielle suivante :

$$Y' = F(t, Y) \quad (\text{B.1})$$

Avec $Y(t_0) = Y_0$ comme condition initiale.

L'approximation de la dérivée de Y au temps t pour h très petit donne :

$$Y'(t) \approx \frac{Y(t+h) - Y(t)}{h} \quad (\text{B.2})$$

Et donc :

$$Y(t+h) \approx Y(t) + hY'(t) \quad (\text{B.3})$$

En utilisant l'équation (B.1), nous obtenons :

$$Y(t+h) \approx Y(t) + hF(t, Y) \quad (\text{B.4})$$

Et de là nous retrouvons la méthode d'*Euler* explicite définie comme suit :

$$Y_{n+1} = Y_n + hF(t_n, Y_n) \quad (\text{B.5})$$

où $h = t_{n+1} - t_n$.

La méthode d'*Euler* explicite est l'une des plus simples et est assez avantageuse en termes de temps de calcul, mais elle n'assure pas la convergence des solutions pour les équations différentielles raides.

A contrario, la méthode d'*Euler* implicite est plus stable (permet de prendre un pas h plus important) et assure la convergence des solutions, mais est très coûteuse en temps de calcul. Dans cette dernière, le membre de droite de l'équation (B.5) est déterminé en fonction de la nouvelle valeur de Y :

$$Y_{n+1} = Y_n + hF(t_{n+1}, Y_{n+1}) = Y_n + hY'_{n+1} \quad (\text{B.6})$$

Enfin, la linéarisation de l'équation précédente par $F(Y)$ donne l'équation de la méthode d'*Euler* semi-implicite [218] :

$$Y_{n+1} = Y_n + h \left(F(Y_n) + \frac{\partial F}{\partial Y}(Y_{n+1} - Y_n) \right) = Y_n + h \left(I - h \frac{\partial F}{\partial Y} \right)^{-1} F(Y_n) \quad (\text{B.7})$$

où I est la matrice identité et $\frac{\partial F}{\partial Y}$ une matrice Jacobienne. La méthode semi-implicite présente un bon compromis entre stabilité des solutions et temps de calcul. Dans les simulations de nos modèles dynamiques, *SEULEX* réalise un calcul itératif pour déterminer la trajectoire de variation des concentrations des différentes espèces.

Annexe C

Calibration du dispositif expérimental dans l'étude de l'effet d'asymétrie

Dans notre étude de l'impact de la forme temporelle du stress thermique sur la fraction de survie cellulaire présentée au chapitre 2, le dispositif expérimental utilisé est composé d'un régulateur PID (Proportionnel, Intégral, Dérivé) et d'un incubateur à quatre compartiments dans lesquels sont placées deux colonies cellulaires *HeLa* et une thermistance, avec un contrôle de l'atmosphère et de l'humidité à l'intérieur de l'incubateur. Par la suite, un fichier consigne de la variation de la température en fonction du temps est introduit, que le régulateur PID applique aux bornes de l'incubateur. De plus, la variation de la résistance de la thermistance est enregistrée afin d'obtenir une mesure de la température réellement atteinte dans les compartiments de l'incubateur à l'aide d'une formule empirique telle que :

$$T = \frac{2093.1}{\sqrt{R} + 0.78} - 11.345 \quad (\text{C.1})$$

où T est la température en °C et R la résistance de la thermistance en *Ohm*.

Comme il a été précédemment mentionné, il est expérimentalement très difficile d'obtenir des profils temporels triangulaires avec une augmentation/diminution instantanée de la température, du fait du temps de réponse du dispositif et de l'inertie thermique de l'incubateur. Conséquemment, une dose thermique donnée qui serait portée par ces profils est aussi très difficile à obtenir. Nous avons donc entamé le processus de validation expérimentale de l'effet d'asymétrie par une réduction de la pente des rampes de montée et de descente de température dans les deux profils triangulaires de l'étude, tout en gardant la même dose thermique utilisée dans les simulations.

Par la suite, la réponse du dispositif expérimental a été modélisée en prenant en compte son temps de réponse et le décalage entre la température de consigne et la température mesurée par thermistance causé par les effets de diffusion thermique et dépendant de la température de la salle. Ceci conduit à une simple équation de changement de température du type :

$$\tau_{EXP} \frac{dT_{EXP}}{dt} = T_{CTRL} + T_{Offset} - T_{EXP} \quad (\text{C.2})$$

où T_{EXP} désigne la température obtenue expérimentalement, T_{CTRL} la température de consigne, et T_{Offset} le décalage entre les deux. τ_{EXP} représente le temps de réponse (échelle de temps).

La simulation de la variation de température en fonction de ces paramètres permet de prédire avec une précision suffisante la forme temporelle du stress et la dose thermique qui seraient expérimentalement obtenues pour un fichier consigne donné. Il nous était ainsi possible de modifier le fichier consigne pour obtenir le résultat ciblé. La figure (C.1) montre une comparaison

entre les profils temporels du stress obtenus expérimentalement et par simulation (équation C.2).

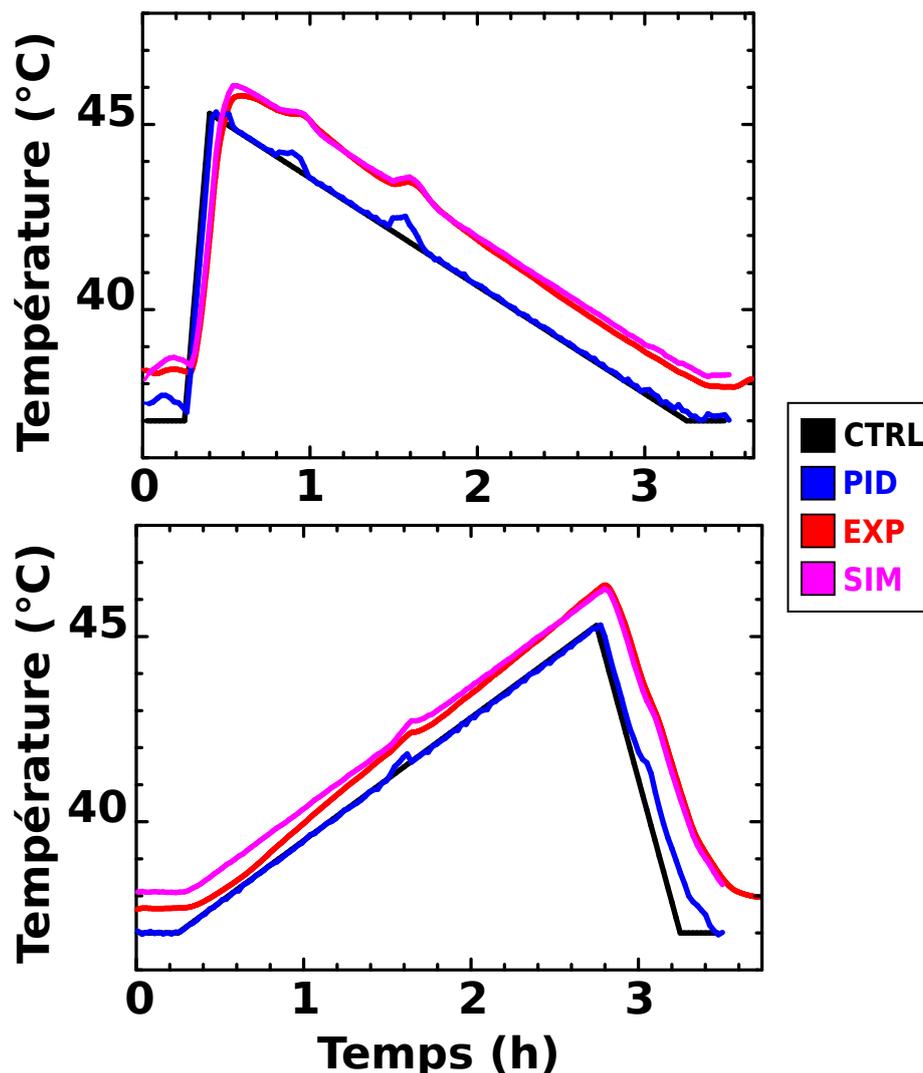


FIGURE C.1 – **Simulation de la réponse du dispositif expérimental.** La température qui serait expérimentalement obtenue et correspondante à une consigne (courbe noire) est simulée à l'aide de l'équation (C.2) (courbe magenta). Une fois que les expérimentations sont réalisées avec la même consigne (courbe noire), nous obtenons la température mesurée par la thermistance qui est représentée par la courbe rouge, et la température appliquée par le PID à partir de la consigne (courbe bleue).

Bien évidemment, les mesures de température par la thermistance issues des expérimentations sont utilisées dans la détermination de la dose thermique CEM_{43} appliquée correspondante à chaque profil temporel, pour s'assurer que les cellules ont été exposées à des doses similaires. Il est cependant à noter que si la dose thermique du profil triangulaire à montée lente excède celle du profil à montée rapide, néanmoins dans une limite telle que le premier profil serait toujours moins létal que le second, cela n'altérerait en aucun cas les résultats concernant l'effet d'asymétrie présenté.

Annexe D

Régulation transcriptionnelle

Dans une cellule, l'expression des gènes est un processus vital qui implique diverses réactions moléculaires allant de l'activation d'un régulateur à la synthèse de la protéine cible, en passant par la transcription. Le procédé de transcription est régulé par des activateurs et des inhibiteurs, appelés facteurs de transcription, qui, une fois activés, peuvent contrôler l'expression des gènes, et donc le taux de synthèse et la quantité des protéines cibles. Cette régulation est possible via la modulation de l'activité de l'*ARN-polymérase* [219]. La régulation transcriptionnelle permet en effet de lancer la production de certaines protéines uniquement au moment où la cellule en a besoin (pour répondre au choc thermique par exemple), comme elle permet de stopper cette production quand elle devient inutilement coûteuse en énergie.

D.1 Activateurs de transcription

Les activateurs de transcription sont des protéines qui se lient spécifiquement à des séquences de *ADN* en amont des promoteurs de leurs protéines cibles pour activer la production de ces dernières. Les activateurs de transcription sont composés de deux domaines principaux : un domaine de liaison spécifique à une séquence *ADN*, et un domaine d'activation de la transcription via une interaction avec la machinerie transcriptionnelle [219]. A titre d'exemple, dans la réponse cellulaire au stress thermique que nous avons étudié, le facteur de transcription *HSF1* active la production des chaperons *HSP* pour réparer les protéines dénaturées, ce processus permet d'accélérer la réponse cellulaire en augmentant le taux de synthèse des chaperons.

D.2 Inhibiteurs de transcription

Contrairement aux activateurs, les inhibiteurs de transcription se lient spécifiquement à des séquences *ADN* pour empêcher l'expression des gènes cibles en bloquant la liaison de l'*ARN-polymérase* et des activateurs de transcription, diminuant ainsi le taux de synthèse des protéines cibles. Ces inhibiteurs sont évidemment composés d'un domaine de liaison spécifique, et certains d'entre eux (appelés inhibiteurs actifs) comportent en plus un domaine actif qui leur permet de réaliser des interactions protéine-protéine avec la machinerie transcriptionnelle [219]. La liaison d'un inhibiteur aux séquences *ADN* peut cependant être empêchée sous l'action des inducteurs [220] qui vont les séquestrer.

D.3 Activation des facteurs de transcription

Pour que les facteurs de transcription présents dans le cytosol, qu'ils soient activateurs ou inhibiteurs, puissent moduler l'expression de leurs gènes cibles, il faut qu'ils soient préalablement activés. Leur activation est possible par le biais de modifications post-traductionnelles d'échelles

de temps relativement rapides, telles que la phosphorylation, l'acétylation, la SUMOylation et l'ubiquitylation [221], qui vont conduire à leur translocation au noyau où ils peuvent réaliser leurs actions de régulation. Ceci-dit, d'autres mécanismes peuvent réguler l'activation des facteurs de transcription, nous pouvons prendre l'exemple de *HSF1* qui se trouve séquestré par sa protéine cible *HSP70* dans les conditions normales en absence de stress et qui ne peut donc être activé. Si la cellule est exposée à un choc thermique, le *HSF1* est libéré avant de subir les modifications post-traductionnelles permettant sa translocation au noyau.

Annexe E

Non-linéarité dans les systèmes biologiques

La non-linéarité est une caractéristique fondamentale des systèmes biologiques résultant des diverses topologies des motifs qu'ils comportent. Cette propriété complique leur étude mais la rend plus intéressante. En effet, elle permet à ces systèmes d'avoir un large panel de comportements en réponse aux divers stimuli auxquels ils sont exposés. Nous nous limitons ici uniquement à deux facettes des comportements non-linéaires qui sont constatées dans plusieurs processus biologique : le mécanisme de saturation, et le mécanisme de seuil.

E.1 Mécanisme de saturation

Dans le premier mécanisme, une saturation hyperbolique fait que le taux d'augmentation de la réponse diminue en fonction d'un signal croissant en s'approchant d'une valeur asymptotique (Fig. E.1), cette saturation témoigne de l'aspect limité des différentes ressources cellulaires. Nous avons centré notre modèle réduit de la réponse au choc thermique sur ce mécanisme, où l'augmentation de la concentration des protéines dénaturées due au stress sature les ressources de réparation de la cellule (chapitre 3).

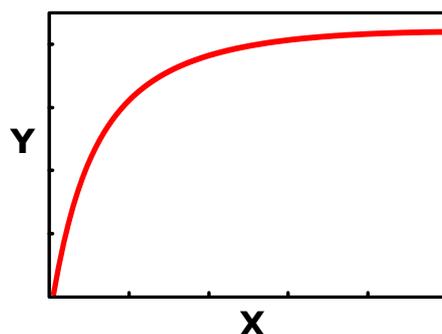


FIGURE E.1 – **Mécanisme de saturation dans les systèmes biologiques.** Le taux de croissance de la réponse Y décroît quand le signal X augmente, la réponse approche ainsi une valeur asymptotique.

E.2 Mécanisme de seuil

D'autre part, le mécanisme de seuil désigne un comportement dans lequel la réponse du système est très sensible au changement du signal dans un intervalle spécifique, et qui peut être décrite par une fonction sigmoïde (Fig. E.2) : la réponse augmente lentement en fonction du

signal croissant, puis brusquement une fois que le signal ait atteint un certain seuil, et montre finalement une saturation quand le signal continue de croître. Ce comportement a également été au centre de notre modèle de l'apoptose intrinsèque où la fraction de la $C3^*$ augmente brusquement une fois qu'un certain seuil de dommages est dépassé, basculant le système dans l'état de mort (chapitre 4).

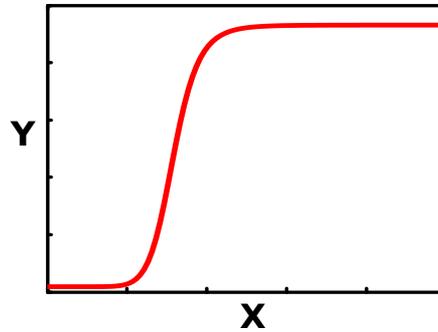
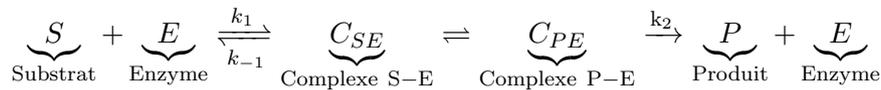


FIGURE E.2 – **Mécanisme de seuil dans les systèmes biologiques.** La réponse Y est très sensible au changement de signal X dans un intervalle spécifique et montre une augmentation brusque.

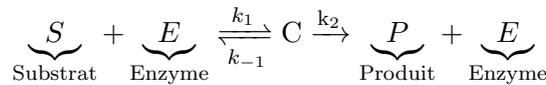
Annexe F

Fonction de Michaelis-Menten

La fonction de *Michaelis-Menten* décrit la cinétique d'une réaction impliquant une enzyme (catalyseur) et un substrat, donnant irréversiblement un produit, et avec l'hypothèse que ce dernier ne peut interagir avec l'enzyme. Plus précisément, cette équation permet de lier la vitesse de la réaction à la concentration du substrat en fonction des propriétés de l'enzyme [102]. Cette réaction biochimique se présente comme suit :



où k_1 , k_{-1} et k_2 sont les taux des différentes étapes de la réaction. En supposant que l'échelle de temps de conversion des complexes est rapide par rapport aux autres réactions, la réaction globale peut être simplifiée à :



En appliquant la loi d'action de masse, nous arrivons au systèmes d'équations différentielles suivant :

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}S(t) &= -k_1 S(t) E(t) + k_{-1} C(t) \\ \frac{d}{dt}E(t) &= k_{-1} C(t) - k_1 S(t) E(t) + k_2 C(t) \\ \frac{d}{dt}C(t) &= -k_{-1} C(t) + k_1 S(t) E(t) - k_2 C(t) \\ \frac{d}{dt}P(t) &= k_2 C(t) \end{aligned} \tag{F.1}$$

Nous posons ($E_T = E(t) + C(t)$), représentant la concentration totale de l'enzyme qui reste constante vu que l'enzyme est conservée tout au long de la réaction. En effectuant le changement ($E(t) = E_T - C(t)$), il est possible d'éliminer l'équation différentielle de la concentration de l'enzyme, et le système précédent devient :

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}S(t) &= -k_1 S(t) (E_T - C(t)) + k_{-1} C(t) \\ \frac{d}{dt}C(t) &= -k_{-1} C(t) + k_1 S(t) (E_T - C(t)) - k_2 C(t) \\ \frac{d}{dt}P(t) &= k_2 C(t) \end{aligned} \tag{F.2}$$

Pour l'analyse de ce système, *Michaelis* et *Menten* ont considéré que le substrat S atteint instantanément l'équilibre avec le complexe C [222]. Une autre manière de faire revient à estimer

que la concentration du complexe intermédiaire $C(t)$ ne varie pas sur l'échelle de temps de formation du produit [223], le complexe est donc supposé dans un état quasi-stationnaire $C(t) = C_{QS}(t)$ impliquant $\frac{d}{dt}C(t) = 0$. Ceci donne que :

$$-k_{-1} C_{QS}(t) + k_1 S(t) (E_T - C_{QS}(t)) - k_2 C_{QS}(t) = 0 \quad (\text{F.3})$$

Et donc :

$$C_{QS}(t) = \frac{k_1 E_T S(t)}{k_{-1} + k_2 + k_1 S(t)} \quad (\text{F.4})$$

En injectant cette dernière équation dans le système (F.2), nous obtenons :

$$\frac{d}{dt}S(t) = -\frac{k_2 k_1 E_T S(t)}{k_{-1} + k_2 + k_1 S(t)} \quad (\text{F.5})$$

$$\frac{d}{dt}P(t) = \frac{k_2 k_1 E_T S(t)}{k_{-1} + k_2 + k_1 S(t)} \quad (\text{F.6})$$

Finalement, en posant $V_{max} = k_2 E_T$ (vitesse maximale de la réaction) et $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ (constante de demi-saturation), nous arrivons à l'équation de *Michaelis-Menten* décrivant la vitesse de la réaction $S \rightarrow P$:

$$V = \frac{d}{dt}P = \frac{V_{max} S}{K_M + S} \quad (\text{F.7})$$

Nous avons utilisé cette fonction dans le modèle *RRCT* pour définir la vitesse du procédé de renaturation des protéines dénaturées *MFP* par les chaperons *HSP* (chapitre 2 et annexe A) :

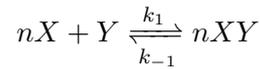
$$V_{Renat} = \frac{k_r [MFP : HSP]}{K_M + [MFP : HSP]} \quad (\text{F.8})$$

L'allure de la courbe de la vitesse de réaction V en fonction de la concentration du substrat S est celle présentée dans l'annexe E pour le mécanisme de saturation (Fig. E.1).

Annexe G

Coopérativité et équation de Hill

Si une enzyme est composée de plusieurs sous-unités, la liaison de l'une d'elle sur un des sites d'un substrat, peut modifier l'affinité de liaison des autres sous-unités aux sites de ce substrat. Ce phénomène est communément appelé coopérativité. Dans la régulation transcriptionnelle, l'activité maximale d'un facteur de transcription est atteinte quand toutes les sous-unités du facteur sont liées aux sites cibles. Il est possible de modéliser ce processus en décrivant l'association d'une molécule X , comportant n sous-unités, à un substrat Y [224] :



L'équation différentielle décrivant l'évolution temporelle du complexe nXY est obtenue par la loi d'action de masse et s'écrit :

$$\frac{d}{dt}[nXY] = k_1 [Y] [X]^n - k_{-1} [nXY] \quad (\text{G.1})$$

En supposant que l'interaction atteint l'équilibre rapidement, le complexe nXY peut être considéré comme étant dans un état quasi-stationnaire, et donc :

$$k_1 [Y] [X]^n = k_{-1} [nXY] \quad (\text{G.2})$$

En introduisant $Y_T = Y + nXY$ (quantité totale de Y), l'équation précédente devient :

$$Y^* = \frac{[nXY]}{Y_T} = \frac{[X]^n}{K^n + [X]^n} \quad (\text{G.3})$$

où Y^* représente la fraction liée de Y , et $K^n = \frac{k_{-1}}{k_1}$.

Cette équation est connue sous le nom d'équation de *Hill*, et montre un comportement de sigmoïde si le paramètre n , appelé coefficient de *Hill*, est supérieur à 1 (Fig. E.2). Par ailleurs, si $n = 1$, nous obtenons la cinétique définie par l'équation de *Michaelis-Menten* (Fig. E.1). Le coefficient n peut être vu comme un indicateur de l'ultrasensibilité de Y^* en fonction de X (la raideur de la courbe augmente quand n augmente).

L'équation de *Hill* a été utilisée dans le modèle *RRCT* pour décrire la dynamique du processus de régulation transcriptionnelle des chaperons par leur facteur de transcription *HSF1*. En effet, le taux de transcription régulée a été défini comme étant :

$$\mu_{Tr} = \lambda_{HSP} \frac{[HSF1]^3}{P_0^3 + [HSF1]^3} \quad (\text{G.4})$$

où λ_{HSP} est le taux maximal de transcription régulée. Le coefficient n est fixé à 3 pour tenir compte de la trimérisation de *HSF1* nécessaire à son opérationnalité régulatoire.

Annexe H

Publications

- **"Dynamical thermal dose models and dose time-profile effects"**

M. T. Ladjimi, D. Labavić, M. Guilbert, F. Anquez, A. Pruvost, E. Courtade, B. Pfeuty and Q. Thommen

International Journal of Hyperthermia (2019)

Abstract :

Models of dose-effect relationships seek systematic and predictive descriptions of how cell survival depends on the level and duration of the stressor. The CEM43 thermal dose model has been empirically derived more than thirty years ago and still serves as a benchmark for hyperthermia protocols despite the advent of regulatory network models. In this paper, we propose and realize a simple experimental test to assess whether mechanistic models can prove more reliable indicators for some protocols. We define two time-asymmetric hyperthermia profiles, faster rise than decay or slower rise than decay, for which the CEM43 model predicts the same survival while a regulatory network model predicts significant differences. Survival experiments of HeLa cells show that a fast temperature rise followed by a slow decay can be twice more lethal than the opposite, consistently with the prediction of the network model. Using a model reduction approach, we obtained a simple nonlinear dynamic equation that identifies the limited repair capacity as the main factor underlying the dose-asymmetry effect and that could be useful for refining thermal doses for dynamic protocols.

- **"Scaling laws of cell-fate responses to transient stress"**

D. Labavić, M. T. Ladjimi, Q. Thommen and B. Pfeuty

Journal of Theoretical Biology (2019)

Abstract :

Analysis and modelling of dose-survival curves of cells and tissues are often used to assess therapeutic efficacy or environmental risks, much less to infer the intracellular regulatory mechanisms of cellular stress response. However, systematic measurements of how cell survival depends on the time profile of stress, such as exposure duration, provide practical means to decipher the homeostatic dynamics of stress-response regulatory networks. In this paper, we propose a dynamical framework to theoretically address the relationship between cell fate response to a transient stress and the underlying regulatory feedback mechanisms. A simple network topology that couples a homeostatic negative feedback and a death-triggering positive feedback is shown to display four response regimes for which the iso-effect relationships between duration and intensity are captured by specific power laws. These distinct response regimes define several windows of stress duration for which lethality is not merely proportional to the product of intensity and duration, and, thus, for which cells are either more tolerant or more vulnerable to a given dose. Overall, this study highlights the differential roles of feedback strength, timescale and nonlinearity in promoting survivability to particular stress profiles, providing a valuable framework for a comparative analysis of diverse stress-specific regulatory networks.

Bibliographie

- [1] E. W. Gerner, R. Boone, W. G. Connor, J. A. Hicks, and M. L. Boone, “A transient thermotolerant survival response produced by single thermal doses in hela cells,” *Cancer research*, vol. 36, no. 3, pp. 1035–1040, 1976.
- [2] J. van der Zee, Z. Vujaskovic, M. Kondo, and T. Sugahara, “The kadota fund international forum 2004—clinical group consensus,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 24, no. 2, pp. 111–122, 2008.
- [3] M. Falk and R. Issels, “Hyperthermia in oncology,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 17, no. 1, pp. 1–18, 2001.
- [4] E. C. Halperin, L. W. Brady, C. A. Perez, and D. E. Wazer, *Perez & Brady’s principles and practice of radiation oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- [5] R. Burdon, “Thermotolerance and the heat shock proteins.,” in *Symposia of the Society for Experimental Biology*, vol. 41, pp. 269–283, 1987.
- [6] M. Hurwitz and P. Stauffer, “Hyperthermia, radiation and chemotherapy : the role of heat in multidisciplinary cancer care,” in *Seminars in oncology*, vol. 41, pp. 714–729, Elsevier, 2014.
- [7] M. R. Horsman and J. Overgaard, “Hyperthermia : a potent enhancer of radiotherapy,” *Clinical oncology*, vol. 19, no. 6, pp. 418–426, 2007.
- [8] J. J. Skitzki, E. A. Repasky, and S. S. Evans, “Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer,” *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, vol. 10, no. 6, p. 550, 2009.
- [9] N. Datta, S. G. Ordóñez, U. Gaipl, M. Paulides, H. Crezee, J. Gellermann, D. Marder, E. Puric, and S. Bodis, “Local hyperthermia combined with radiotherapy and-/or chemotherapy : Recent advances and promises for the future,” *Cancer treatment reviews*, vol. 41, no. 9, pp. 742–753, 2015.
- [10] M. W. Dewhirst, Z. Vujaskovic, E. Jones, and D. Thrall, “Re-setting the biologic rationale for thermal therapy,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 21, no. 8, pp. 779–790, 2005.
- [11] J. Hettinga, A. Konings, and H. Kampinga, “Reduction of cellular cisplatin resistance by hyperthermia—a review,” *International journal of hyperthermia*, vol. 13, no. 5, pp. 439–457, 1997.
- [12] A. G. van der Heijden and M. W. Dewhirst, “Effects of hyperthermia in neutralising mechanisms of drug resistance in non-muscle-invasive bladder cancer,” *International journal of hyperthermia*, vol. 32, no. 4, pp. 434–445, 2016.
- [13] J. Overgaard and H. D. Suit, “Time-temperature relationship in hyperthermic treatment of malignant and normal tissue in vivo,” *Cancer Research*, vol. 39, no. 8, pp. 3248–3253, 1979.
- [14] W. C. Dewey, “Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic,” *International journal of hyperthermia*, vol. 25, no. 1, pp. 3–20, 2009.

- [15] S. A. Sapareto, L. E. Hopwood, W. C. Dewey, M. R. Raju, and J. W. Gray, "Effects of hyperthermia on survival and progression of chinese hamster ovary cells," *Cancer research*, vol. 38, no. 2, pp. 393–400, 1978.
- [16] S. A. Sapareto and W. C. Dewey, "Thermal dose determination in cancer therapy," *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 10, no. 6, pp. 787–800, 1984.
- [17] K. A. Leopold, M. Dewhurst, T. Samulski, J. Harrelson, J. A. Tucker, S. L. George, R. K. Dodge, W. Grant, S. Clegg, L. R. Prosnitz, *et al.*, "Relationships among tumor temperature, treatment time, and histopathological outcome using preoperative hyperthermia with radiation in soft tissue sarcomas," *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 22, no. 5, pp. 989–998, 1992.
- [18] J. R. Oleson, T. V. Samulski, K. A. Leopold, S. T. Clegg, M. W. Dewhurst, R. K. Dodge, and S. L. George, "Sensitivity of hyperthermia trial outcomes to temperature and time : implications for thermal goals of treatment," *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 25, no. 2, pp. 289–297, 1993.
- [19] K. A. Leopold, M. W. Dewhurst, T. V. Samulski, R. K. Dodge, S. L. George, J. L. Blivin, L. R. Prosnitz, and J. R. Oleson, "Cumulative minutes with t90 greater than tempindex is predictive of response of superficial malignancies to hyperthermia and radiation," *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 25, no. 5, pp. 841–847, 1993.
- [20] M. Murbach, E. Neufeld, M. Capstick, W. Kainz, D. O. Brunner, T. Samaras, K. P. Pruessmann, and N. Kuster, "Thermal tissue damage model analyzed for different whole-body sar and scan durations for standard mr body coils," *Magnetic resonance in medicine*, vol. 71, no. 1, pp. 421–431, 2014.
- [21] L. F. F. LG, "Pathological effects of hyperthermia in normal tissues," *Cancer research*, vol. 44, no. 10 Supplement, pp. 4826s–4835s, 1984.
- [22] J. Overgaard, "Some problems related to the clinical use of thermal isoeffect doses," *International journal of hyperthermia*, vol. 3, no. 4, pp. 329–336, 1987.
- [23] G. M. Hahn and G. C. Li, "Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells," *Radiation Research*, vol. 92, no. 3, pp. 452–457, 1982.
- [24] K. D. Bauer and K. J. Henle, "Arrhenius analysis of heat survival curves from normal and thermotolerant cho cells," *Radiation Research*, vol. 78, no. 2, pp. 251–263, 1979.
- [25] L. E. Gerweck, M. Jennings, and B. Richards, "Influence of ph on the response of cells to single and split doses of hyperthermia," *Cancer research*, vol. 40, no. 11, pp. 4019–4024, 1980.
- [26] M. L. Freeman, G. P. Raaphorst, L. E. Hopwood, and W. C. Dewey, "The effect of ph on cell lethality induced by hyperthermic treatment," *Cancer*, vol. 45, no. 9, pp. 2291–2300, 1980.
- [27] E. M. Goldin and D. B. Leeper, "The effect of low ph on thermotolerance induction using fractionated 45° c hyperthermia," *Radiation research*, vol. 85, no. 3, pp. 472–479, 1981.
- [28] M. A. Mackey and W. C. Dewey, "Time-temperature analyses of cell killing of synchronous g1 and s phase chinese hamster cells in vitro," *Radiation research*, vol. 113, no. 2, pp. 318–333, 1988.
- [29] H. Park, S. Han, S. Oh, and H. Kang, "Cellular responses to mild heat stress," *Cellular and Molecular Life Sciences Cmls*, vol. 62, no. 1, pp. 10–23, 2005.
- [30] R. I. Morimoto, M. P. Kline, D. N. Bimston, and J. J. Cotto, "The heat-shock response : regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones.," *Essays in biochemistry*, vol. 32, pp. 17–29, 1997.

- [31] K. Richter, M. Haslbeck, and J. Buchner, "The heat shock response : life on the verge of death," *Molecular cell*, vol. 40, no. 2, pp. 253–266, 2010.
- [32] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, and H. Riess, "The cellular and molecular basis of hyperthermia," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 43, pp. 33–56, July 2002.
- [33] K. A. Dill, "Dominant forces in protein folding," *Biochemistry*, vol. 29, no. 31, pp. 7133–7155, 1990.
- [34] J. Díaz-Villanueva, R. Díaz-Molina, and V. García-González, "Protein folding and mechanisms of proteostasis," *International journal of molecular sciences*, vol. 16, no. 8, pp. 17193–17230, 2015.
- [35] M. L. Cain, C. K. Yoon, and A. Singh-Cundy, *Discover Biology : Core Topics*. Norton, 2009.
- [36] B. Rosenberg, G. Kemeny, R. C. Switzer, and T. C. Hamilton, "Quantitative evidence for protein denaturation as the cause of thermal death," *Nature*, vol. 232, no. 5311, p. 471, 1971.
- [37] W. Dewey, "The search for critical cellular targets damaged by heat," *Radiation research*, vol. 120, no. 2, pp. 191–204, 1989.
- [38] A. Wytttenbach and A. P. Arrigo, "The role of heat shock proteins during neurodegeneration in alzheimer's, parkinson's and huntington's disease," in *Heat shock proteins in neural cells*, pp. 81–99, Springer, 2009.
- [39] R. I. Morimoto, "The heat shock response : systems biology of proteotoxic stress in aging and disease," in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 76, pp. 91–99, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
- [40] Q. Fu, J. Wang, and T. Huang, "The effect of hyperthermia on the dna damage response induced by γ -rays, as determined through in situ cell tracking," *Journal of radiation research*, vol. 59, no. 5, pp. 577–582, 2018.
- [41] A. L. Oei, L. E. Vriend, J. Crezee, N. A. Franken, and P. M. Krawczyk, "Effects of hyperthermia on dna repair pathways : one treatment to inhibit them all," *Radiation Oncology*, vol. 10, no. 1, p. 165, 2015.
- [42] R. L. Wartens and K. J. Henle, "Dna degradation in chinese hamster ovary cells after exposure to hyperthermia," *Cancer research*, vol. 42, no. 11, pp. 4427–4432, 1982.
- [43] O. Kantidze, A. Velichko, A. Luzhin, and S. Razin, "Heat stress-induced dna damage," *Acta Naturae*, vol. 8, no. 2 (29), 2016.
- [44] D. Whitley, S. P. Goldberg, and W. D. Jordan, "Heat shock proteins : a review of the molecular chaperones," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 29, no. 4, pp. 748–751, 1999.
- [45] Z. Li and P. Srivastava, "Heat-shock proteins," *Current protocols in immunology*, vol. 58, no. 1, pp. A–1T, 2003.
- [46] A. Yu, P. Li, T. Tang, J. Wang, Y. Chen, and L. Liu, "Roles of hsp70s in stress responses of microorganisms, plants, and animals," *BioMed research international*, vol. 2015, 2015.
- [47] B. Kalmar and L. Greensmith, "Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 61, no. 4, pp. 310–318, 2009.
- [48] K. Liberek, A. Lewandowska, and S. Ziętkiewicz, "Chaperones in control of protein disaggregation," *The EMBO journal*, vol. 27, no. 2, pp. 328–335, 2008.
- [49] S. Lindquist, "The heat-shock response," *Annual review of biochemistry*, vol. 55, no. 1, pp. 1151–1191, 1986.
- [50] J. Landry, D. Bernier, P. Chrétien, L. M. Nicole, R. M. Tanguay, and N. Marceau, "Synthesis and Degradation of Heat Shock Proteins during Development and Decay of Thermotolerance," *Cancer Research*, vol. 42, pp. 2457–2461, June 1982.

- [51] C. Garrido, M. Brunet, C. Didelot, Y. Zermati, E. Schmitt, and G. Kroemer, “Heat shock proteins 27 and 70 : anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties,” *Cell cycle*, vol. 5, no. 22, pp. 2592–2601, 2006.
- [52] A. R. Goloudina, O. N. Demidov, and C. Garrido, “Inhibition of hsp70 : a challenging anti-cancer strategy,” *Cancer letters*, vol. 325, no. 2, pp. 117–124, 2012.
- [53] S. Chatterjee and T. Burns, “Targeting heat shock proteins in cancer : a promising therapeutic approach,” *International journal of molecular sciences*, vol. 18, no. 9, p. 1978, 2017.
- [54] A. Vihervaara and L. Sistonen, “Hsf1 at a glance,” 2014.
- [55] K. J. Henle and D. B. Leeper, “Effects of Hyperthermia (45°) on Macromolecular Synthesis in Chinese Hamster Ovary Cells,” *Cancer Research*, vol. 39, pp. 2665–2674, July 1979.
- [56] H. El Samad, M. Khammash, C. Homescu, and L. Petzold, “Optimal performance of the heat-shock gene regulatory network,” *IFAC Proceedings Volumes*, vol. 38, no. 1, pp. 19–24, 2005.
- [57] S. Dayalan Naidu and A. T. Dinkova-Kostova, “Regulation of the mammalian heat shock factor 1,” *The FEBS journal*, vol. 284, no. 11, pp. 1606–1627, 2017.
- [58] N. D. Trinklein, J. I. Murray, S. J. Hartman, D. Botstein, and R. M. Myers, “The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response,” *Molecular biology of the cell*, vol. 15, no. 3, pp. 1254–1261, 2004.
- [59] C. Pfeffer and A. Singh, “Apoptosis : a target for anticancer therapy,” *International journal of molecular sciences*, vol. 19, no. 2, p. 448, 2018.
- [60] S. Baig, I. Seevasant, J. Mohamad, A. Mukheem, H. Huri, and T. Kamarul, “Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research : Where do we stand?,” *Cell death & disease*, vol. 7, no. 1, p. e2058, 2017.
- [61] S. Kasibhatla and B. Tseng, “Why target apoptosis in cancer treatment?,” *Molecular cancer therapeutics*, vol. 2, no. 6, pp. 573–580, 2003.
- [62] A. Samali, C. I. Holmberg, L. Sistonen, and S. Orrenius, “Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress : dependence on heat shock proteins,” *FEBS letters*, vol. 461, no. 3, pp. 306–310, 1999.
- [63] S. L. Fink and B. T. Cookson, “Apoptosis, pyroptosis, and necrosis : mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells,” *Infection and immunity*, vol. 73, no. 4, pp. 1907–1916, 2005.
- [64] P. Davidovich, C. J. Kearney, and S. J. Martin, “Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis,” *Biological chemistry*, vol. 395, no. 10, pp. 1163–1171, 2014.
- [65] S. Elmore, “Apoptosis : a review of programmed cell death,” *Toxicologic pathology*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007.
- [66] A. Shamas-Din, H. Brahmabhatt, B. Leber, and D. W. Andrews, “Bcl2-only proteins : Orchestrators of apoptosis,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1813, no. 4, pp. 508–520, 2011.
- [67] S. Cory and J. M. Adams, “The bcl2 family : regulators of the cellular life-or-death switch,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 9, p. 647, 2002.
- [68] T. Zhang, P. Brazhnik, and J. J. Tyson, “Computational analysis of dynamical responses to the intrinsic pathway of programmed cell death,” *Biophysical journal*, vol. 97, no. 2, pp. 415–434, 2009.
- [69] E. Fujita, J. Egashira, K. Urabe, K. Kuida, and T. Momoi, “Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo,” *Cell death and differentiation*, vol. 8, no. 4, p. 335, 2001.

- [70] A. G. Porter and R. U. Jänicke, “Emerging roles of caspase-3 in apoptosis,” *Cell death and differentiation*, vol. 6, no. 2, p. 99, 1999.
- [71] R. U. Jänicke, M. L. Sprengart, M. R. Wati, and A. G. Porter, “Caspase-3 is required for dna fragmentation and morphological changes associated with apoptosis,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 16, pp. 9357–9360, 1998.
- [72] S. B. Bratton, G. Walker, S. M. Srinivasula, X.-M. Sun, M. Butterworth, E. S. Alnemri, and G. M. Cohen, “Recruitment, activation and retention of caspases-9 and-3 by apaf-1 apoptosome and associated xiap complexes,” *The EMBO journal*, vol. 20, no. 5, pp. 998–1009, 2001.
- [73] S. Bratton, J. Lewis, M. Butterworth, C. Duckett, and G. Cohen, “Xiap inhibition of caspase-3 preserves its association with the apaf-1 apoptosome and prevents cd95-and bax-induced apoptosis,” *Cell death and differentiation*, vol. 9, no. 9, p. 881, 2002.
- [74] J.-B. Denault, B. P. Eckelman, H. Shin, C. Pop, and G. S. Salvesen, “Caspase 3 attenuates xiap (x-linked inhibitor of apoptosis protein)–mediated inhibition of caspase 9,” *Biochemical Journal*, vol. 405, no. 1, pp. 11–19, 2007.
- [75] E. N. Shiozaki and Y. Shi, “Caspases, iaps and smac/diablo : mechanisms from structural biology,” *Trends in biochemical sciences*, vol. 29, no. 9, pp. 486–494, 2004.
- [76] R. M. Locksley, N. Killeen, and M. J. Lenardo, “The tnf and tnf receptor superfamilies : integrating mammalian biology,” *Cell*, vol. 104, no. 4, pp. 487–501, 2001.
- [77] H. Walczak, “Death receptor–ligand systems in cancer, cell death, and inflammation,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 5, no. 5, p. a008698, 2013.
- [78] M. Irmeler, M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.-L. Bodmer, M. Schröter, K. Burns, C. Mattmann, *et al.*, “Inhibition of death receptor signals by cellular flip,” *Nature*, vol. 388, no. 6638, p. 190, 1997.
- [79] S. Legewie, N. Blüthgen, and H. Herzog, “Mathematical modeling identifies inhibitors of apoptosis as mediators of positive feedback and bistability,” *PLoS computational biology*, vol. 2, no. 9, p. e120, 2006.
- [80] S. Fulda and K.-M. Debatin, “Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy,” *Oncogene*, vol. 25, no. 34, p. 4798, 2006.
- [81] C. Kantari and H. Walczak, “Caspase-8 and bid : caught in the act between death receptors and mitochondria,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1813, no. 4, pp. 558–563, 2011.
- [82] L. Galluzzi and G. Kroemer, “Necroptosis : a specialized pathway of programmed necrosis,” *Cell*, vol. 135, no. 7, pp. 1161–1163, 2008.
- [83] L. Ouyang, Z. Shi, S. Zhao, F.-T. Wang, T.-T. Zhou, B. Liu, and J.-K. Bao, “Programmed cell death pathways in cancer : a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis,” *Cell proliferation*, vol. 45, no. 6, pp. 487–498, 2012.
- [84] Q. Chen, J. Kang, and C. Fu, “The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis,” *Signal transduction and targeted therapy*, vol. 3, no. 1, p. 18, 2018.
- [85] M. Leist, B. Single, A. F. Castoldi, S. Kühnle, and P. Nicotera, “Intracellular adenosine triphosphate (atp) concentration : a switch in the decision between apoptosis and necrosis,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 185, no. 8, pp. 1481–1486, 1997.
- [86] M. Kaern, T. C. Elston, W. J. Blake, and J. J. Collins, “Stochasticity in gene expression : from theories to phenotypes,” *Nature Reviews. Genetics*, vol. 6, pp. 451–464, June 2005.
- [87] R. Wang, “Noise, Intrinsic and Extrinsic,” in *Encyclopedia of Systems Biology* (W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho, and H. Yokota, eds.), pp. 1527–1527, New York, NY : Springer New York, 2013.

- [88] M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia, and P. S. Swain, “Stochastic Gene Expression in a Single Cell,” *Science*, vol. 297, pp. 1183–1186, Aug. 2002.
- [89] M. Niepel, S. L. Spencer, and P. K. Sorger, “Non-genetic cell-to-cell variability and the consequences for pharmacology,” *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 13, pp. 556–561, Dec. 2009.
- [90] N. Friedman, L. Cai, and X. S. Xie, “Linking stochastic dynamics to population distribution : an analytical framework of gene expression,” *Physical Review Letters*, vol. 97, p. 168302, Oct. 2006.
- [91] R. P. Das Neves, N. S. Jones, L. Andreu, R. Gupta, T. Enver, and F. J. Iborra, “Connecting variability in global transcription rate to mitochondrial variability,” *PLoS biology*, vol. 8, no. 12, p. e1000560, 2010.
- [92] I. G. Johnston, B. Gaal, R. P. das Neves, T. Enver, F. J. Iborra, and N. S. Jones, “Mitochondrial variability as a source of extrinsic cellular noise,” *PLoS computational biology*, vol. 8, no. 3, p. e1002416, 2012.
- [93] S. Márquez-Jurado, J. Díaz-Colunga, R. P. Neves, A. Martínez-Lorente, F. Almazán, R. Guantes, and F. J. Iborra, “Mitochondrial levels determine variability in cell death by modulating apoptotic gene expression,” *Nature communications*, vol. 9, no. 1, p. 389, 2018.
- [94] M. Guilbert, F. Anquez, A. Pruvost, Q. Thommen, and E. Courtade, “Protein level variability determines phenotypic heterogeneity in proteotoxic stress response,” *bioRxiv*, p. 646653, 2019.
- [95] M. A. Shah and G. K. Schwartz, “Cell cycle-mediated drug resistance : an emerging concept in cancer therapy,” *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 7, pp. 2168–2181, Aug. 2001.
- [96] K. A. Beaumont, D. S. Hill, S. M. Daignault, G. Y. L. Lui, D. M. Sharp, B. Gabrielli, W. Weninger, and N. K. Haass, “Cell Cycle Phase-Specific Drug Resistance as an Escape Mechanism of Melanoma Cells,” *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 136, no. 7, pp. 1479–1489, 2016.
- [97] K. L. Milarski and R. I. Morimoto, “Expression of human hsp70 during the synthetic phase of the cell cycle,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83, no. 24, pp. 9517–9521, 1986.
- [98] A. L. Paek, J. C. Liu, A. Loewer, W. C. Forrester, and G. Lahav, “Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing,” *Cell*, vol. 165, pp. 631–642, Apr. 2016.
- [99] J. Roux, M. Hafner, S. Bandara, J. J. Sims, H. Hudson, D. Chai, and P. K. Sorger, “Fractional killing arises from cell-to-cell variability in overcoming a caspase activity threshold,” *Molecular systems biology*, vol. 11, no. 5, p. 803, 2015.
- [100] S. L. Spencer, S. Gaudet, J. G. Albeck, J. M. Burke, and P. K. Sorger, “Non-genetic origins of cell-to-cell variability in trail-induced apoptosis,” *Nature*, vol. 459, no. 7245, p. 428, 2009.
- [101] S. M. Mumenthaler, J. Foo, N. C. Choi, N. Heise, K. Leder, D. B. Agus, W. Pao, F. Michor, and P. Mallick, “The Impact of Microenvironmental Heterogeneity on the Evolution of Drug Resistance in Cancer Cells,” *Cancer Informatics*, vol. 14, pp. 19–31, July 2015.
- [102] B. Ingalls, “Mathematical modelling in systems biology : An introduction,” *Applied Mathematics, University of Waterloo*, 2012.
- [103] R. Thomas, “On the relation between the logical structure of systems and their ability to generate multiple steady states or sustained oscillations,” in *Numerical methods in the study of critical phenomena*, pp. 180–193, Springer, 1981.
- [104] J.-L. Gouzé, “Positive and negative circuits in dynamical systems,” *Journal of Biological Systems*, vol. 6, no. 01, pp. 11–15, 1998.

- [105] N. Rosenfeld, M. B. Elowitz, and U. Alon, “Negative autoregulation speeds the response times of transcription networks,” *Journal of molecular biology*, vol. 323, no. 5, pp. 785–793, 2002.
- [106] F. M. Camas, J. Blázquez, and J. F. Poyatos, “Autogenous and nonautogenous control of response in a genetic network,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 34, pp. 12718–12723, 2006.
- [107] B. Novák and J. J. Tyson, “Design principles of biochemical oscillators,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 9, no. 12, p. 981, 2008.
- [108] D. Nelson, A. Ihekweba, M. Elliott, J. Johnson, C. Gibney, B. Foreman, G. Nelson, V. See, C. Horton, D. Spiller, *et al.*, “Oscillations in $\text{nf-}\kappa\text{b}$ signaling control the dynamics of gene expression,” *Science*, vol. 306, no. 5696, pp. 704–708, 2004.
- [109] Y. T. Maeda and M. Sano, “Regulatory dynamics of synthetic gene networks with positive feedback,” *Journal of molecular biology*, vol. 359, no. 4, pp. 1107–1124, 2006.
- [110] J. E. Ferrell Jr, “Feedback loops and reciprocal regulation : recurring motifs in the systems biology of the cell cycle,” *Current opinion in cell biology*, vol. 25, no. 6, pp. 676–686, 2013.
- [111] J. E. Ferrell Jr, “Self-perpetuating states in signal transduction : positive feedback, double-negative feedback and bistability,” *Current opinion in cell biology*, vol. 14, no. 2, pp. 140–148, 2002.
- [112] K. H. Luk, R. M. Hulse, and T. L. Phillips, “Hyperthermia in cancer therapy,” *Western Journal of Medicine*, vol. 132, no. 3, p. 179, 1980.
- [113] P. Wust, B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix, and P. Schlag, “Hyperthermia in combined treatment of cancer,” *The lancet oncology*, vol. 3, no. 8, pp. 487–497, 2002.
- [114] I. Takahashi, Y. Emi, S. Hasuda, Y. Kakeji, Y. Maehara, and K. Sugimachi, “Clinical application of hyperthermia combined with anticancer drugs for the treatment of solid tumors,” *Surgery*, vol. 131, no. 1, pp. S78–S84, 2002.
- [115] J. van der Zee, D. González, G. C. van Rhoon, J. D. van Dijk, W. L. van Putten, A. A. Hart, *et al.*, “Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours : a prospective, randomised, multicentre trial,” *The Lancet*, vol. 355, no. 9210, pp. 1119–1125, 2000.
- [116] Y. Yagawa, K. Tanigawa, Y. Kobayashi, and M. Yamamoto, “Cancer immunity and therapy using hyperthermia with immunotherapy, radiotherapy, chemotherapy, and surgery,” *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, Volume, vol. 3, p. 219, 2017.
- [117] S. Toraya-Brown and S. Fiering, “Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 30, no. 8, pp. 531–539, 2014.
- [118] J. L. Roti Roti, “Cellular responses to hyperthermia (40–46 c) : Cell killing and molecular events,” *International Journal of hyperthermia*, vol. 24, no. 1, pp. 3–15, 2008.
- [119] R. I. Morimoto, “Regulation of the heat shock transcriptional response : cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators,” *Genes & development*, vol. 12, no. 24, pp. 3788–3796, 1998.
- [120] R. Voellmy, “On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells,” *Cell stress & chaperones*, vol. 9, no. 2, p. 122, 2004.
- [121] S. D. Naidu and A. T. Dinkova-Kostova, “Regulation of the mammalian heat shock factor 1,” *The FEBS journal*, vol. 284, no. 11, pp. 1606–1627, 2017.
- [122] A. Sivéry, E. Courtade, and Q. Thommen, “A minimal titration model of the mammalian dynamical heat shock response,” *Physical biology*, vol. 13, no. 6, p. 066008, 2016.

- [123] K. Sriram, M. Rodriguez-Fernandez, and F. J. Doyle III, “A detailed modular analysis of heat-shock protein dynamics under acute and chronic stress and its implication in anxiety disorders,” *PLoS one*, vol. 7, no. 8, p. e42958, 2012.
- [124] J. D. Scheff, J. D. Stallings, J. Reifman, and V. Rakesh, “Mathematical modeling of the heat-shock response in hela cells,” *Biophysical journal*, vol. 109, no. 2, pp. 182–193, 2015.
- [125] A. Peper, C. A. Grimbergen, J. Spaan, J. E. Souren, and R. V. Wijk, “A mathematical model of the hsp70 regulation in the cell,” *International journal of hyperthermia*, vol. 14, no. 1, pp. 97–124, 1998.
- [126] M. Stefani, “Protein misfolding and aggregation : new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, vol. 1739, no. 1, pp. 5–25, 2004.
- [127] A. Takahashi, N. Yamakawa, E. Mori, K. Ohnishi, S.-i. Yokota, N. Sugo, Y. Aratani, H. Koyama, and T. Ohnishi, “Development of thermotolerance requires interaction between polymerase- β and heat shock proteins,” *Cancer science*, vol. 99, no. 5, pp. 973–978, 2008.
- [128] E. Jones, D. Thrall, M. W. Dewhirst, and Z. Vujaskovic, “Prospective thermal dosimetry : The key to hyperthermia’s future,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 22, no. 3, pp. 247–253, 2006.
- [129] G. C. Van Rhoon, T. Samaras, P. S. Yarmolenko, M. W. Dewhirst, E. Neufeld, and N. Kuster, “Cem43° c thermal dose thresholds : a potential guide for magnetic resonance radio-frequency exposure levels?,” *European radiology*, vol. 23, no. 8, pp. 2215–2227, 2013.
- [130] T. S. Herman, E. W. Gerner, B. E. Magun, D. Stickney, C. C. Sweets, and D. M. White, “Rate of heating as a determinant of hyperthermic cytotoxicity,” *Cancer research*, vol. 41, no. 9 Part 1, pp. 3519–3523, 1981.
- [131] K. J. Henle and L. A. Dethlefsen, “Heat fractionation and thermotolerance : A review,” *Cancer research*, vol. 38, no. 7, pp. 1843–1851, 1978.
- [132] T. J. Snowden, P. H. van der Graaf, and M. J. Tindall, “Methods of model reduction for large-scale biological systems : a survey of current methods and trends,” *Bulletin of mathematical biology*, vol. 79, no. 7, pp. 1449–1486, 2017.
- [133] B. K. Bhuyan, “Kinetics of cell kill by hyperthermia,” *Cancer research*, vol. 39, no. 6 Part 2, pp. 2277–2284, 1979.
- [134] M. Mayer and B. Bukau, “Hsp70 chaperones : cellular functions and molecular mechanism,” *Cellular and molecular life sciences*, vol. 62, no. 6, p. 670, 2005.
- [135] M. V. Powers and P. Workman, “Inhibitors of the heat shock response : biology and pharmacology,” *FEBS letters*, vol. 581, no. 19, pp. 3758–3769, 2007.
- [136] J.-J. Leu, J. Pimkina, P. Pandey, M. E. Murphy, and D. L. George, “Hsp70 inhibition by the small-molecule 2-phenylethanesulfonamide impairs protein clearance pathways in tumor cells,” *Molecular Cancer Research*, vol. 9, no. 7, pp. 936–947, 2011.
- [137] G. M. Balaburski, I. Julia, J. Leu, N. Beeharry, S. Hayik, M. D. Andrade, G. Zhang, M. Herlyn, J. Villanueva, R. L. Dunbrack, *et al.*, “A modified hsp70 inhibitor shows broad activity as an anticancer agent,” *Molecular Cancer Research*, vol. 11, no. 3, pp. 219–229, 2013.
- [138] T. Miyagawa, H. Saito, Y. Minamiya, K. Mitobe, S. Takashima, N. Takahashi, A. Ito, K. Imai, S. Motoyama, and J. Ogawa, “Inhibition of hsp90 and 70 sensitizes melanoma cells to hyperthermia using ferromagnetic particles with a low curie temperature,” *International journal of clinical oncology*, vol. 19, no. 4, pp. 722–730, 2014.
- [139] R. J. Palzer and C. Heidelberger, “Studies on the quantitative biology of hyperthermic killing of hela cells,” *Cancer research*, vol. 33, no. 2, pp. 415–421, 1973.

- [140] L. Roizin-Towle and J. P. Pirro, "The response of human and rodent cells to hyperthermia," *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 20, no. 4, pp. 751–756, 1991.
- [141] Y. Feng, J. T. Oden, and M. N. Rylander, "A two-state cell damage model under hyperthermic conditions : theory and in vitro experiments," *Journal of biomechanical engineering*, vol. 130, no. 4, p. 041016, 2008.
- [142] E. A. Thompson, E. Graham, C. M. MacNeill, M. Young, G. Donati, E. M. Wailes, B. T. Jones, and N. H. Levi-Polyachenko, "Differential response of mcf7, mda-mb-231, and mcf 10a cells to hyperthermia, silver nanoparticles and silver nanoparticle-induced photothermal therapy," *International Journal of Hyperthermia*, vol. 30, no. 5, pp. 312–323, 2014.
- [143] M. W. Dewhirst, B. Viglianti, M. Lora-Michiels, M. Hanson, and P. Hoopes, "Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia," *International journal of hyperthermia*, vol. 19, no. 3, pp. 267–294, 2003.
- [144] M. Dewhirst, B. L. Viglianti, M. Lora-Michiels, P. J. Hoopes, and M. A. Hanson, "Thermal dose requirement for tissue effect : experimental and clinical findings," in *Thermal Treatment of Tissue : Energy Delivery and Assessment II*, vol. 4954, pp. 37–58, International Society for Optics and Photonics, 2003.
- [145] M. Dewhirst, "Thermal dosimetry," in *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy*, pp. 123–136, Springer, 1995.
- [146] K. J. Henle, "Sensitization to hyperthermia below 43° c induced in chinese hamster ovary cells by step-down heating," *JNCI : Journal of the National Cancer Institute*, vol. 64, no. 6, pp. 1479–1483, 1980.
- [147] J. C. Lindegaard and J. Overgaard, "Factors of importance for the development of the step-down heating effect in a c3h mammary carcinoma in vivo," *International journal of hyperthermia*, vol. 3, no. 1, pp. 79–91, 1987.
- [148] I. J. Spiro, S. A. Sapareto, G. P. Raaphorst, and W. C. Dewey, "The effect of chronic and acute heat conditioning on the development of thermal tolerance," *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 8, no. 1, pp. 53–58, 1982.
- [149] A. G. Renehan, S. P. Bach, and C. S. Potten, "The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine," *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 15, no. 3, pp. 166–176, 2001.
- [150] M. O. Hengartner, "The biochemistry of apoptosis," *Nature*, vol. 407, no. 6805, p. 770, 2000.
- [151] S. Fulda, A. M. Gorman, O. Hori, and A. Samali, "Cellular stress responses : cell survival and cell death," *International journal of cell biology*, vol. 2010, 2010.
- [152] R. S. Wong, "Apoptosis in cancer : from pathogenesis to treatment," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 30, no. 1, p. 87, 2011.
- [153] R. Gerl and D. L. Vaux, "Apoptosis in the development and treatment of cancer," *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 2, pp. 263–270, 2005.
- [154] M. Hassan, H. Watari, A. AbuAlmaaty, Y. Ohba, and N. Sakuragi, "Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer," *BioMed research international*, vol. 2014, 2014.
- [155] H. A. Harrington, K. L. Ho, S. Ghosh, and K. Tung, "Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis," *Theoretical Biology and Medical Modelling*, vol. 5, no. 1, p. 26, 2008.
- [156] H. K. Ooi and L. Ma, "Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway," *BMC systems biology*, vol. 7, no. 1, p. 65, 2013.

- [157] J. G. Albeck, J. M. Burke, S. L. Spencer, D. A. Lauffenburger, and P. K. Sorger, “Modeling a snap-action, variable-delay switch controlling extrinsic cell death,” *PLoS biology*, vol. 6, no. 12, p. e299, 2008.
- [158] S. L. Spencer and P. K. Sorger, “Measuring and modeling apoptosis in single cells,” *Cell*, vol. 144, no. 6, pp. 926–939, 2011.
- [159] T. Eissing, H. Conzelmann, E. D. Gilles, F. Allgöwer, E. Bullinger, and P. Scheurich, “Bistability analyses of a caspase activation model for receptor induced apoptosis,” *Journal of Biological Chemistry*, 2004.
- [160] S. M. Srinivasula, R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R.-A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi, *et al.*, “A conserved xiap-interaction motif in caspase-9 and smac/diablo regulates caspase activity and apoptosis,” *Nature*, vol. 410, no. 6824, p. 112, 2001.
- [161] X.-M. Sun, S. B. Bratton, M. Butterworth, M. MacFarlane, and G. M. Cohen, “Bcl-2 and bcl-xl inhibit cd95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of smac/diablo and subsequent inactivation of x-linked inhibitor-of-apoptosis protein,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 13, pp. 11345–11351, 2002.
- [162] S. C. Cosulich, P. J. Savory, and P. R. Clarke, “Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c,” *Current Biology*, vol. 9, no. 3, pp. 147–150, 1999.
- [163] R. Milo, “What is the total number of protein molecules per cell volume ? a call to rethink some published values,” *Bioessays*, vol. 35, no. 12, pp. 1050–1055, 2013.
- [164] N. Nagaraj, J. R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, J. Kelso, S. Pääbo, and M. Mann, “Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line,” *Molecular systems biology*, vol. 7, no. 1, p. 548, 2011.
- [165] L.-F. Wu, B.-L. Wei, Y.-T. Guo, Y.-Q. Ye, G.-P. Li, Z.-J. Pu, and J.-L. Feng, “Apoptosis induced by adenosine involves endoplasmic reticulum stress in ec109 cells,” *International journal of molecular medicine*, vol. 30, no. 4, pp. 797–804, 2012.
- [166] A. L. Paek, J. C. Liu, A. Loewer, W. C. Forrester, and G. Lahav, “Cell-to-cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing,” *Cell*, vol. 165, no. 3, pp. 631–642, 2016.
- [167] F. Bertaux, S. Stoma, D. Drasdo, and G. Batt, “Modeling dynamics of cell-to-cell variability in trail-induced apoptosis explains fractional killing and predicts reversible resistance,” *PLoS computational biology*, vol. 10, no. 10, p. e1003893, 2014.
- [168] I. Dagogo-Jack and A. T. Shaw, “Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies,” *Nature reviews Clinical oncology*, vol. 15, no. 2, p. 81, 2018.
- [169] L. Gay, A.-M. Baker, and T. A. Graham, “Tumour cell heterogeneity,” *F1000Research*, vol. 5, 2016.
- [170] S. J. Altschuler and L. F. Wu, “Cellular heterogeneity : do differences make a difference ?,” *Cell*, vol. 141, no. 4, pp. 559–563, 2010.
- [171] A. A. Alizadeh, V. Aranda, A. Bardelli, C. Blanpain, C. Bock, C. Borowski, C. Caldas, A. Califano, M. Doherty, M. Elsner, *et al.*, “Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity,” *Nature medicine*, vol. 21, no. 8, p. 846, 2015.
- [172] B. Snijder and L. Pelkmans, “Origins of regulated cell-to-cell variability,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 12, no. 2, p. 119, 2011.
- [173] I. Johnston, “The chaos within : exploring noise in cellular biology,” *Significance*, vol. 9, no. 4, pp. 17–21, 2012.
- [174] R. Wang, *Noise, Intrinsic and Extrinsic*, pp. 1527–1527. New York, NY : Springer New York, 2013.

- [175] M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia, and P. S. Swain, “Stochastic gene expression in a single cell,” *Science*, vol. 297, no. 5584, pp. 1183–1186, 2002.
- [176] D. Huh and J. Paulsson, “Random partitioning of molecules at cell division,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201013171, 2011.
- [177] C. Tomelleri, E. Milotti, C. Dalla Pellegrina, O. Perbellini, A. Del Fabbro, M. Scupoli, and R. Chignola, “A quantitative study of growth variability of tumour cell clones in vitro,” *Cell proliferation*, vol. 41, no. 1, pp. 177–191, 2008.
- [178] Y. Yuan, “Spatial heterogeneity in the tumor microenvironment,” *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 6, no. 8, p. a026583, 2016.
- [179] F. Bertaux, S. Stoma, D. Drasdo, and G. Batt, “Dynamics of cell-to-cell variability in trail-induced apoptosis explains fractional killing and predicts reversible resistance,” 2014.
- [180] X. Xia, M. Owen, R. Lee, and S. Gaudet, “Cell-to-cell variability in cell death : can systems biology help us make sense of it all?,” *Cell death & disease*, vol. 5, no. 5, p. e1261, 2014.
- [181] J. Stevens, B. Abdallah, G. Liu, S. Horne, S. Bremer, K. Ye, J. Huang, M. Kurkinen, C. Ye, and H. Heng, “Heterogeneity of cell death,” *Cytogenetic and genome research*, vol. 139, no. 3, pp. 164–173, 2013.
- [182] S. Raychaudhuri, “A minimal model of signaling network elucidates cell-to-cell stochastic variability in apoptosis,” *PloS one*, vol. 5, no. 8, p. e11930, 2010.
- [183] C. Furusawa, T. Suzuki, A. Kashiwagi, T. Yomo, and K. Kaneko, “Ubiquity of log-normal distributions in intra-cellular reaction dynamics,” *Biophysics*, vol. 1, pp. 25–31, 2005.
- [184] J. Canchola, S. Tang, P. Hemyari, E. Paxinos, and E. Marins, “Correct use of percent coefficient of variation (cv) formula for log-transformed data,” *MOJ Proteomics Bioinform*, vol. 6, no. 4, pp. 316–317, 2017.
- [185] A. Sigal, R. Milo, A. Cohen, N. Geva-Zatorsky, Y. Klein, Y. Liron, N. Rosenfeld, T. Danon, N. Perzov, and U. Alon, “Variability and memory of protein levels in human cells,” *Nature*, vol. 444, no. 7119, p. 643, 2006.
- [186] C.-H. Hou, F.-L. Lin, S.-M. Hou, and J.-F. Liu, “Hyperthermia induces apoptosis through endoplasmic reticulum and reactive oxygen species in human osteosarcoma cells,” *International journal of molecular sciences*, vol. 15, no. 10, pp. 17380–17395, 2014.
- [187] V. Tronov, E. Konstantinov, and I. Kramarenko, “Hyperthermia induced signal for apoptosis and pathways of its transduction in the cell,” *Tsitologiya*, vol. 44, no. 11, pp. 1079–1088, 2002.
- [188] X. Xu, S. Gupta, W. Hu, B. C. McGrath, and D. R. Cavener, “Hyperthermia induces the er stress pathway,” *PloS one*, vol. 6, no. 8, p. e23740, 2011.
- [189] R. Bravo, T. Gutierrez, F. Paredes, D. Gatica, A. E. Rodriguez, Z. Pedrozo, M. Chiong, V. Parra, A. F. Quest, B. A. Rothermel, *et al.*, “Endoplasmic reticulum : Er stress regulates mitochondrial bioenergetics,” *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 44, no. 1, pp. 16–20, 2012.
- [190] C. M. Pereira, “Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and protein misfolding in neurodegenerative diseases,” *ISRN Cell Biology*, vol. 2013, 2013.
- [191] I. Belhadj Slimen, T. Najjar, A. Ghram, H. Dabbebi, M. Ben Mrad, and M. Abdrabbah, “Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. a review,” *International journal of hyperthermia*, vol. 30, no. 7, pp. 513–523, 2014.
- [192] B. W. Lindgren, “Statistical theory,” tech. rep., 1960.
- [193] A. M. Mood, “Introduction to the theory of statistics.,” 1950.
- [194] C.-Y. Li, J.-S. Lee, Y.-G. Ko, J.-I. Kim, and J.-S. Seo, “Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 33, pp. 25665–25671, 2000.

- [195] D. D. Mosser, A. W. Caron, L. Bourget, A. B. Meriin, M. Y. Sherman, R. I. Morimoto, and B. Massie, “The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis,” *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 19, pp. 7146–7159, 2000.
- [196] H. M. Beere, B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen, and D. R. Green, “Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome,” *Nature cell biology*, vol. 2, no. 8, p. 469, 2000.
- [197] A. Saleh, S. M. Srinivasula, L. Balkir, P. D. Robbins, and E. S. Alnemri, “Negative regulation of the apaf-1 apoptosome by hsp70,” *Nature cell biology*, vol. 2, no. 8, p. 476, 2000.
- [198] J. J. Moré, B. S. Garbow, and K. E. Hillstrom, “User guide for minpack-1,” tech. rep., CM-P00068642, 1980.
- [199] A. Mitchell, P. Wei, and W. A. Lim, “Oscillatory stress stimulation uncovers an achilles’ heel of the yeast mapk signaling network,” *Science*, vol. 350, no. 6266, pp. 1379–1383, 2015.
- [200] H. Ryu, M. Chung, M. Dobrzyński, D. Fey, Y. Blum, S. S. Lee, M. Peter, B. N. Kholodenko, N. L. Jeon, and O. Pertz, “Frequency modulation of erk activation dynamics rewires cell fate,” *Molecular systems biology*, vol. 11, no. 11, p. 838, 2015.
- [201] J. W. Young, J. C. Locke, and M. B. Elowitz, “Rate of environmental change determines stress response specificity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, no. 10, pp. 4140–4145, 2013.
- [202] J. S. Bedford and J. B. Mitchell, “Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture,” *Radiation research*, vol. 54, no. 2, pp. 316–327, 1973.
- [203] F. Ellis, “Dose, time and fractionation : a clinical hypothesis,” *Clinical Radiology*, vol. 20, no. 1, pp. 1–7, 1969.
- [204] D. Labavić, M. T. Ladjimi, Q. Thommen, and B. Pfeuty, “Scaling laws of cell-fate responses to transient stress,” *Journal of Theoretical Biology*, 2019.
- [205] P. Maier, L. Hartmann, F. Wenz, and C. Herskind, “Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization,” *International journal of molecular sciences*, vol. 17, no. 1, p. 102, 2016.
- [206] D. W. Connell, J. Y. Qiming, and V. Verma, “Influence of exposure time on toxicity—an overview,” *Toxicology*, vol. 355, pp. 49–53, 2016.
- [207] R. Jessel, S. Haertel, C. Socaciu, S. Tykhonova, and H. A. Diehl, “Kinetics of apoptotic markers in exogeneously induced apoptosis of el4 cells,” *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 6, no. 1, pp. 82–92, 2002.
- [208] H. S. Marinho, C. Real, L. Cyrne, H. Soares, and F. Antunes, “Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors,” *Redox biology*, vol. 2, pp. 535–562, 2014.
- [209] P. Reynolds, J. A. Anderson, J. V. Harper, M. A. Hill, S. W. Botchway, A. W. Parker, and P. O’neill, “The dynamics of ku70/80 and dna-pkcs at dsbs induced by ionizing radiation is dependent on the complexity of damage,” *Nucleic acids research*, vol. 40, no. 21, pp. 10821–10831, 2012.
- [210] L. Moyal, Y. Lerenthal, M. Gana-Weisz, G. Mass, S. So, S.-Y. Wang, B. Eppink, Y. M. Chung, G. Shalev, E. Shema, *et al.*, “Requirement of atm-dependent monoubiquitylation of histone h2b for timely repair of dna double-strand breaks,” *Molecular cell*, vol. 41, no. 5, pp. 529–542, 2011.
- [211] J. Landry, D. Bernier, P. Chrétien, L. M. Nicole, R. M. Tanguay, and N. Marceau, “Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance,” *Cancer research*, vol. 42, no. 6, pp. 2457–2461, 1982.

- [212] M. Adachi, Y. Liu, K. Fujii, S. K. Calderwood, A. Nakai, K. Imai, and Y. Shinomura, "Oxidative stress impairs the heat stress response and delays unfolded protein recovery," *PloS one*, vol. 4, no. 11, p. e7719, 2009.
- [213] B. Polla, S. Kantengwa, D. Francois, S. Salvioli, C. Franceschi, C. Marsac, and A. Cossarizza, "Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury," *Proceedings of the national academy of sciences*, vol. 93, no. 13, pp. 6458–6463, 1996.
- [214] D. R. Ciocca and S. K. Calderwood, "Heat shock proteins in cancer : diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications," *Cell stress & chaperones*, vol. 10, no. 2, p. 86, 2005.
- [215] T. Y. Seiwert, M. Tretiakova, P. C. Ma, M. A. Khaleque, A. N. Husain, A. Ladanyi, L. B. Chen, A. Bharti, and R. Salgia, "Heat shock protein (hsp) overexpression in lung cancer and potential as a therapeutic target," 2005.
- [216] R. Seigneuric, H. Mjahed, J. Gobbo, A.-L. Joly, K. Berthenet, S. Shirley, and C. Garrido, "Heat shock proteins as danger signals for cancer detection," *Frontiers in oncology*, vol. 1, p. 37, 2011.
- [217] G. Wanner and E. Hairer, *Solving ordinary differential equations II*. Springer Berlin Heidelberg, 1996.
- [218] V. Akinsola and Y. Aregbesola, "The numerical solutions of system of stiff ordinary differential equations using the semi implicit extrapolation method,"
- [219] G. Cooper, "Regulation of transcription in eukaryotes," *The cell : a molecular approach. 2nd edition. Sunderland : Sinauer Associates*, 2000.
- [220] E. Klipp, W. Liebermeister, C. Wierling, A. Kowald, and R. Herwig, *Systems biology : a textbook*. John Wiley & Sons, 2016.
- [221] W. K. Vogel, T. M. Filtz, and M. Leid, "Regulation of transcription factor activity by interconnected, post-translational modifications," 2014.
- [222] L. Michaelis and M. L. Menten, *Die kinetik der invertinwirkung*. Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg, 1913.
- [223] G. E. Briggs and J. B. S. Haldane, "A note on the kinetics of enzyme action," *Biochemical journal*, vol. 19, no. 2, p. 338, 1925.
- [224] U. Alon, *An introduction to systems biology : design principles of biological circuits*. Chapman and Hall/CRC, 2006.