



ÉCOLE DOCTORALE PRES I Bourgagne I Franche-Comé

Institut national PFESI Bourgogne I Franche-Come de la santé et de la recherche médicale Environnements - Santé

UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

U.F.R DES SCIENCES DE SANTE

Ecole Doctorale Environnements-Santé-E2S

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Mention : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le 27 Mars 2018

Par:

CHRISTOPHE BOUDESCO

Intitulée :

Expression et rôle d'HSP110 dans le lymphome B diffus à grandes cellules de type activé ou ABC-DLBCL.

Membres du jury :

Dr Nicolas Bidère	Rapporteur
Dr Christophe Caux	Rapporteur
Dr Juliette Vergnaud-Gauduchon	Examinatrice
Pr Jean Noël Bastie	Examinateur
Dr Carmen Garrido	Examinatrice
Dr Gaëtan Jego	Directeur de thèse

« *Toute Science crée une nouvelle ignorance* » (Henri Michaux, peintre)

« C'est de la Science, ça ne peut que marcher » (Dr Kévin Berthenet, visionnaire)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail et ce malgré leur obligations professionnelles. Je remercie les docteurs **Nicolas Bidère** et **Christophe Caux** pour avoir accepté d'être rapport de ce travail, et le docteur **Juliette Vergnaud-Gauduchon** et professeur **Jean Noël Bastie** pour avoir accepté le rôle d'examinateur. Je remercie également le docteur **Carmen Garrido** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour avoir supervisé et soutenu ce projet, et surtout pour votre disponibilité.

Je remercie également le **ministère de la recherche** pour la bourse MENRT accordée et la **Société Française d'Hématologie** pour avoir été financeur de ce projet.

Mes premiers remerciements personnalisés iront à **Gaëtan Jego**, sans qui rien de tout cela n'aurai été possible. Merci de m'avoir accordé ta confiance alors que je n'étais qu'une jeune pousse de M1, et de m'avoir fait l'honneur d'accepter de m'encadrer pendant ces trois ans. Pour reprendre une expression de Dominique, tu as été mon véritable papa de science, avec tout ce que cela implique : tu as toujours été là pour moi, engagé scientifiquement et humainement, me permettant de me faire grandir pendant ces trois ans ! Je t'ai pratiquement toujours vouvoyé pendant ces trois ans, par respect pour ta profonde culture scientifique et ton engagement permanent envers les étudiants que tu as encadré, malgré la charge de travail que tu as au quotidien. Je souhaite à bien des étudiants de passer entre tes mains et te remercie encore de m'avoir choisi pour cette belle aventure !

Mathilde....Sans toi, cette thèse n'aurait pas été la même non plus. Je crois qu'il me faudrait un manuscrit entier pour décrire à quel point tu as été importante durant ces trois ans, mais surtout à quel pont tu m'es indispensable au quotidien désormais. Soutien indéfectible, bouffée d'oxygène permanente, source de joie et de motivation inépuisable, j'ai mille superlatifs en tête pour te qualifier et je réalise un peu plus chaque jour la chance que j'ai te t'avoir à mes côtés. Je crois que nous pouvons remercier **Antoine** d'avoir créé tout ça malgré lui !

Merci à toi mon cher **Burhan** pour avoir été mon « partner » durant ces 3 années. Au-delà de ton esprit « malin / intelligent » comme le suggère ton nom de famille et de ton aide pour les manips, je crois que cette thèse n'aurait pas été la même sans mon logicien fou à mes côtés ! En effet, j'ai une pensée émue en repensant à tous ces fous rires, cet humour au millième degré toujours plus absurde et de bonne qualité entre nous, à nos séances d'coute de musique du monde ou simplement improbables (bouchon de liège entre autre). Je te dois la découverte de tous les restaurants de « gros » sur Dijon et une belle initiation à la cuisine Turque, expérience que ne laisse pas indemne ! J'espère que l'on continuera nos séances de quizz où tu me bats à chaque fois quand tu seras devenu le plus grand magnat de la viande en Turquie (je n'oublie pas notre business). Dernière chose : ne soigne pas ton glioblastome imaginaire, tu es trop brillant et trop profondément malfaisant pour que ce monde puisse se passer de toi !

Guillaume LP Marcion deuxième du nom et « traileur » fou! Je crois que Burhan et moi avons réveillé une créature « trollesque » dont nous regrettons presque la création ! Merci d'avoir été mon partenaire de projet HSP110, dans les bons projets comme les plus étranges (courage pour celui qui te lie à NY ! Je te souhaite bien du plaisir !). Merci encore pour les séances de Bad, le séjour au ski, les bouffes de gros, les discussions sportives, etc.... Je te souhaite de partir...enfin ! Il est temps pour toi de découvrir autre chose qu'un labo HSP à Dijon :P Merci à mes éternelles confidentes **Anne Sophie / Carole / Emilie** ! C'est la fin de cette grande aventure qui nous aura valu notre lot d'émotions, joyeuses ou non ! Vous avez toujours été présentes et à l'écoute en cas de besoin / coup de gueule / moment de moins bien, et aussi dans les super bons moments (ton mariage **Anne Sophie** restera dans l'histoire !). Les réunions du mercredi midi vont me manquer et je vous souhaite tout le meilleur pour la suite dans vos vies respectives.

Alex, cher partenaire de vadrouille depuis la L3 ! Tu en auras vécu de sacrées aventures durant ta thèse, toi le narcotrafiquant Trans brésilien ! J'espère que tu trouveras vite un labo pour la suite qui saura te redonner goût à tout ça. Ça a été un plaisir de t'avoir ici en tout cas, je ne suis pas prêt d'oublier les « réunions de crise dans le box » ainsi que la soirée FJ2017 où tu as été magique ! A ce sujet, je remercie aussi **Romain D**, c'est toujours un plaisir de rencontrer des petits fils de migrants de cités minière telles Sanvignes les Mines !

Merci mon cher **Killian** pour tous ces bons moments, les conversations absurdes, les séances de tennis de haut niveau, les soirées qui devaient se finir tôt mais enfait non, et cette saine ambiance de « beaufitude » que tu as fait émerger au labo. J'espère qu'on aura le loisir de se faire « voler » bien d'autres bières à l'occasion ! Et surtout mon cher **Kik** : lâche l'aff' une bonne fois pour toutes !

OH MAIS Baptiiiiiisteuuuhh ! Merci d'avoir contribué à augmenter le nombre de punch lines à l'INSERM, et d'avoir contribué à l'élaboration de « l'échelle du labo » avec ce bon vieux **Kik** et cette bouteille de whisky qui n'aura pas suivie notre rythme ! J'espère un jour pouvoir répondre oui à ta fameuse question « Est-ce que tu ... », mais peut-être quand tu seras moins hautain, titulaire du permis moto et membre de l'équipe Garrido.....oh wait !!!

Merci à toi ma chère **Flaviking-brandade-noiraude** ! Il va falloir que tu trouves un remplaçant pour les réunions de crise et moments « confessions intimes » au chemidoc. On ne se sera toujours pas fait ce Blind test / karaoké Queen d'ailleurs ! Je te souhaite tout le meilleur pour ta fin de thèse et pour ta vie de famille déjà formidablement débutée.

Merci à toi ma chère **Leila** pour tout le travail que tu as accompli pour me soulager durant la rédaction de cette thèse ! Je te laisse la place d'enfant chef de notre sous-groupe lymphome, sache faire respecter la bonne humeur, la dérision et surtout l'ordre sur notre paillasse ! J'espère que tu garderas toujours cette gentillesse qui te caractérise, merci encore pour tout !

Merci aux autres membres de l'équipe Garrido, **Gaëtan** pour les pâtisseries et l'humour un grivois (pô du tout me diras-tu), **Marine** pour les gâteaux et les accompagnements au chant sur « Francis » dans le box, **Pierre Marie** pour nos nombreuses conversations sur les « virus qui marchent » et la « science robuste ». Merci à **Lucile, Nicolas, Thibault, Margaux** pour votre bonne humeur durant ces années, à **Oleg** pour son savoir et précieux conseils sur la façon de rédiger des demandes de financement (avec de l'aide dans le tiroir... !).

Merci aux membres des autres équipes d'avoir rendu cette aventure excitante, merci à Romain le maitre chibroblaste, à Antoine le « knight of Ni », Etienne, Anne, Sarra, Romain A, Ronan, Agathe, Cindy, Catherine.

Merci également aux membres passés de l'INSERM 1231, **Herr Victor** pour toutes ses découvertes musicales et notre amour des vertes, **Jennifer** pour toutes ces activités que l'on a partagé, les jours de l'an chez toi, et d'avoir été ma confidente officielle certifiée de l'INSERM ! Merci à toi aussi mon **petit**

Kévinou, c'est quand même toi qui m'a formé et m'a donné les rênes du sous-groupe Jégo. C'est maintenant à moi de partir voir ce qu'il se passe à Nonolulu !

Merci enfin aux plateformes techniques de l'INSERM, Cellimap et la plateforme de Cytométrie, et notamment à leur personnel technique très professionnel et toujours agréables, **André, Audrey, Serge, Arlette, Annabelle**.

Enfin, un grand merci à **ma famille** qui m'a toujours soutenue et encouragée dans mon projet professionnels.

A tous : Merci !

Résumé

Les protéines de chocs thermiques (HSP) sont des protéines très conservées au cours de l'évolution des espèces. Ce sont des chaperons moléculaires impliqués dans le repliement des protéines nouvellement synthétisée ou dénaturées. Les HSP sont fortement exprimées dans les cellules cancéreuses, où elles contribuent à la résistance à l'apoptose et aux chimiothérapies. Parmi les HSP, HSP110 est jusqu'à présent peu étudiée. Cependant, HSP110 a été récemment associée au lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL). Le DLBCL est le syndrome lympho-prolifératif agressif le plus fréquent chez l'adulte (30% des lymphomes non-Hodgkinien). Il existe trois principaux sous-type de DLBCL : le type B activé (ABC-DLBCL), le type centre germinatif (GC-DLBCL) et le type lymphome primaire du médiastin (PMBL). La forme activée est celle associée au plus mauvais pronostic clinique. Bien que les thérapies classiques de chimiothérapies associées aux anti-CD20 aient permis d'augmenter le pronostic de survie des patients souffrant de l'ABC-DLBCL, nombreux sont ceux qui développent des résistances ou qui ne répondent pas aux traitements. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc nécessaire.

Mes travaux présentent un rôle de HSP110 dans l'activité d'une voie oncogénique du lymphome ABC-DLBCL. En effet, ces travaux démontrent une forte expression d'HSP110 dans les échantillons patients ABC-DLBCL. De plus, ces travaux *in vitro* sur des lignées ABC-DLBCL montrent une interconnexion entre HSP110 et Myd88 L265P, protéine mutée responsable de l'activation de la voie NF-kB. HSP110 stabilise l'oncogène Myd88 L265P, et participe à l'amplification de la voie NFkB dans le lymphome ABC, voie responsable de la survie et de la prolifération des cellules ABC-DLBCL.

Par le biais d'une collaboration, nous avons pu obtenir récemment des inhibiteurs de HSP110. Ainsi, mon travail à également consisté aux criblages *in vitro* de ces inhibiteurs pour évaluer leur capacité d'inhibition de HSP110. Deux composés ont alors été identifiés comme candidats inhibiteurs d'HSP110. Je me suis ensuite intéressé à l'utilisation de ces inhibiteurs *in vitro* dans l'ABC-DLBCL. Mes résultats tendent à montrer que ces inhibiteurs ont une action similaire à ceux observés lors de l'inhibition de HSP110 par siRNA ou shRNA.

Mes travaux de thèse présente donc HSP110 comme une cible moléculaire potentielle de l'ABC DLBCL.

Mots cléfs : HSP110 – lymphome ABC-DLBCL – NFkB – Myd88

Abstract

Heat shock proteins (HSPs) are highly conserved protein across species, and are expressed in all cell type. HSPs are molecular chaperones involved in the folding of newly synthesized or denaturated proteins. HSPs are overexpressed in cancer cells, where they contribute to cancer resistance to chemotherapies. Among HSPs, roles and functions of HSP110 are less described. Interestingly, HSP110 was recently associated with lymphoma aggressiveness in Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL). DLBCL is the most lymphoproliferative disease diagnosed in adult (30% of Non-Hodgkin Lymphoma). Three main subtypes of DLBCL are described: Activated-B-Cell lymphoma (ABC-DLBCL), Germinal Center lymphoma (GC-DLBCL), and Primary Mediastinal B Lymphoma (PMBL). ABC-DLBCL is the most aggressive form associated with a poor prognosis. Even if R-CHOP therapies had improve patient's survival over the last decades, most of patients experiences relapses or treatment resistances. New molecular target are now necessary to treat efficiently these subtypes.

My PhD work has highlighted the role of HSP110 in the NFkB signaling pathway, which is an oncogenic pathway in ABC-DLBCL. First, we show that HSP110 is overexpressed in ABC-DLBCL patient sample. We also show an interaction between HSP110 and Myd88 L265P, that is an oncogenic protein responsible for NFkB pathway activation. Consequently, HSP110 stabilizes Myd88 L265P, leading to a sustain NFkB pathway activation in lymphoma cells, and promoting ABC-DLBCL cell survival and proliferation.

Finally, our team recently characterized the first known HSP110 inhibitors. I took the opportunity to test these putative inhibitors in my study. My results suggest that these compounds have similar effects than siRNA or shRNA inhibition of HSP110 on ABC-DLBCL survival. This result provide a ground for future *in vivo* testing of chemical inhibitors of HSP110.

In conclusion, my work highlight HSP110 as a potential therapeutic target in ABC-DLBCL.

Key words: HSP110 – ABC-DLBCL lymphoma – NFkB – Myd88

Table des matières

Abréviations	1
Contexte de l'étude :	2
Introduction :	3
Définition générale du lymphome non Hodgkinien	3
Classification des lymphomes	4
Le bon, la brute et le truand : les trois principaux sous-types DLBCL	6
Centre de commandement du lymphome ABC : NFkB	8
Rôle of NFkB dans le centre germinatif	9
Le rôle NFkB dans l'ABC -DLBCL	11
Lésions génétique menant à l'activation canonique NFkB.	11
Premier composant de la voie NFkB : la voie du BCR	12
Rétrocontrole :	16
Mutation des composants de la voie du BCR	18
Deuxième composant de la voie NFkB : la voie TLR	20
Rétrocontrole :	23
Mutation de la voie TLR : Myd88	24
Impact des mutations NFkB sur le pronostique clinique des patients ABC	25
Autres lésions génétiques fréquemment retrouvées dans le lymphome ABC.	27
Thérapie des lymphomes DLBCL :	30
Nouvelles thérapies dirigées contre le sous-type ABC-DLBCL.	31
HSP et intérêt dans le cancer	36
HSP et pathologies hématologiques	37
HSP et lymphome DLBCL	38
Généralités sur HSP110	40
HSP110 et cancer	41
HSP110 et cancer lymphome DLBCL.	41
Matériel et méthode	43
Objectifs de la thèse :	49
Résultats	50
Partie 1 : HSP110 comme une cible thérapeutique potentielle du lymphome ABC-DLBCL	50
Impact de la déplétion d'HSP110 sur des cellules ABC DLBCL	51
HSP110 dans la voie NFkB	56

Stabilité de Myd88 en fonction de l'expression d'HSP11066
HSP110 et lymphome ABC-DLBCL : une cible potentielle chez les patients ?
Conclusion
Partie 2 : inhibition de HSP110 par des molécules chimiques dans le lymphome ABC-DLBCL74
Criblage des foldamères dans le cancer colorectal75
Criblage des foldamères inhibiteurs d'HSP110 dans le lymphome ABC-DLBCL
Discussion
Conclusion générale
Bibliographie
Annexes
Article 1: HSP110 sustains chronic NF-κB signaling in activated B cell diffuse large B cell lymphoma through MyD88 stabilization
Revue premier auteur et articles en collaboration:128

Table des figures

Figure 1 Classements des 20 sites tumoraux principaux retrouvés en clinique dans le monde selon
l'étude GLOBOCAN 2012 [IARC]
Figure 2 : Estimation des pourcentages des sous-types de néoplasies B diagnostiquées en 2016 aux
Etats-Unis
Figure 3 : Incidence et ratio homme / femme des différents sous-types de lymphome en fonction
de l'âge d'apparition de la maladie 6
Figure 4 : Survie globale des patients atteint de DLBCL traités par R-CHOP
Figure 5 : protéines de la voie NFkB et activation.
Figure 6 : Activité NFkB dans le centre germinatif
Figure 7 : Voies d'activation NFkB dans le lymphome ABC-DLBCL
Figure 8 : Schéma des protéines participant à la voie du BCR
Figure 9 : Signalisation CBM
Figure 10 : Signalisation BCR post formation du complexe CBM 16
Figure 11 : Rétrocontrôle de la voie BCR
Figure 12: Structure de la protéine Myd88 21
Figure 13 : Cristallisation et modélisation de la formation du Myddosome 22
Figure 14 : Dégradation de IRAK1 par B-TrCP lors de la signalisation TLR 23
Figure 15 : Survie globale des patients sous traitement R-CHOP en fonctions de leur mutation des
protéines de la voie NFkB (CARD11, Myd88 ou CD79A/B) ou sans mutation de la voie NFkB 25
Figure 16 : Survie globale des patients sous traitement R-CHOP en fonctions de leur mutation des
protéines de la voie NFkB (Myd88 ou CD79A/B) 26
Figure 17 : Survie des patients traités par R-CHOP selon le sous-type de lymphome diagnostiqué. 31
Figure 18 : Schéma général des molécules ciblant la voie NFkB dans le sous-tpe ABC-DLBCL
Figure 19 : Survie des patients sans progression de la maladie en fonction des traitements de
chimiothérapie
Figure 20 : Mode d'action simplifié des HSP

Figure 21 : Expression de HSP90 évaluée par immunohistochimie dans des organes lymphoïdes
normaux ou dans un tissue GC DLBCL
Figure 22 : Structure d'HSP110. Le schéma ci-dessus représente les 2 isoformes d'HSP110, avec
leurs 4 domaines fonctionels
Figure 23 : Etude de l'impact de la déplétion d'HSP110 dans des lignées ABC-DLBCL
Figure 24 : Phosphorylation d'IKBα dans les lignées ABC-DLBCL modifiées par siRNA
Figure 25 : Répartition cytoplasme / noyau des sous-unités NFkB dans les lignées ABC-DLBCL
modifiées par siRNA
Figure 26 : Phosphorylation d'IKB α dans les lignées ABC-DLBCL HBL1, Oci-Ly3, U2932 après
inhibition HSP
Figure 27: Images issue de la présentation de Louis Staudt à l'AACR 2017
Figure 28 : Duolink [®] IgM x P-IkBα dans les lignées HBL1- U2932- Oci-Ly3 après 48h d'interférence
ARN
Figure 29 : Phosphorylation de IRAK1 et K63 ubiquitination de TRAF6 dans des lignées ABC-DLBCL
transfectées avec un siRNA contrôle ou hsph1 59
Figure 30 : Extraits des diapositives de Louis M Staudt présentant l'interconnexion entre la voie
BCR et TLR (AACR 2017)
Figure 31 : Signal NFkB dans des lignées de lymphome ou non cancéreuses après combinaisons de
transfection Myd88 / HSP110
Figure 32 : Duolink [®] HSP110 Myd88 dans les cellules ABC-DLBCL.
Figure 33 : Etude de l'interaction HSP110 / Myd88 par immuno précipitation dans des lignées ABC-
DLBCL et dans une lignée non cancéreuse HEK293T
Figure 34 : Conséquence de l'effet dose d'HSP110 sur le niveau d'expression Myd88 sauvage ou
muté dans des HEK293T
Figure 35 : Conséquence de la transfection d'HSP110 sur la stabilité de Myd88
Figure 36 : Niveau de Myd88 dans les lignées ABC-DLBCL après transfection
Figure 37 : Etude de l'expression de HSP110 dans des échantillons de tissu non tumoraux et
tumoraux
Figure 38 : Corrélation entre l'expression d'HSP110 et Myd88 chez les patients ABC-DLBCL et
proximité dans les échantillons patients
Figure 39: Criblage des molécules dans l'inhibition de l'axe HSP110 STAT3
Figure 40 : Utilisation des molécules candidats inhibiteurs 5052 et 5033 en culture sur des lignées
ABC-DLBCL
Figure 41: Etude de la voie BCR et Myd88 après traitement par les molécules candidats pour
l'inhibition d'HSP110
Figure 42 : viabilité des lignées U2932, HBL1 et TMD8 pour les trois composés utilisés
Figure 43 : Voie P-STAT3 dans les lymphomes ABC-DLBCL modifiés par siRNA
Figure 44 : Extraits des diapositives de Louis M Staudt présentant l'interconnexion entre la voie
BCR et TLR (AACR 2017)
Figure 45 : Niveau BcL6 et inhibition de BcL6 dans le lymphome ABC-DLBCL

Table des tableaux

Tableau 1: Emploi des molécules ciblant la voie NFkB en clinique	32
Tableau 2 : Mutations présentées par les lignées ABC-DLBCL utilisées	57

Abréviations

ABVD	Adriamycin Bleomycin Vinblastine Dacarbazine
ASO	Allele-specific oligonucleotide
BcL6	B Cell Lymphoma 6
BCR	B Cell Recpetor
BEACOPF	Bléomycine Toposide Doxorubicine Cyclophosphamide Procarbazine Prednisone
ВТК	Bruton tyrosine kinase
СВМ	Complexe CARD11-BcL10-MalT1
DLBCL	Diffuse large B Cell Lymphoma
HSP	Heat Shock Protein
lkBa	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor, alpha
IL-	Interleukine
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRF	Interferon regulatory factor 3
ITAMs	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK2	Janus kinase 2
LNH	Non-Hodgkin Lymphoma
LUBAC	Linear ubiquitin chain assembly complex
MALT	Mucosa Associated Lymphoma
Myd88	Myeloid differentiation primary response 88
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFkB	Nuclear Factor-Kappa B
ORR	OveRall Survival
PDL	Programmed death-ligand

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
ΡΚC β	Protein kinase C β
PLCγ2	Phospholipase Cy2
PRDM1	Positive Regulatory Domain I- Binding Factor 1
R-CHOP	Association Rituximab Vincristine Prednisone Cyclophosphamide Hydroxyadriamycine
siRNA / shRNA small interfering RNA / short hairpin RNA	
SNP	Single Nucléotide Polymorphism
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling protein 1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TLR	Toll Like Receptor
TRAF	TNF receptor associated factors
TRAM	Translocating chain-associating membrane
TRIF	TIR-domain-containing adapter- inducing interferon-β
WHO	Acronyme anglais de l'OMS

Contexte de l'étude :

Les travaux qui vont suivre s'intéressent au lymphome B diffus à grandes cellules ou DLBCL en anglais, le cancer hématologique le plus fréquent chez l'adulte. Ce type de pathologie survient à la suite d'altérations génétiques au sein des lymphocytes B menant à leur hyper-prolifération et leur résistance à l'apoptose. L'avancée des recherches sur le lymphome et notamment les études de transcriptomiques ont permis de déterminer différents sous-types de DLBCL, dont les caractéristiques moléculaires sont de plus en plus documentées, chaque sous-type étant caractérisé par l'expression de protéines oncogéniques spécifiques ou de mutations spécifiques par exemple.

Le traitement clinique standard du DLBCL est appelée thérapie R-CHOP, composée d'une combinaison de quatre agents chimio thérapeutiques avec le rituximab, un anticorps ciblant les lymphocytes B (anti-CD20). Cependant, bien que la thérapie R-CHOP et ses dérivés aient permis d'augmenter le pronostique de survie des patients, nombreux sont ceux qui développent des résistances ou qui ne répondent pas au traitement. De plus, malgré les caractéristiques moléculaires très distinctes de chacun de ces sous-types (mutations, voies de signalisation), les protocoles de traitement clinique sont identiques pour chaque patient atteint de DLBCL. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques à chacun de ces sous-types est donc nécessaire afin de fournir aux cliniciens un arsenal de composés et de combinaisons de composés adaptés pour chaque patient.

Ce travail s'inscrit dans la volonté d'explorer l'expression et, potentiellement le rôle des HSP dans le lymphome DLBCL. Mes travaux se concentrent sur l'identification d'une nouvelle cible protéique dans un sous-type de lymphome DLBCL. Cette protéine appartient à la famille des protéines de choc thermique ou HSP. Très conservées au cours de l'évolution des espèces, les HSP sont fortement exprimées dans les cellules cancéreuses, où elles contribuent à la résistance à l'apoptose et aux chimiothérapies, ce qui en font des cibles de choix en thérapie anticancéreuse. Les travaux qui vont suivre tendent à présenter HSP110 comme une cible thérapeutique potentielle dans le DLBCL.

L'introduction du présent manuscrit sera donc structurée comme suit : une première partie présentant succinctement le lymphome non hodgkinien, son incidence et ses sous-types, une deuxième partie sur le lymphome DLBCL de type activé et la voie NFkB, une troisième partie sur les traitements émergeant pour cibler ce sous-type activé puis un chapitre présentant l'intérêt du ciblage des HSP dans le lymphome diffus à grande cellules.

Introduction :

Définition générale du lymphome non Hodgkinien

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) sont les plus fréquentes des hémopathies (tumeurs malignes des cellules du sang) (Figure 1) de l'adulte et la troisième cause de cancer pédiatrique. Comme tous les lymphomes, les LNH ont pour origine un lymphocyte tumoral, c'est-à-dire un lymphocyte ayant acquis des modifications / mutations lui conférant une prolifération non contrôlée ou une résistance au mécanisme d'apoptose. Il s'agit d'un cancer lymphatique, ce qui signifie que les cellules tumorales vont se disséminer à travers le sang à divers endroits du corps, notamment les ganglions lymphatiques, la rate et la moelle osseuse, où ils forment des masses tumorales. Les lymphomes Concernent les deux populations de lymphocytes du sang (T et B) mais les lymphomes B sont les plus représentés en clinique (¹).



Figure 1 Classements des 20 sites tumoraux principaux retrouvés en clinique dans le monde selon l'étude GLOBOCAN 2012 [IARC]. Les lymphomes sont la 10ième cause de cancer (NHL pour Non Hodgkin Lymphoma).

Classification des lymphomes

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, WHO en anglais) propose depuis 2008 une classification standardisée des lymphomes, classification reposant sur une association de critères cliniques, morphologiques, génétiques et moléculaires (²). Cette classification est mise à jour régulièrement et tend à être de plus en plus précise : l'objectif est de répertorier et classer les marqueurs morphologiques ou moléculaires des lymphomes afin de permettre aux cliniciens de proposer une prise en charge et un traitement adapté à chaque patient (³). Les lymphomes présentent un répertoire de pathologies assez varié, et on discerne deux grands groupes : les **lymphomes hodgkinien** (ou maladie de Hodgkin) et les **lymphomes non hodgkinien** (LNH). Le **lymphome de hodgkin**, caractérisé par l'apparition de cellules dites de « Reed–Sternberg », démontre une activation importante de la voie NF-kB, menant à une forte prolifération des cellules et une résistance à l'apoptose (⁴). Le lymphome de Hodgkin est dit « de pronostic favorable » puisque la maladie est en rémission dans 80% des cas avec les combinaison initiales de traitement (Chimiothérapie [**protocoles ABVD**, **BEACOPP et Stanford V]** et/ou radiothérapie) (⁵). Le présent manuscrit s'intéresse aux lymphomes les plus agressifs : les lymphomes non hodgkinien.

En terme d'incidence, 11 512 nouveaux cas de LNH ont étés déclarés en France en 2012 (*source GLOBOCAN 2012, International Agency for Research on Cancer*, Section of Cancer Surveillance, France Métropolitaine). Le LNH est un terme rassemblant de multiples pathologies. Pour comprendre quels sont les principaux sous-types de LNH, il faut pour cela regarder les pourcentages estimé de la représentation clinique de ces différentes pathologies en 2016 aux Etats-Unis est présenté dans la **figure2**, adaptée de Teras et al (¹). Les données présentées sont une estimation pour l'année 2016 aux États-Unis basée sur les 112 380 cas déjà diagnostiqués en 2016, fournissant ainsi une vue d'ensemble très récente utilisant la classification WHO 2016.



Figure 2 : Estimation des pourcentages des sous-types de néoplasies B diagnostiquées en 2016 aux Etats-Unis. Adapté de Theras et al, "2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes", CA Cancer J Clin. 2016. Basée sur 112,38

On constate que la majorité des pathologies B est due à des cas de lymphomes (50% du total). Le sous-type comportant la plus forte incidence est le **lymphome B diffus à grandes cellules B** (**DLBCL**), représentant 25% des néoplasies de l'adulte et 50% des cas de lymphomes de l'adulte. Viennent ensuite les lymphomes folliculaires (12% des pathologies de l'adulte), les lymphomes de la zone marginale (7%) ou de Hodgkin (6%). En ce qui concerne l'âge d'apparition de la maladie, un groupe de chercheurs anglais a montré une distribution particulière des diagnostics de lymphome en fonction de l'âge (**figure 3**). En effet, les lymphomes pédiatriques sont en majorités des lymphomes de Burkitt ou hodgkinien. Les DLBCL ne représentent en moyenne que 7% des lymphomes pédiatriques. Les DLBCL ont une incidence qui augmente avec l'âge, on observe en effet que dès 40ans, le lymphome DLBCL est le lymphome le plus fréquemment diagnostiqué en clinique (**figure 3**).



Figure 3 : Incidence et ratio homme / femme des différents sous-types de lymphome en fonction de l'âge d'apparition de la maladie. Adapté de Smith et al, "Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004-2014 : sub-type analyses from the UK's Haematologi cal Malignancy Research Network.

Les **lymphomes non hogkinien** (LNH) constituent donc un ensemble hétérogène de tumeurs du tissu lymphoïde. Les travaux résumé dans ce manuscrit s'intéressent notamment au lymphome le plus fréquent chez l'adulte : le lymphome B diffus à grandes cellules B (ou DLBCL).

Le bon, la brute et le truand : les trois principaux soustypes DLBCL

Chaque année en France, 3000 à 4000 personnes développent un lymphome DLBCL (rapport WHO sept 2016 dossier manuscrit thèse). D'une grande hétérogénéité clinique, les DLBCL proviennent de la transformation d'un lymphocyte B issu du centre germinatif dont ils portent le phénotype et le profil génétique. Les DLBCL comportent trois sous-types moléculaires principaux, nommés d'après leurs cellules d'origine supposée : le DLBCL de Centre Germinatif (GC-DLBCL) vraisemblablement dérivé de la zone claire du centre germinatif, ainsi que la forme activée DLBCL (ABC-DLBCL) et le sous-type PMBL (Primary Mediastinal B cell Lymphoma) (⁶). Alors que les sous-types ABC et GC-DLBCL touchent en majorité des personnes ayant plus de 60 ans, l'âge médian des personnes affectées par le PMBL est de 30 ans. Ce lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B ou PMBL est cependant plus rare et de meilleur pronostique que les deux autres. Environ 64% des patients survivent 5 ans après le

traitement (cf courbe survie **figure 4** [⁷]. Les PMBL se développent à partir des lymphocytes B résidant dans le thymus, et dépendent de l'activation constitutive des voies NF-κB et JAK-STAT pour promouvoir leur survie et leur prolifération [⁸].



Figure 4 : Survie globale des patients atteint de DLBCL traités par R-CHOP. Adapté de Rosenwald et al, "Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymp

GC-DLBCL et ABC-DLBCL partagent un certain nombre d'altérations génétiques qui reflètent probablement un mécanisme de transformation néoplasique similaire (mutations TP53 dans 20% des cas⁹, amplifications de BcL2 ou BcL6⁶) mais présentent aussi des lésions génétiques uniques et propres à chaque sous-type, induisant une dépendance à des voies de signalisation oncogéniques distinctes ¹⁰ ¹¹ ¹². Par conséquent, ces deux principaux sous-types sont caractérisés par différents pronostiques cliniques, avec la forme ABC présentant le plus mauvais pronostique (figure 4). En effet, sous traitement R-CHOP, de nombreux patients présenteront des rechutes ou un lymphome réfractaire à la chimiothérapie. Il est donc nécessaire de rechercher des traitements pour améliorer la guérison de cette pathologie. Dans cette optique, grâce à l'avènement des techniques de génomique haut débit sur les échantillons de patients, nous avons assisté à de profondes améliorations de notre compréhension moléculaire de cette pathologie. Ces études ont permis de découvrir l'implication de mutations récurrentes de facteurs de transcription ou de voie de transduction de signaux qui jouent un rôle fondamental dans la physiologie normale du lymphocyte B dans le centre germinatif, et qui deviennent de puissant oncogènes dans le DLBCL. Parmi ces voies moléculaires, la cascade signalétique NFkB a été décrite comme pouvant subir de nombreuses altérations génétiques. Les ABC-DLBCL montrent un phénotype et une signature moléculaire des lymphocytes B activés par un antigène et sur le point de se différencier en plasmocyte, mais dont le processus de différenciation serait bloqué par des altérations génétiques.

Centre de commandement du lymphome ABC : NFkB

NFkB est un terme regroupant un complexe de facteur de transcription jouant un rôle à la fois dans l'immunité innée et adaptative [¹³]. La voie NFkB permet la transcription de centaines de gènes impliqués dans des fonctions diverses, tels que la réponse immunitaire, la phagocytose, les réponses anti apoptotique, etc... Le complexe NFkB est composés de différentes sousunités cytoplasmiques, appartenant aux familles de protéines NFkB ou Rel (**figure 5**). Ces sousunités sont séquestrées dans le cytoplasme par l'inhibiteur de NFkB ou IkB. L'activité NFkB peut-être induite par 2 voies, l'une dite canonique et l'autre dite alterne, qui transmettent des signaux par différents complexes de dimère : soit des homodimères (exemple p65-p65), soit des hétéro-dimères tels p65/p50 et c-Rel/p50 (voie classique) ou RelB/p52 (voie alterne). L'activation chronique de la voie canonique est retrouvée dans le cadre des lymphomes ABC tandis que la voie alterne est retrouvée pour les lymphomes ABC GC (¹⁴).



Figure 5 : protéines de la voie NFkB et activation. A Schéma des protéines appartenant à la famille NFkB.**B** Schémas simplifiés des voies classique et alterne de la voie NFkB, avec les principaux dimères NFkB utilisées pour chacune des voies.

Rôle of NFkB dans le centre germinatif.

Dans les organes lymphoïdes secondaires, après contact avec son antigène spécifique via le B Cell receptor (BCR) et contact avec les molécules de co-activation des lymphocytes T helper folliculaires, l'activation d'un lymphocyte B folliculaire est rapidement suivie d'une importante expansion clonale qui donne naissance aux centroblastes qui constituent la zone sombre du centre germinatif (GC) (figure 6). NFkB joue déjà un rôle dans le procédé d'activation : il est activé de manière transitoire dans les cascades signalétiques du BCR et du CD40 récepteur afin de permettre la formation du centre germinatif [¹⁵¹⁶]. Dans la zone sombre, l'absence de présence nucléaire des sous-unités NFkB semble indiquer que la voie est ensuite momentanément éteinte lors de l'expansion clonale [¹⁷]. Les centroblastes vont ensuite migrer vers la zone claire du centre germinatif où ils arrêtent de proliférer pour entrer dans des processus de modifications des gênes d'immunoglobulines du BCR via le procédé d'hypermutation somatique, ceci afin d'augmenter leur affinité pour l'antigène rencontré [18]. Les centrocytes ainsi obtenus vont entrer en contact avec des lymphocytes T helper folliculaires et des cellules dendritiques folliculaires pour être sélectionnés sur l'affinité de leur BCR. Ces contacts cellulaires mettant à nouveau en jeu la voie NFkB (voie BCR et CD40R là encore [19 20].



Figure 6 : Activité NFkB dans le centre germinatif. La voie NFkB est activée dès la rencontre du lymphocyte B naïve avec son antigène spécifique (**Ag**). Le lymphocyte B se retrouve alors dans les organes lymphoïdes secondaires ou il va débuter la formation d'une structure spécialisée de la différenciation lymphocytaire B : le centre germinatif (**germinal center**). La

formation du centre germinatif débute au stade centroblaste (**CB**). Après le procédé d'hypermutation somatique (**SHM**), les lymphocytes ayant un BCR de haute affinité sont sélectionnés par les lymphocytes t helper folliculaires (**TfH**) et vont progresser dans leur différenciation (stade centrocytes [**CC**] et plasmoblastes [**PB**]). La différenciation de ces lymphocytes permet la génération de plasmocytes ou de de cellules B mémoires. Schéma adapté de Pasqualucci et al, "Genetic drivers of NF-κB deregulation in diffuse large B-cell lymphoma », Semin Cancer Biol. 2016.

Dans cette zone claire, les lymphocytes B proposant un réarrangement génétique fonctionnel et plus affin de l'antigène vont alors poursuivre leur différenciation, tandis que les cellules portant un BCR non fonctionnel ou peu affin de l'antigène seront soit redirigés vers la zone sombre, soit entreront en apoptose. [19-22]. Les cellules B poursuivant leur différenciation vont alors quitter le centre germinatif et auront deux devenir possible : soit une cellule B mémoire, soit se différencier en cellule plasmocytaire sécrétrice d'anticorps [^{23 24}]. La maintenance des centres germinatifs et la différenciation des cellules en plasmocyte sont des processus nécessitant la voie NFkB. En effet, en supprimant sélectivement les sous-unités NF-kB c-Rel ou p65 dans des lymphocytes de souris par un système cré-loxP, une équipe a pu mettre en évidence un rôle distinct de ces deux protéines. La déplétion génétique de c-Rel ne semble pas impacter la formation des centres germinatifs mais ces structures sont rapidement résorbés après stimulation T dépendante, menant à une diminution de la formation des cellules différenciée sécrétrice d'anticorps (²⁴). L'ablation génétique de p65 ne semble pas modifier la formation ni la maintenance des centre germinatifs, ni la maturation d'affinité des lymphocytes B. En revanche, l'ablation de p65 diminue la différenciation terminale des cellules B, car le nombre de plasmocytes et la sécrétion d'immunoglobuline est diminuée après une stimulation des souris avec un antigène T dépendant (²⁴). Ainsi, la délétion des sousunités effectrices de la voie NFkB impacte directement la différenciation B ; mais selon des mécanismes différents. Une explication à cela pourrait provenir du fait que ces sous-unités ne sont activées par les mêmes récepteurs (BCR, CD40R, TLR, etc...). NFkB joue un donc rôle biphasique : il est impliqué dans les étapes précoces d'activation B, mais également dans le centre germinatif pour la maintenance de ces structures et pour la différenciation terminale du lymphocyte B. Cette fine régulation NFkB est critique dans la physiologie du lymphocyte B du centre germinatif : celui-ci peut en effet réaliser plusieurs passages dans les zones claires et sombres du GC.). Grâce aux études de génomiques, on en sait un peu plus sur les mécanismes à l'origine de la dérégulation NFkB dans l'ABC-DLBCL.

Le rôle NFkB dans l'ABC -DLBCL.

Si l'activation NFkB est très contrôlée dans le centre germinatif, les cellules de lymphome ABC-DLBCL présentent un engagement constitutif et anormal de cette cascade de signalisation en lien avec des lésions génétiques multiples dans les gènes composant ou régulant la signalisation NFkB. Ces lésions sont parfois retrouvées en combinaison avec des mutations / translocations dérégulant des facteurs de transcription du centre germinatif (BcL6 or *PRDM1* [^{22,25,17,26}]. Les mutations dans la voie NFkB contribuent à la transformation néoplasique en induisant une hyper prolifération, une augmentation de la survie des cellules tout en empêchant la différentiation du lymphocyte B (voir chapitre : « autres lésions génétiques fréquemment retrouvées dans le ABC-DLBCL).

Lésions génétique menant à l'activation canonique NFkB.

Les premières preuves de cette activation ont été apportées par des études de profil génomique chez des patients ABC-DLBCL qui ont révélées un enrichissement significatif des gènes de la voie NFkB [²⁷]. De la même manière, ce concept a été renforcé par des études immunohistochimiques ayant montré une importante répartition nucléaire des sous-unités NFkB (p50/p65) dans les lymphomes ABC [¹⁴]. Enfin, les démonstrations d'inhibition pharmacologiques et/ou génétiques de la signalisation NFkB montre une toxicité sur les lymphomes ABC et non chez les lymphomes GC-DLBCL, renforçant l'idée de la dépendance du lymphome ABC à cette voie [²⁷,²⁸]. Les lésions génétiques activant la signalisation NFkB sont de deux ordres : i) les mutations activant la voie NFkB et ii) les mutations inhibant les régulateurs négatifs de NFkB. Ces mutations interviennent dans les deux voies d'activation du lymphocyte : la **signalisation du récepteur à l'antigène** dite voie **BCR** ainsi et la voie des **récepteurs Toll** dite **TLR (figure 7)**.



Figure 7 : Voies d'activation NFkB dans le lymphome ABC-DLBCL. Deux voies d'activation NfkB sont présentées, les voies des récepteurs à l'antigène (BCR) et la voie Toll like récepteurs (TLR). En rouge sont présentées les protéines fréquemment retrouvées mutées dans le lymphome ABC DLBCL.

La partie qui va suivre présente une revue large mais non exhaustive des mutations activant les voies NFkB dans le lymphome ABC-DLBCL, d'abord dans un contexte normal puis dans le lymphome ABC. Le but de cette partie est de resituer les composants moléculaires de ces voies afin de comprendre comment on peut cibler ces composants en thérapie dans le lymphome ABC.

Premier composant de la voie NFkB : la voie du BCR

Les lymphocytes B matures nécessitent un signal tonique du BCR pour leur maintien et leur survie dans l'organisme. En effet, il est décrit depuis longtemps que la déplétion du BCR au sein de lymphocytes B matures induit leur mort [²⁹]. De plus, une perturbation de la voie BCR dans des lymphocytes B induite par un KO de l'un de ces corécepteurs (CD45) ne perturbe pas la formation des centres germinatifs, mais réduit fortement la quantité de cellules sécrétrices d'anticorps et la persistance des centres germinatifs en réponse à un antigène T dépendant (³⁰). La fixation de l'antigène sur le BCR va engendrer une cascade de d'évènements moléculaires conduisant à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B.

Parmi les molécules effectrices de cette différenciation, on retrouve les sous-unités de la voie NFkB. Ces sous-unités sont initialement séquestrées dans le cytoplasme par IkBα (NFkB inhibitor alpha) et le moyen de séparer l'inhibiteur des sous unités est son activation par phosphorylation par le complexe IKK (IkB Kinase).

Le complexe BCR est composé d'une immunoglobuline membranaire (IgM) accolé de manière non covalente à deux hétérodimère : **CD79A** et **CD79B (figure 8)**. Lors de la liaison antigène – immunoglobuline, les résidus tyrosine cytoplasmiques contenus dans les motifs ITAMS des CD79Aet B sont phosphorylés par les kinases de la famille SRC : **Lyn** et **Syk**. Cette phosphorylation mène au recrutement d'autres kinases (Bruton tyrosine kinase ou **BTK**, la guanine exchange factor **Vav**), l'ensemble étant lié par des protéines adaptatrices (**GrB2** et **BLNK**). Le recrutement de l'ensemble de ces kinases forme un premier complexe de signalisation dit proximal, car à proximité du BCR. A ce stade, une source d'amplification du signal peut venir de la capacité des BCR à s'agréger entre eux.



Figure 8 : Schéma des protéines participant à la voie du BCR. Après liaison BCR-antigène spécifique, un complexe de kinases est recruté à proximité des chaines cytoplasmiques de CD79 A et B. via les adaptateurs BLNK et GrB2. La protéine PLCγ2 est ensuite recrutée pour catalyser la formation de l'inositol tri1-4-5 phosphate (IP3) et du DAG à partir du phosphatidylinositol bi4-5phosphate (PIP2). Le DAG peut activer la PKCβ puis CARD11.

La formation de ce complexe proximal associé au BCR permet le recrutement de la phospholipase Cy2 (**PLCy2**), recruté via son domaine SH2 par BLNK [¹⁹]. Le recrutement de la PLCy2 dans ce complexe proximal permet sa double phosphorylation activatrice, menant à la production du second message diacylglycerol (**DAG**) et de l'inositol tri1-4-5 phosphate (**IP3**) à partir du PIP2membranaire (phosphatidylinositol bi4-5phosphate) [¹⁸]. Le DAG est un activateur de la **PKC** β (protein kinase C β), kinase responsable de la suite de la transduction de signal. La génération de l'IP3 permettra un ensemble d'efflux calciques renforçant le signal d'activation du lymphocyte B, notamment en permettant l'activation des calcineurines favorisant la phosphorylation de NFAT pour son transport nucléaire [26].

La PKCβ transmet le signal à une nouvelle protéine de la famille CARMA (caspase-recruitment domain (CARD)–membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein 1), **CARD11** (³¹). Cette protéine joue un rôle d'échafaud pour un complexe important de la signalisation du BCR : le complexe CBM ou CARD11-BcL10-MalT1. La PKC réalise en effet de multiple phosphorylation de la protéine CARD11 dans son domaine PRD (PKC regulated domain). Cette multiple phosphorylation permet un changement de conformation de CARD11, permettant la libération des domaines « coiled-coil » CC et CARD (**figure 9**). Le domaine CC servira de plateforme d'oligomerisation avec d'autres CARD11 activés tandis que la libération du domaine CARD permet l'association avec les autres protéines du complexe de signalisation CBM: **BcL-10** et **MALT1**. BcL10 est recruté via le domaine CARD tandis que MALT1 s'associa à BcL10 par son domaine N-terminal immunoglobuline (**figure 9**).





Figure 9 : Signalisation CBM. La protéine PKCβ permet la phosphorylation multiple du domaine PRD de CARD11 (**a**). La protéine CARD11 va alors se déployer pour exposer ses domaines CC et CARD (**b**), ce qui permettra l'association de plusieurs protéines CARD11 entre elles (**c**). Les protéines CARD11 pourront de même s'associer entre elles par le biais du domaine GUK (**d**). Schémas repris de la revue de Rawlings et al, "The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes." Nat Rev Immunol. 2006.

Ce complexe CBM permet ensuite de recruter un ensemble de protéines impliquées dans la l'activation des **IKK** (IkB Kinase). Ces protéines sont essentiellement des protéines de type ubiquitine ligase E3 (**TRAF2** et **TRAF6**), ou des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (UBC13, UEV1A). La liaison TRAF6 - MALT1 permet l'auto activation de l'activité K63 ligase de TRAF6. Cette auto-ubiquitination est capitale pour le recrutement des autres protéines de signalisation puisque qu'elle permet de recruter les « ubiquitin binding protein » TAB2 et 3 (TAK1-binding protein 2 ou 3) du complexe TAK1 (transforming-growthfactor- β -activated kinase 1) et surtout le complexe IKK. Le complexe IKK, est composé des protéines **IKK** α , β et γ (NEMO) (**figure 10**). IKK α , β comportent l'activité kinase de IkB α , tandis que NEMO est une « ubiquitine binding protein » : cette fonction permet le rapprochement avec le complexe CBM / TRAF6. Deux évènements s'enchaînent alors : le reculement de IKK γ à proximité de TRAF6 permet la K63 ubiquitination nécessaire à son activation. L'activation de IKK γ entraine ensuite l'activation de TAK1 qui lui-même active IKK β par phosphorylation aux Sérines S177 et S181 [³²].



Figure 10 : Signalisation BCR post formation du complexe CBM. La liaison TRAF6 MALT1 permet l'auto activation de la fonction ubiquitine ligase de TRAF6 (**A**). Un ensemble de complexe est ensuite recruté au BCR (complexes TAK1 et IKK, **A et B**), notamment le complexe IKK. Schémas repris de la revue de Rawlings et al, "The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes." Nat Rev Immunol. 2006 et de Iwai et al, Diverse ubiquitin signaling in NF-κB activatio » Trends Cell Biol. 2012³³.

Enfin, cette activation par phosphorylation des IKK permet la phosphorylation d'IKbα aux serines S32 et S36. Cette phosphorylation permet la dégradation protéasomale de IkBa et libère les sous-unités NfkB actives pour la transcription.

Rétrocontrole :

Le rétrocontrôle de l'activité de la voie BCR s'effectue à plusieurs niveaux, comme schématisé dans la **figure 11**.

CYLD/A20. Dans un premier temps, l'activation étant dépendante d'un grand nombre de signaux d'ubiquitination, deux ubiquitinases interviennent dans la diminution de signalisation CBM. C'est le cas de : CYLD (tumour-suppressor cylindromatosis protein) et de TNFAIP3 ou A20 (TNF Alpha Induced Protein 3). Ces deux protéines catalyse la K63 desubiquitination des protéines IKKy/TRAF2/TRAF6 (CYLD) et TRAF2 / TRAF6 (A20), permettant une première inhibition du complexe CBM (³¹).



Figure 11 : Rétrocontrôle de la voie BCR. Le rétrocontrôle peut s'effectuer à plusieurs niveaux, à travers les enzymes de désubiquitination CYLD et A20, le clivage de BcL10 par MALT1, et la phosphorylation des tyrosines 196 (Y196) des corécepteurs CD79.

PPA2. Deuxièmement, la protéine CARD11 va être déphosphorylée par PP2A afin que celle-ci perde son rôle d'échafaud de la signalisation CBM (³⁴).

MALT1. Enfin, la protéine MALT1 a été décrite comme comportant une activité protéase de la protéine BcL10, inhibant là encore l'échafaudage du complexe CBM (³⁵).

Lyn. Enfin, les corécepteurs du BCR ; CD79A et B comportent dans leurs chaines cytoplasmique de transduction du signal un résidu tyrosine clef : la tyrosine 196. Celle-ci, phosphorylable par Lyn, est responsable de l'internalisation du BCR et donc de la diminution de cette voie (³⁶). En effet, des souris déficientes pour la protéine lyn succombent rapidement d'un syndrome autoimmun lié à l'activation de la voie du BCR (³⁷).

Un certain nombre de ces mécanismes pourront être dérégulés dans le lymphome et conduire à une activation chronique de la voie CBM.

Mutation des composants de la voie du BCR

L'équipe de Louis Staudt a décrit depuis de nombreuses années un ensemble de mécanismes oncogénique de la voie BCR, et révélé que cette voie était activée de manière chronique. Tout d'abord, une analyse microscopique montre que les cellules de lymphomes exhibent de multiple micro-clusters BCR à leur surface, clusters très similaire à ceux retrouvé lors de l'activation lymphocytaire B normale [³⁸]. Cette activité BCR repose sur les mutations de différents effecteurs de la voie BCR : les protéines proximales CD79 β et α (mutées chez 20% des patients) et la protéine adaptatrice CARD11 (9% des patients) (Schéma).

CD79 α **et** β . Les mutations CD79 α et β sont des modifications du résidu tyrosine 196 dans leurs motifs ITAMs (Y196H, Y196N, Y196C, Y196F, Y196S par ordre de fréquence de mutation), ou encore la délétion de trois paires de base contenant ce motif. Comme vu précédemment, la phosphorylation de ce résidu agit comme un rétrocontrôle négatif de l'internalisation du BCR. Sa mutation le rend donc « signalétiquement actif ». A noter que ces modifications CD79 sont une caractéristique importante et quasiment spécifiques des lymphomes ABC (20% des patients), car les autres lymphomes ne comportent pas ou peu cette mutation (3.1% des GC-DLBCL, 0% des lymphomes de Burkitt ou MALT1). L'ensemble de ces modifications dans les cellules activent donc la signalisation BCR dans les lymphomes ABC en maintenant à la membrane le BCR : c'est donc une signalisation chronique du BCR. C'est suite à l'identification de cette mutation que l'équipe de Louis Staudt s'est attaché à éteindre par interférence à ARN (shRNA) les protéines CD79 dans des lignées de lymphomes ABC. Leurs expériences ont alors montré une réponse surprenante : toutes les lignées activées au niveau de la voie BCR ne sont pas sensible à l'inhibition de CD79. En effet, il existe une autre mutation de cette voie qui peut entrainer la signalisation BCR : la mutation CARD11.

CARD11. La mutation CARD11 a été identifiée en 2008 dans le domaine coiled-coil, domaine favorisant l'oligomerisation de cette protéine. Cette mutation est retrouvée chez 9.6% des patients ABC, 3.8% des patients GC et non dans les lymphocytes MALT possédant tout de même une activation NFkB. Cette protéine mutée est assimilable à une oncoprotéine (i.e. capable d'induire une transformation tumorale) (³⁹). En effet, son expression dans des lignées de lymphocyte T immortalisés (Jurkat) qui ne possèdent pas CARD11 endogène permet

18

l'activation spontanée de la voie NFkB. De même, le shRNA dirigé contre CARD11 est toxique pour toutes les cellules ABC activées par la voie BCR (même les CARD11 WT) (⁶).

A20. Presque un tiers des lymphomes ABC possèdent une mutation ou délétion bi-allélique du gène TNFAIP3 (¹⁴). Comme décrit précédemment, la protéine A20 est capable d'enlever les chaines K63 ubiquitine des composants BCR. On comprend que sa mutation mène alors à une activité prolongée et inappropriée de la voie NFkB. A ce propos, l'activité suppresseur de tumeur de A20 a été démontrée en reconstituant l'expression de A20 dans des lignées de lymphomes mutées pour A20, menant à la relocalisation cytoplasmique des sous-unités NFkB, à la baisse d'activité de NFkB et à l'apoptose des cellules de lymphome (⁴⁰).

LUBAC. Dernier point pouvant jouer sur la voie BCR : le polymorphisme d'une des protéines du complexe LUBAC. Ce complexe d'assemblage linéaire des chaines d'ubiquitine (linear ubiquitin chain assembly complex or LUBAC) comprend 2 E3 ligases, HOIL-1 and HOIP, et SHARPIN (⁴¹). Ce complexe gouverne en partie l'activation NFkB dans les lignées de lymphome en se liant au complexe CBM via BcL10 et MALT1 afin de renforcer l'ubiquitination de IKKy (⁴²). Un des composants de ce complexe, RNF31 ou HOIP comporte des polymorphismes (SNPs) qui sont fréquemment retrouvés dans les lymphomes ABC. L'inhibition de LUBAC par shRNA de HOIP est suffisante pour induire une toxicité dans les cellules ABC en culture. Si ce complexe ne semble pas comporter de proto-oncoprotéines, les SNPs peuvent en revanche prédisposer un individu à ce genre de cancer [⁴³].

On notera que d'autres cas de lymphomes comportant une activation du BCR existent sans pour autant comporter des mutations dans les gènes codant pour les protéines de la voie canonique BCR (⁴⁴). En effet, certaines pathologies comportent une voie BCR dite tonique, notamment retrouvée dans certain cas de lymphome de Burkitt ou dans les GC-DLBCL. Dans ces lymphomes, l'activité NFkB est liée à l'activité de la voie PI3K probablement issue d'un stimulus BCR. Dans le lymphome de Burkitt, ce stimulus BCR est induit par des mutations des protéines TCF3 ou son régulateur négatif ID3, menant à l'hyperactivité de TCF3 (⁴⁵). Le facteur de transcription TCF3 permet la transcription des gènes d'immunoglobulines ; menant à une forte expression BCR à la surface des cellules de lymphome de Burkitt. De la même manière, les lymphomes GC comportent parfois cette activation tonique BCR liée à la protéine PI3K. Cette activité PI3K s'explique par la mutation dans 50% des cas de PTEN, un régulateur négatif de PI3K. Un inhibiteur chimique de PI3Kδ and PI3Kα (copanlisib) permet d'induire une réduction de croissance tumorale in vivo sues les lignées ABC-DLBCL dépendante et indépendante de la voie BCR (⁴⁶).

Deuxième composant de la voie NFkB : la voie TLR

Les Toll like récepteurs (TLR) appartiennent à la classe des PRR (pattern recognition receptors) et sont hautement exprimés par les cellules immunitaires, où ils permettent la détection des pathogènes et l'initiation de la réponse immunitaire innée et adaptative. On les classe en deux grandes familles selon leur localisation : les TLR à la surface des cellules (TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10) et les TLR intracellulaires localisés dans les endosomes (TLR3, 7, 8, 9, 11/12 et 13) (47). Les TLR membranaires sont impliqués dans la reconnaissance des composants des membranes microbiennes (lipides, lipoprotéines, protéines) tandis que les TLR des endosomes sont chargés de la reconnaissance des acides nucléiques issus de virus et de bactéries ou du soi (TRL 3, 7, 8, 9, 13 et 11/12) (47). Après activation, les TLR vont s'hétéro ou s'homo dimeriser afin d'induire le recrutement des protéines adaptatrices contenant un motif TIR domaine, tel que Myd88, TRIF, TIRAP/MAL ou TRAM. Tous les TLR vont activer la voie NFkB et provoquer une réponse pro inflammatoire, selon une voie dépendante de Myd88 ou dépendante de TRIF (⁴⁷). L'activation de la voie NFkB est importante pour déclencher une réponse immunitaire innée de même que pour le développement d'une réponse adaptative à un pathogène donné. L'activation TLR peut aussi mener à une réponse antivirale. En effet, les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 reconnaissent des acides nucléiques viraux et induisent une réponse antivirale médiée par l'interféron de type I. Ces récepteurs sont en effet capables d'activer des IRF ou Interferon Response Element qui vont fonctionner comme transducteurs de signal antiviraux. TLR3 et TLR4 vont activer IRF3 et IRF7 (⁴⁸) tandis que TLR7 et TLR8 vont activer IRF5 et IRF7 (⁴⁹.)

Tous les TLR sauf TLR3 utilisent Myd88 comme protéine adaptatrice. Certains TLR peuvent avoir une adaptation du signal par TRIF. C'est le cas de TLR3 et TLR4 ou l'association se fait soit directement (TLR3) soit indirectement via TRAM (TLR4) (⁴⁷). La voie TRIF mène à une signalisation alternative (voie de l'IRF3) et à l'induction d'une réponse inflammatoire antivirale médiée par l'IFN type I. Ainsi, en fonction de l'adaptateur choisi, la voie TLR est divisée en 2 voies de signalisation : la voie dépendante de Myd88 et la voie dépendante de TRIF.

Dans le lymphome, si une activation chronique TLR a été démontrée depuis une dizaine d'année, aucune implication TRIF n'a encore été rapportée. On s'intéressera alors à la voie

dépendante de Myd88. En effet, la suppression de Myd88 par shRNA est toxique pour la plupart des lignées ABC-DLBCL (⁵⁰) mais non pour les GC-DLBCL. Cette voie est de plus dépendante du TLR9 puisque le screening par CRISPR dans les lignées de lymphome pour tous les TLR montre que seule la suppression génétique de TLR9 semble toxique pour les cellules ABC-DLBCL (AACR 2017 - Louis Staudt on CRISPR-Cas9 screen in lymphoma : Mechanisms of oncogenic signaling and therapeutic resistance in lymphoma revealed by CRISPR-Cas9 screens).

La protéine Myd88 est composée de différents domaines (**figure 12**) : un domaine C-terminal de type TIR (Toll IL-1R) qui est responsable de la liaison avec d'autres protéines contenant des domaines TIR, notamment les TLR. Le domaine N-terminal comporte le death domain (DD), domaine permettant l'association avec d'autres protéines comportant les domaines DD. C'est notamment le cas des protéines IRAK (IL-1R-associated kinase). Il a été montré que la surexpression de ces domaines DD peut mener à l'activation spontané de la voie NFkB et JNK (⁵¹). Le domaine intermédiaire INT (INTermediate domain) bien que ne comportant pas d'interaction directe avec d'autres protéines de signalisation, reste indispensable à l'activation d'IRAK4. En effet, l'épissage alternatif de Myd88 donnant une protéine dénué du domaine INT et nommé Myd88s, est induit durant l'activation TLR et sert de régulateur négatif de Myd88 (⁵².).





Après activation, l'initiation de la transduction de signal Myd88 se fait par la formation d'une plateforme moléculaire appelée Myddosome et constituée de Myd88, IRAK4 et IRAK2. (**figure 13**). Le Myddosome a été cristallisé récemment et montre la formation séquentielle d'une plateforme composée d'un anneau de 6 Myd88, reposant sur un anneau de 4 IRAK4 et 2 IRAK2 interagissant par leur domaine DD (⁵³ et ⁵⁴). La formation de ce complexe semble critique dans la suite de la transduction du signal. En effet, le rapprochement de IRAK4 dans un complexe protéique permet de rapprocher les domaines kinase de IRAK4, menant à son

autophosphorylation (⁵³). La formation du Myddosome permet ensuite le recrutement d'IRAK1, et son rapprochement auprès d'IRAK4 activé permet la phosphorylation d'IRAK1.



Figure 13 : Cristallisation et modélisation de la formation du Myddosome. La structure de la conformation du myddosome est présentée en **A** tandis que la structure théorique est présentée en **B**, avec le code suivant : **M** = Myd88, **I4** = IRAK4, **I2**= IRAK2. D'après Lin et al, Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. Nature. 2010.

IRAK1 phosphorylé entre en interaction avec TRAF6 (⁵⁵), menant à l'activation de TRAF6 et son auto K63 ubiquitination (⁵⁶). Comme dans la signalisation BCR, TRAF6 ubiquitiné est ensuite reconnu par les sous-unités TAB2 et 3 du complexe TAK1, activant ce complexe. Ce complexe va alors phosphoryler IKK β , résultant en l'activation de la voie NFkB (**figure 10**).

A noter que si, dans la voie du BCR, TRAF6 semble lié directement au complexe membranaire CBM lors de son rôle de transducteur de signal, il est séparé de cette partie membranaire lors de la transduction par Myd88. En effet, le complexe [TRAF6-TAK1-TAB2-TAB3) est détaché du Myddosome via le clivage de IRAK1. Le clivage de IRAK1 est médié par la F-box protein β -transducin repeat-containing protein (β -TrCP), qui reconnait la protéine IRAK1 phosphorylée, effectue sa K48-ubiquitination et dégradation **figure 14** (⁵⁷).



Figure 14 : Dégradation de IRAK1 par B-TrCP lors de la signalisation TLR.

Rétrocontrole :

La voie TLR possède de nombreux rétrocontrôles négatifs permettant d'éviter une réponse immunitaire excessive.

SOCS1. SOCS1 est une protéine synthétisée directement à la suite d'un signal TLR, ou indirectement par les voies IFNβ ou IL-6. De nombreuses publications présentent la SOCS 1 comme un rétrocontrôle négatif de la voie TLR. Cependant, les mécanismes exacts favorisant ce rétrocontrôle restent sujets à débat. Un des mécanismes admit serait que SOCS1 possède un domaine SH2 capable d'interagir avec de nombreuses protéines dont IRAK1 et TIRAP/MAL. Cette interaction mènerait dans les deux cas à la dégradation protéasomale de IRAK1 et MAL, régulant donc l'activation TLR (⁵⁸). En effet, après stimulation TLR, la phosphorylation d'IRAK1 est un signal d'ubiquitination menant à sa rapide dégradation et donc l'inhibition de la voie TLR (⁵⁹).

SYK / Cbl-b. Il a été montré que la protéine SYK est capable d'interagir et de phosphoryler Myd88 et TRIF (⁶⁰). Cette phosphorylation induite par cette SRC kinase permet l'association avec Cbl-b. En effet, le domaine tyrosine kinase–binding (TKB) en C-terminal de Cbl-b se lie spécifiquement à des résidus tyrosines phosphorylés de sa protéine cible, conduisant ensuite à sa dégradation par les sous-unités 26S du protéasome.

CYLD/ A20. : Comme précédemment décrit dans le chapitre sur le rétrocontrôle de la voie BCR, CYLD et A20 catalysent la K63 desubiquitination des protéines IKKy/TRAF2/TRAF6 (CYLD) et TRAF2 / TRAF6 (A20), permettant une première inhibition des complexes de signalisation TLR.

Myd88s. Cette protéine est issue de l'épissage alternatif de l'exon 2 de Myd88, résultant en une protéine de 27kD ne comportant pas le domaine intermédiaire (ID) de la forme longue de Myd88 (⁶¹). Cette protéine a été décrite comme induite dans des macrophages à la suite d'une stimulation prolongée par le LPS. Myd88s se comporte comme un dominant négatif de Myd88 : même si Myd88s est toujours en capacité de se lier aux IRAK, il ne semble pas qu'il y ait d'induction d'autophosphorylation d'IRAK4 et donc plus d'activation de la voie NFkB. A noter que cette modification de splicing a été induite artificiellement dans des cellules immunitaires de souris en les transfectant avec des oligonucléotides anti-sens modifiés (ASO ISIS 337846) (⁶²). Cette stratégie, si elle est transposable à l'homme, pourrait être intéressante dans le cadre de traitements de pathologies dépendantes de la voie Myd88.

On notera que les points de rétrocontrôle cités précédemment sont les principaux utilisés par les cellules immunitaires pour inhiber la voie TLR. Il existe cependant bien plus de mécanismes responsables de cette inhibition, tel que l'endocytose des récepteurs, la synthèse protéines (phosphatases SHP-1 et SHP-2, ubiquitinases) ou même une régulation transcriptionnelle par des ARN non codants (miRNA tel que le mir146a ciblant TRAF6 et IRAK1, et le mir155 ciblant Myd88, TAB2 mais aussi SHP-1) (⁶³).

Mutation de la voie TLR : Myd88

Identifiée en 2011, la mutation Myd88 a été identifiée chez plus de 30% des patients porteurs d'un lymphome ABC. Elle est plus rarement retrouvée dans les lymphomes MALT (9%, gastric mucosa-associated lymphoid tissue [MALT] lymphoma) et n'est pas retrouvée dans les lymphomes GC-DLBCL. Il s'agit d'une substitution d'acides aminés dans le domaine TIR de Myd88, la plus fréquente étant la substitution L265P (29% des DLBCL) (⁵⁰). La mutation L265P intervenant dans le feuillet béta hydrophobe du domaine TIR Myd88, provoquant une distorsion du domaine TIR de Myd88 qui induit son association avec les IRAK4/1, l'activation d'IRAK4 de manière spontanée et donc l'induction subséquente de la voie NFkB (⁵⁰). Cet assemblage spontané du myddosome en l'absence de stimulus cellulaire est lié à

l'oligomérisation des domaines TIR Myd88 L265P mais également d'hétéro dimères avec des Myd88 WT, l'ensemble de ses oligomères étant capable d'activer la voie NFkB. (⁶⁴). Principalement hétérozygote chez les patients, la mutation L265P est une mutation de type « gain of function », car induisant la signalisation NFkB, l'activation de l'axe pro-survie IRF4 / SPIB et l'induction d'un axe JAK2/Phospho STAT3 constitutif via l'expression des cytokines IL6 et IL10 (^{50 65}). On notera que cette mutation peut coexister avec d'autres mutations de la voie NFkB : 34% des patients présentent une coexistence des CD79/Myd88 mutations, alors que 18% seulement des patients présentent une mutation Myd88 seule.

Impact des mutations NFkB sur le pronostique clinique des patients ABC

D'une manière générale, les mutations activatrices de la voie NFkB sont de mauvais pronostic pour les patients porteurs d'un lymphome ABC. En effet, l'équipe de Fabrice Jardin s'est intéressé à la survie des patients en fonction de leur statut mutationnel NFkB. Dans une première étude, il montre que la survie globale à trois ans sous R-CHOP de patients porteur d'au moins une des mutations activatrice NFkB (Myd88, CARD11 ou CD79A/B) est de 26.1% comparée à des patients ne disposant pas de ces mutations (66.7%, **figure15**) (⁶⁶).



Figure 15 : Survie globale des patients sous traitement R-CHOP en fonctions de leur mutation des protéines de la voie NFkB (CARD11, Myd88 ou CD79A/B) ou sans mutation de la voie NFkB. D'après Bohers et al, "Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma" Genes Chromosomes Cancer. 2014.

Plus récemment, ils se sont intéressés à l'impact de chacune des mutations sur la survie des patients DLBCL. Tout d'abord, on notera que les mutations CARD11 et TNFAIP3 ne semblent pas impacter la survie des patients, données corrélées à d'autres études (^{67 68}). Concernant Myd88, il a été publié par groupe coréen que le niveau d'expression de la protéine sauvage,

comporte déjà une incidence sur le pronostique clinique. En effet, les patients possédant une expression forte de Myd88 sauvage présentent une moins bonne survie sans progression (⁶⁹). S'il l'on s'intéresse aux patients porteur d'un lymphome ABC à Myd88 sauvage comparée au Myd88 mutés (L265P ou non L265P) mais <u>sans tenir compte des autres mutations</u>, leur survie globale et survie sans progression n'est pas différente (⁷⁰) (**figure 16**), panel gauche). Ce constat est contrasté quand on s'intéresse au statut mutationnel Myd88 <u>et</u> CD79 : les doubles mutations CD79B / Myd88 L265P engendre une survie générale meilleure qu'une mutation MyD88 L265P avec un CD79 WT (**figure 16**, panel centre). Ceci tend à montrer que le pronostic clinique des patients ne peut se résumer à l'étude d'une seule mutation, mais à un ensemble d'entre elles.



Figure 16 : Survie globale des patients sous traitement R-CHOP en fonctions de leur mutation des protéines de la voie NFkB (Myd88 ou CD79A/B). Figures adaptés de Dubois et al, "Biological and clinical relevance of associated genomic alterations in MYD88 L265P and non-L265P mutated diffuse large B-cell lymphoma: analysis of 361 cases" Clin Cancer Res. 2017

On pourrait alors penser que l'expression seule de Myd88 muté peut donner lieu au développement du DLBCL. Une équipe s'est alors intéressée à la conséquence de la surexpression de Myd88 sauvage ou Myd88 L265P dans des lymphocytes de souris activés (⁷¹). La surexpression des protéines Myd88 sauvage ou L265P est faite par transduction lentivirale dans des lymphocytes B de souris activés. Si la surexpression de Myd88 sauvage n'a pas de conséquence, la prolifération in vitro des lymphocytes B transduits avec Myd88 L265P est augmentée, mais seulement sur courte période de temps (3 jours). De même, lorsque réinjecté dans la souris, seul les lymphocytes exprimant Myd88 L265P vont s'expendre dans la circulation périphérique, mais leur nombre va ensuite diminuer après 10 jours. En effet, la prolifération induite par Myd88 est très vite contrebalancée par l'expression importante de
A20 (TNFAIP3) dans ces lymphocytes. Cette même équipe a ensuite voulu confirmer ces résultats dans un modèle de souris développant des pathologies B auto-immunes. Dans ce modèle, ils ont extrait les lymphocytes B de ces souris, les ont activés in vitro et transduits avec les vecteurs Myd88 WT ou L265P, puis réinjectés dans les mêmes souris. Les résultats montrent que l'expression seule de la mutation Myd88 L265P ne provoque pas l'accumulation de lymphocytes auto réactifs. Il faut pour cela induire la surexpression concomitante de BcL2 pour induire une accumulation des lymphocytes auto-réactifs. Cela prouve deux choses : la protéine Myd88 est un gène important mais non suffisant à la transformation tumorale, et que le statut mutationnel ainsi que le niveau d'expression des protéines oncogénique présenté par les patients doit être fait sur un large panel de gêne afin de cerner au mieux le sous-type activé qu'ils développent pour apporter un protocole clinique adapté.

Les résultats des séquençages de l'équipe de Fabrice Jardin peuvent potentiellement expliquer pourquoi les patients Myd88 mutés seuls ont un pronostique plus mauvais que les patients mutés pour Myd88 et CD79. En effet, leurs séquençages réalisés dans le cadre du projet LYSA montrent que les patients disposant de la mutation L265P présente généralement un enrichissement pour d'autres lésions génétiques : les délétions de CDKN2A/B, TNFAIP3, and PRDM1. Les mutations activant la voie NFkB ne sont donc pas des marqueurs « indépendants » de pronostic. En effet, la présence d'autres lésions génétiques sont aussi à l'origine de l'expansion clonale des cellules de lymphomes (voir ci-après). Ceci pourrait aussi expliquer pourquoi les patients ABC présentant un CD79B muté ont une survie globale meilleure que ceux portant un CD79B WT (OS de 70% pour CD79B mutés et 40% pour les CD79 WT, **figure 16**, panel droite).

Autres lésions génétiques fréquemment retrouvées dans le lymphome ABC. Dans ce chapitre, on reviendra rapidement sur quelques mutations responsables de l'expansion de cellules de lymphomes.

PRDM1 et BcL6. Lors de la différentiation normale des lymphocytes B, la transition du lymphocyte du centre germinatif vers le plasmocyte est liée à l'expression du gène PRDM1. L'expression de ce gène est induite lors de la différentiation par i) la diminution de l'expression du gène BcL6 qui est un répresseur de PRDM1 et ii) par l'environnement cytokinique autour du lymphocyte B. Environ 80% des lymphomes ABC présente une absence d'expression de

blimp1 (protéine codée par PRDM1) (⁷²). Pour 25% des cas, ceci est lié à l'apparition de mutations inactivatrices du gène PRDM1 (troncatures, mutations non-sens, délétions) (⁷²). Cependant, 53% des cas de lymphome négatif pour l'expression de Blimp1 ne présentent pas de lésion génétique de PRDM1. Ceci est lié à la grande prévalence de mutation de l'inhibiteur de PRDM1 : BcL6. Le domaine codant du gène BcL6 subit fréquemment des translocations lors des processus de recombinaisons génétiques, résultant en un gène de fusion donnant une expression constitutive de BcL6 (⁷²). De même, l'expression constitutive de BcL6 réprime l'expression de certains facteurs clefs de la différenciation B (AID, SPI1, IRF8, MYB). A noter que la translocation seule de BcL6 sans altérations du gène PRDM1 existe pour 26% des cas de lymphomes ABC (⁷²).

CDKN et cycle cellulaire. Les délétions du locus INK4/ARF sont plus fréquemment retrouvées dans les lymphomes ABC DLBCL, environ 20 à 30% des cas (¹²). Ce locus code pour trois gènes suppresseurs de tumeurs (CDKN2B, ARF et CDKN2A), où CDKN2A est un inhibiteur des kinases associées à la cycline D, tandis que ARF est une protéine stabilisatrice de TP53 (⁷³). La signature génique des lymphomes comportant de telles délétions est caractérisée par une dérégulation de l'axe RB/E2f, soit une activation générale des signalisations du métabolisme cellulaire (⁷³). Ces lésions sont de très mauvais pronostique pour les patients porteurs de lymphomes ABC sous RCHOP (⁷⁴).

P53. La mutation du gène TP53 est retrouvée chez environ 20% des patients ABC et comporte des conséquences sur le pronostic clinique. En effet, cette mutation est dite « perte de fonction » puisqu'elle se produit souvent sur le site de liaison de p53 à l'ADN, empêchant cette protéine de provoquer la mise en place de la mort programmée.

Modifications de chromatine. Retrouvées dans 30% des cas, elles sont plutôt des marqueurs des lymphomes GC. Ces lésions concernent des mutations / délétions de protéines modificatrices d'histones : des histones acétyl-transférases (CREBBP and EP300) ou d'histones triméthyl-transférases (MLL2) (⁷³ and ¹⁰). Les inactivations de CREBBP et EP300 ne permettent plus l'acétylation des protéines BcL6 et p53, menant à l'activation de constitutive de BcL6 et la diminution de fonction de p53 (⁷⁵).

Checkpoint inhibitors / réponse immunitaire. L'échappement à la surveillance du système immunitaire est souvent retrouvé dans les cas de tumeurs DLBCL, et met en jeu deux mécanismes :

- La perte des molécules transmettant la toxicité des cellules immunitaires. Une des plus fréquentes est la perte d'expression du CMH1 par la mutation des gènes de β2 microglobuline (⁷⁶). Il résulte de cette mutation une perte de l'expression du CMH1 sur les cellules de lymphomes et une incapacité des cellules T cytotoxiques et des cellules NK à éliminer les cellules tumorales. De la même manière, environ 15% des lymphomes ABC perdent l'expression de CD58, molécule responsable de la toxicité cellulaire médiées par les lymphocytes T et cellules NK après reconnaissance par le CD2 (⁷⁶). De la même manière, la perte d'expression de Fas par les cellules DLBCL a aussi été documentée pour 5 à 15% des patients (⁷⁷).
- L'expression augmentée des molécules immunosuppressives ou la perte d'expression des molécules de co-stimualtion. En effet, un certain nombre de cas de DLBCL présentent une perdre l'expression du TNFSF9 (12% des cas ⁷⁸) et TNFSF14 (20% des cas ⁷⁹), des molécules co-activatrices T.

Lymphomes c-Myc et BcL2 double positif. Myc est un facteur de transcription comportant de nombreuses fonctions cellulaires (croissance cellulaire, prolifération, angiogenèse, synthèse protéique) tandis que BcL2 est une protéine anti-apoptotique car limitant l'action des molécules pro-apoptotiques en interagissant avec leur domaine BH3 (⁸⁰). L'expression augmentée des protéines c-myc et BcL2 sont d'assez mauvais pronostique dans les lymphomes DLBCL (⁸⁰). On distingue deux types de sur-expression : des translocations (Myc seul et BcL2 seul ou les deux) ou des multiples copies des gênes en question (⁸⁰). Les cas de double translocation Myc BcL2 sont particulièrement de mauvais pronostique mais semble plus un marqueur des lymphomes GC, tandis que les lymphomes ABC présentent principalement des amplifications de ces deux gènes. Dans ce cas les lymphomes ABC sont donc qualifiés de DEL pour « Double Expressor Lymphoma ». Les lymphomes ABC DEL sont de bien plus mauvais pronostic puisque les traitements R-CHOP sont moins efficaces (⁸¹). Les lymphomes ABC-DLBL peuvent donc présenter un ensemble de mutations différentes, touchant à des processus cellulaires différents. On comprend alors qu'il ne peut exister une

thérapie universelle applicable dans les cas de lymphomes ABC-DLBCL. Nous allons maintenant aborder les chapitres présentant la thérapie actuelle du lymphome B et les molécules en développement qui pourront permettre de traiter le sous-type ABC-DLBLC.

Thérapie des lymphomes DLBCL :

Traitements standards. Le premier protocole utilisé par les cliniciens est l'administration tous les 21 jours en intraveineuse du traitement R-CHOP. La chimiothérapie comporte des poisons du fuseau (vincristine [Oncovin[®]]), des corticostéroïdes (Prednisone), des agents alkylants (Cyclophosphamide) ou intercalant de l'ADN (Hydroxyadriamycine). A ce cocktail de molécules s'ajoute un anticorps monoclonal ; le Rituximab ; dirigé contre une protéine extracellulaire présente à la surface de toutes les cellules de la lignée B : le CD20. Cet anticorps va médier une mort des cellules CD20+ via des mécanismes d'ADCC (cytotoxicité médié par les anticorps) ou de CDC (cytotoxicité médiée par le complément). On notera que plusieurs génération d'anticorps anti CD20 existent, ces générations visant à i) humaniser de plus en plus les anticorps afin de limiter leur immunogénicité mais aussi à ii) augmenter leur activité via la modification de leur partie constante (82). On citera ici les ocrelizumab, veltuzumab et ofatumumab pour les secondes générations déjà utilisées en clinique. Dans les cas de lymphomes plus agressifs, des protocoles dérivés de RCHOP pourront être employés : ces derniers ajoutent des chimiothérapies supplémentaires tel les R-ACVBP (Adriamycine + Cyclophosphamide + Vindésine + Bléomycine + Prédnisone), R-EPOCH (R-CHOP + etoposide), R-ESHAP (etoposide, methylprednisone, cytarabine, and cisplatine) ou les protocoles ICE (ifosfamide, carboplatin, et etoposide) (82).

Grâce à l'utilisation de tel protocole, plus de la moitié des patients peuvent espérer une rémission complète, et la survie générale des patients à 5 ans et 10 ans est de 58% et 43.5% respectivement (⁸²). Cependant, 30-40 % les patients rechutent quelques années après rémission, ou pire ne répondront pas aux thérapies R-CHOP. Parmi ces patients répondant peu à la thérapie R-CHOP, le diagnostic est souvent celui du sous type ABC. Comme le montre la **figure 17** ci-dessous, la survie globale des patients traités par R-CHOP atteint de ABC-DLBCL est plus mauvaise que ceux atteint de GC-DLBCL.



Figure 17 : Survie des patients traités par R-CHOP selon le sous-type de lymphome diagnostiqué. Adapté de Nowakowski et al, « ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2015.

Malgré la nette amélioration de la prise en charge des lymphomes DLBCL via la thérapie R-CHOP ces dernières décennies, il est désormais temps de trouver des thérapies complémentaires afin de diminuer le nombre de rechute ou cas réfractaires dans ces lymphomes ABC. De plus, les traitements basés sur l'ADCC (R-CHOP) ont la particularité d'éliminer le réservoir de lymphocyte B normaux du patient, conduisant à une grande toxicité du traitement. Dans ce but, de nombreuses équipes s'emploient à identifier les protéines oncogéniques du lymphome. Ceci permet d'exploiter par la suite la dépendance du DLBCL à ces protéines et de proposer une thérapie de plus en plus ciblée. De même, l'introduction progressive des systèmes de séquençage en routine (Lymp2Cx assay) pourra à terme permettre d'identifier rapidement le sous-type de lymphome d'un patient donné et de combiner des molécules ciblant spécifiquement ce sous-type selon un mécanisme donné au traitement R-CHOP. Le paragraphe ci-après s'attarde à étudier quelques molécules récentes ciblant le sous-type ABC, molécules parfois déjà inclues dans des phases d'essais cliniques.

Nouvelles thérapies dirigées contre le sous-type ABC-DLBCL.

Plusieurs classes d'agents anti ABC-DLBCL peuvent être présentées suivant leur mécanisme d'action. On peut simplifier les principaux agents ciblant la voie NFkB selon le schéma et le tableau suivant :



Figure 18 : Schéma général des molécules ciblant la voie NFkB dans le sous-tpe ABC-DLBCL. Adapté de Nowakowski et al, « ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2015.

Tableau 1: Emploi des molécules ciblant la voie NFkB en clinique. ORR = overall response rate = taux de réponse global observé chez les patients, issu du pourcentage entre les patients répondant au traitement ou effectuant une rémission complète. PCNSL = primary central nervous system lymphoma. Adapté de Nowakowski et al, « ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2015.

Nouvelles thérapies des ABC-DLBCL										
Classe		Cible	Phase d'essai clinique	Monothérapie	Combinaison R-CHOP					
Immuno modulateurs										
Lénali	lidomide	IRF4 /SPIB	111	ORR : 53%	ORR : 78%					
Inhibiteur NFkB										
Ibruti	inib	Bruton tyrosine Kinase (BTK)	111	ORR 40%	ORR : 86% (PCNSL)					
Borté	ézomib	Protéasome	I	ORR: 4%	ORR : 83%					
Enzas	staurine / sotrastaurine	ΡΚС β	Enzastaurine: I, sotrastaurin: II	non renseigné	non renseigné					
Fosta	amatinib	SYK	1/11	ORR : 22%	non renseigné					

On discerne alors les molécules capables d'inhiber directement la réponse NFkB dans les cellules ABC, les agents inhibiteurs NFkB par l'action du protéasome, et les agents immuno modulateurs.

Inhibiteurs NFkB :

Ibrutinib / Btk. C'est l'un des composés les plus prometteurs dans le traitement des lymphomes ABC. L'intérêt porté à la Bruton's tyrosine kinase (BTK), a été amené par des études d'interférence ARN, ou un shRNA dirigé contre la BTK se révèle capable de diminuer la viabilité de lignées ABC (³⁸). La kinase BTK est l'une des kinases proximales du récepteur à l'antigène, activée à la suite de la phosphorylation des ITAM de CD79A/B, et fait partie du relai de transduction du signal vers le complexe CBM (**figure 8**). Ainsi, on comprend que l'apoptose

induite dans les lignées ABC par un shRNA BTK n'est effectif que pour les lignées possédant un BCR activé de manière chronique, c'est-à-dire muté au niveau CD79A/B mais non au niveau de CARD11 (figure 8). Le PCI-32765, ou ibrutinib, a alors été utilisé pour inhiber la voie BCR oncogénique dans le lymphome activé in vitro (^{38 65 83}) et in vivo (^{84 85}). Cet inhibiteur se lie de manière irréversible à la BTK en formant une liaison covalente avec la cystéine 481 du site actif de la BTK. L'ibrutinib est donc particulièrement intéressant dans les pathologies montrant une activation importante de la voie BCR, et a été approuvé par la FDA dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) (⁸⁶). Une étude de phase 2 dans des lymphomes en rechute ou chémo-réfractaire a confirmé que l'ibrutinib était efficace en monothérapie dans les lymphomes ABC mais non les GC, avec un taux de réponse global de 40% versus 5% respectivement (⁸⁷). Les réponses à l'ibrutinib dans le lymphome ABC ont confirmé son action sur les lymphomes à BCR chronique seulement, puisqu'aucun des lymphomes Myd88 muté seul ou CARD11 mutés n'ont pas répondu au traitement (⁸⁶). Plus récemment, l'ibrutinib a été utilisé dans le traitement de lymphome primaire du système nerveux central (PCNSL). Ce lymphome est de type activé dans lequel les deux voies NFkB sont retrouvées mutées, avec 86% et 64% des cas mutés pour Myd88 et CD79A/B respectivement, et une cooccurrence de 37% (^{86 88}). L'introduction de l'ibrutinib dans un essai de phase I chez de patients atteints de PCNSL a donné de très bons résultats dans ce lymphome très agressifs, avec une réponse générale importante (ORR 86%) et des rémissions complètes de 57% à 15 mois (⁸⁸). Un certain nombre de patients finiront par rechuter mais une survie allant jusqu'à plusieurs année sans maladie a pu être observée. On notera que l'un des effets indésirables majeur du traitement ibrutinib est le développement d'aspergillose à Aspergillus fumigatus chez environ 37% des patients (⁸⁸). En effet, la BTK est également exprimé par les macrophages et est nécessaire pour la production des TNF α et IL-1 β après activation TLR2/TLR4 (⁸⁹). L'ibrutinib est testé en association avec la thérapie R-CHOP dans des protocoles appelés IR-CHOP avec des résultats très encourageants dans le DLBCL (⁹⁰)).

Bortézomib / protéasome. L'intérêt de l'utilisation du bortézomib dans la thérapie du lymphome ABC provident de sa capacité à diminuer l'activité de la voie NFkB en inhibant la dégradation de l'inhibiteur IkBa (⁹¹). L'idée est donc d'ajouter un inhibiteur NFkB à la chimiothérapie R-CHOP chez les patients. Même si le bortézomib peut comporter bien d'autres effets, il s'avère que son utilisation en clinique est plutôt efficace sur le lymphome

ABC (mais pas le lymphome GC puisque non dépendant à NFkB). Comme le lenalidomide si son utilisation en mono thérapie sur des patients souffrant d'un ABC DLBCL de novo est faible (96% de non réponse), il est intéressant de voir que son association avec la thérapie R-CHOP est efficace : 83% des patients ABC-DLBCL répondent aux traitements et achève une rémission complète dans 41.5% des cas (⁹¹).

Enzastaurin ou Sotrastaurin, Fostamatinib ou Entospletinib / kinases associées au BCR. L'inhibition des kinases associées au BCR a montré une bonne efficacité que ce soit in vitro ou in vivo. L'inhibition de la kinase SYK par shRNA (³⁸) ou par molécules chimiques *in vitro* (^{92 93}) et *in vivo* (⁹⁴) provoque la mort des cellules dépendantes de la voie BCR (³⁸), de même que les inhibiteurs de la sérine /thréonine kinase PKCβ est toxique pour les lymphomes ABC CD79A/B mutants (⁹⁵). Les molécules inhibitrices de PKCβ (sotrastaurin, enzastaurin) sont en essai clinique de phase I pour tester leur tolérance chez les patients tandis que l'un des inhibiteurs SYK (fostamatinib) présente quelques résultats chez les patients atteints de DLBCL en rechute ou chémo-refractaires (taux de réponse limité, ORR 22%, rémission complète 5%) (⁹⁶).

Immunomodulateurs:

Lenalidomide / IRF4. Le lenalidomide est un agent assez intéressant puisqu'il appartient à la classe des IMIDS (agents immunomodulateurs) et comporte donc de nombreux mécanismes d'action. En effet, il a à la fois un effet anti-tumoral direct sur les cellules de lymphome mais possède également des capacités anti-angiogéniques, des capacités à stimuler les effecteurs immunitaires T et NK, à diminuer la production de TNF α ou encore à moduler le microenvironnement tumoral (⁹⁷). Initialement utilisé dans le myélome multiple, le lenalidomide ou CC-5013 peut comporter un effet cytotoxique seul dans les cellules ABC-DLBCL via l'inhibition de l'axe IRF4/SPIB, dans un mécanisme dépendant de la protéine ubiquitine ligase cereblon (⁹⁷). On notera que ce composé comporte une action cytotoxique maximale sur les lignées ABC lorsqu'il est associé à des inhibiteurs NFkB (⁹⁷). IRF4 et SPIB sont des facteurs de transcription fortement exprimées dans le lymphome ABC et sont responsable de la survie des cellules de lymphomes en induisant la voie NFkB (CARD11 est l'un des gène induit par IRF4, créant une boucle oncogénique) mais également en bloquant la production d'INF β par les cellules (⁶⁵). En effet, IRF4 réprime l'expression de IRF7, lui-même responsable

de la sécrétion de l'INFβ par les lignées ABC-DLBCL. L'IFN de type I est toxique pour la plupart des lignées ABC in vitro (⁶⁵) mais pas pour les lignées GC.

Dès lors, l'utilisation de ce composé en clinique a été introduite, d'abord en essai de phase I en monothérapie, puis associé au protocole R-CHOP. Les patients ABC en rechute ou chémoréfractaires après thérapie R-CHOP sont ceux bénéficiant le plus d'un mono traitement au lenalidomide, avec un ORR de 53% (29.4% de rémission complète, ⁹⁸). La combinaison lenalidomide et R-CHOP a également été utilisée en essai de phase 2 pour les ABC-DLBCL diagnostiqués « de novo ». L'association lenalidomide / R-CHOP nommée R2CHOP s'est révélée particulièrement efficace sur ce type de lymphome de mauvais pronostic, faisant passer la survie globale des patients à 24 mois de 46 à 78% pour ces lymphomes ABC (⁹⁹).



Figure 19 : Survie des patients sans progression de la maladie en fonction des traitements de chimiothérapie. Des patients nouvellement diagnostiqués pour un lymphome ABC ou GC-DLBCL ont été traités par R-CHOP (A) ou une combinaison Lenalidomide R-CHOP (B). Adapté de Nowakowski et al, « ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2015.

Un ensemble de nouvelles molécules sont donc à l'étude pour traiter efficacement le lymphome ABC. C'est dans l'optique de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques dans ce lymphome que c'est dressé ma thématique de thèse. Nous allons donc maintenant nous intéresser à la famille des protéines HSP.

HSP et intérêt dans le cancer

L'un des moyens de trouver des traitements contournant l'hétérogénéité du DLBCL est d'identifier des protéines soutenant les voies oncogéniques des cellules de lymphomes, indépendamment des mutations présentées par les DLBCL. Ainsi, certains articles ont décrit l'acquisition d'une dépendance aux HSP par les cellules après transformation tumorale (100 ¹⁰¹). Les HSP ou "heat shock protein" sont des chaperons moléculaires très conservées entre les espèces, identifiées en 1962 par Ferrucio Ritossa chez la drosophile. Leur expression peut être constitutive, elles agissent alors comme chaperons moléculaires : c'est-à-dire qu'elles participent au bon repliement des protéines synthétisées. De même, les HSP peuvent participer au transport de leur protéines clientes à travers leur compartiment cible (¹⁰²). Cependant, leur expression peut aussi être induite par de nombreux stress physiologiques (chaleur, privation nutriment, stress chimique) et environnementaux (toxines bactériennes et virales, alcool, chimiothérapies) (¹⁰³). L'ensemble des stress ciblant la cellule mènent à la dénaturation de protéines cellulaires, menant à l'activation des heat shock factors ou HSF. Après translocation nucléaire, le facteur de transcription principal des HSP, HSF1 va se lier au niveau de séquences promotrices de l'ADN sur des sites HSE (heat shock element) (104; 105,106). Une allégorie un peu enfantine pourra présenter les HSP comme les pompiers de la cellule : elles sont appelées dès que tout va mal. Une fois synthétisées en réponse au stress, les HSP vont alors participer au retour de la conformation tridimensionnelle normale des protéines (¹⁰⁷). Si l'apport d'HSP supplémentaire n'est pas en mesure de réparer la bonne conformation des protéines anormales, les HSP pourront orienter ces protéines clientes dénaturée vers une dégradation protéasomale (¹⁰⁸), figure 20.

Il existe 6 grandes familles d'HSP, classées en fonction de leur poids moléculaire (petites HSP, chaperonines [HSP40], HSP60, HSP70, HSP90, HSP110). Dans les contextes de stress et notamment dans la cellule tumorale, les HSP contrôlent un large panel de fonctions cellulaires de manière à secourir les cellules de ces conditions trop délétères. La présence de nombreuses mutations, translocations, la polyploïdie ou encore l'action des cellules immunitaire ou du microenvironnement tumoral induit un stress permanent autour des cellules tumorales (^{109 110}).



Figure 20 : Mode d'action simplifié des HSP. Lors stress cellulaire, les protéines cellulaires sont dénaturées ou désagrégées, menant à des perturbations de fonctions cellulaire. La réponse HSP dans ces conditions favorise le repliement normal des protéines dénaturées ou oriente ces dernières vers une dégradation protéasomale.

Ainsi, les HSP sont souvent hautement exprimées dans de nombreux cancers où elles contribuent à la résistance à l'apoptose, aux chimiothérapies et à l'action du système immunitaire (^{111 112}). En conséquence, les HSP ont émergées comme des cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer.

HSP et pathologies hématologiques.

Certaines publications font état de l'expression importante ou même une implication bien décrites des HSP dans certaines pathologies hématologiques.

Différenciation érythrocytaire et pathologies. Les HSP sont par exemple essentielles à la différenciation des globules rouges (¹¹³et ¹¹⁴). En effet, il est bien décrit que HSP70 et HSP27 ont une action coordonnée pour permettre la différentiation terminale des globules rouges en modulant l'expression de GATA-1. Un défaut dans l'expression des HSP et notamment HSP70 dans ce processus peut mener à des syndromes hématologiques de type β -thalassémie ou dysplasie érythrocytaires ¹¹⁴.

Différenciation des leucocytes et pathologies. Le facteur de transcription principal des HSP, HSF1, est impliqué dans la différenciation des monocytes en macrophages. En effet, des souris HSF1-/- ont un pourcentage de cellules myéloïdes dans la moelle osseuse réduit (¹¹⁵). Ceci est

dû au fait que l'expression de Spi1/PU1, l'un des facteurs de différenciation clef des monocytes est partiellement contrôlé par HSF1. (¹¹⁵). Les HSP peuvent également jouer un rôle dans les pathologies hématologiques des globules blancs. En effet, HSP90 stabilise des protéines fréquemment retrouvées mutées dans les myélodyplasies telles que c-Kit, FLT3 muté (FLT3-ITD pour Internal-TanDem-repeat), JAK2 muté ou non (¹¹⁶). HSP90 est aussi impliqué dans des pathologies lymphoïdes autres que le DLBCL. En effet, HSP90 stabilise de ZAP70, protéine anormalement exprimées dans les LLC (leucémies lymphoïdes chroniques) (¹¹⁷).

HSP et lymphome DLBCL.

Mais, dans le cadre de ce qui nous intéresse, les premiers éléments décrivant une implication HSP dans le lymphome B sont venus avec l'étude d'HSP90. Il faut remonter à 2005 pour voir la première caractérisation de l'expression de HSP90 par IHC sur des coupes de lymphome DLBCL, avec près de 60% des tumeurs comportant un marquage modéré à fort **figure21** (¹¹⁸).





Plus tard, l'implication d'HSP90 dans le soutient de la croissance tumoral des DLBCL a été plutôt bien décrit. HSP90 comporte divers rôle dans le DLBCL :

HSP90 stabilise BcL6 et augmente son activité transcriptionelle ¹¹⁹. En effet, l'inhibition de HSP90 par le PUH-71 dans des lignées dépendantes de BcL6 induit leur apoptose. En effet, HSP90 est capable de se lier à BcL6 dans le compartiment nucléaire des DLBCL, où HSP90 fait partie du complexe de répression transcriptionnel BcL6 sur les promoteurs cible de BcL6 (ATR, Tp53, CD74, TNFAIP8) ¹¹⁹. La même équipe montre que HSP90 pourrait aussi stabiliser l'ARNm de BcL6. Enfin, ils montrent que l'utilisation du

PUH-71 *in vivo* sur des tumeurs DLBCL xénogréphées chez la souris réduit la croissance tumorale lorsque injecté en intra-péritonéale à une dose de 75mg/kg.

HSP90 participe aussi à la formation de complexe de signalisation du lymphome ABC. L'inhibiteur PUH-71 peut aussi être utilisé comme outil moléculaire afin de précipiter HSP90 dans un lysat de cellule et regarder les protéines associées par spectrométrie MS/MS. Dans cette optique, une équipe a montré la capacité d'HSP90 à lier des effecteurs de la voie du BCR ¹⁰¹. En effet, une multitude d'effecteurs de cette voie ont été précipité en même temps qu'HSP90, tels que CD79A/B, SYK, Lyn, PLC2 γ ou la BTK. Pour caractériser le rôle d'HSP90 dans ce complexe, l'équipe expose des lignées ABC-DLBCL à 1μM de PUH71 pendant 2 à 4h et montre que la phosphorylation des effecteurs du BCR Lyn / BTK et SYK est diminuée, que l'association des composants du complexe du BCR se fait moins et que la signalisation de NFkB est diminuée ¹⁰¹. Enfin, cet inhibiteur a été testé *in vivo* sur xénogreffe de lignées ABC-DLBCL (TMD8 HBL1) sur souris immunodéficience. Là encore, un traitement PUH71 75mg/kg en injection intrapéritonéale suffit à réduire de manière importante la croissance tumorale.

Sur ce rationnel de l'intérêt de l'inhibition d'HSP90 dans le lymphome ABC, un essai clinique de phase I a été entamé sur des DLBCL. La molécule utilisée est un inhibiteur d'HSP90 de troisième génération, l'AUY922 ou luminespib, dont la biodisponibilité et solubilité ont été améliorée par rapport aux premiers inhibiteurs HSP90 (¹²⁰). L'essai clinique repose sur l'injection de l'inhibiteur seul (70mg/m²) en intraveineuse sur 12 cycles jusqu'à progression de la maladie ou toxicité (¹²⁰). Sur les 14 patients DLBCL avec lymphome chémo-réfractaire enrôlés dans l'étude, seul un patient répondra au traitement (GC-DLBCL) avec une rémission complète dont la réponse durera plus de 24mois. Aucun autre patient n'a cependant présenté d'amélioration. De plus, de nombreux effets secondaires ont été observés avec les injections d'AUY922, certain patients arrêtant leur thérapie en raison d'une forte toxicité. D'un point de vue statistique, les auteurs donnent un ORR de 10% avec rémission complète de 7%, mais on comprend que l'utilisation des inhibiteurs HSP90 en clinique n'est pas efficace pour le moment.

Dans ce contexte, nous nous sommes demandé si l'inhibition d'une autre HSP, HSP110, pouvait s'avérer d'intérêt comme cible du lymphome DLBCL de type activé.

Généralités sur HSP110

La protéine HSP110 appartient à la famille des HSP de haut poids moléculaire qui comprend 4 membres, HSP110, APG-1, APG-2 et GRP170.

Deux formes totales d'HSP110 ont été identifiées chez l'homme : HSP105 α et HSP105 β , HSP105 β étant issue d'un épissage alternatif de HSP105 α et tant plus courte de 43 acides aminés. HSP105 α est localisée dans le cytoplasme et le noyau des cellules tandis que HSP105 β est uniquement localisée dans le noyau, et seulement dans des conditions de choc thermique. A l'heure actuelle, nous ne savons rien de la différence de fonction entre ces deux isoformes (¹²¹). APG-1 et APG-2 ont été identifiées chez l'homme et chez la souris et sont principalement exprimées dans les gonades (¹²²and ¹²³) tandis GRP170 est localisée dans le réticulum endoplasmique (¹²⁴).

Concernant sa structure, HSP110 comporte 4 domaines principaux : un domaine de liaison à l'ATP (résidus 1-394), un domaine de liaison au peptide (résidus 394-509), un domaine Loop comportant un signal de localisation nucléaire (résidus 510-608) et un domaine C-terminal (résidus 608-858) et comportant un signal d'export nucléaire (NES) (¹²⁵) **figure 22**.





En conditions physiologique, HSP110 participe au bon repliement des protéines néo synthétisées. Cette activité est mise en jeu au sein d'un réseau de protéines chaperonnes, complexes intracellulaires pouvant atteindre 400 à 700kDa (¹²⁶). HSP110 est en effet capable d'interagir avec HSC70 (¹²⁷), HSP70 (¹²⁸) et HSP40 (¹²⁹) afin de replier activement les protéines dans leur conformation native.

En conditions de stress ou de vieillissement cellulaire, un grand nombre de protéines peuvent être dénaturée et former des agrégats protéiques toxiques pour les cellules .La commination des trois protéines HSP110-HSP70 et HSP40 comporte également une activité de désagrégation, permettant de replier les protéines à partir de larges agrégats dans le cytosol des cellules (¹³⁰ et ¹³¹).

HSP110 et cancer

La protéine HSP110 est surexprimée dans de nombreux cancers, tels les mélanomes, les cancers mammaires et de la prostate, les cancers pancréatiques et surtout les cancers colorectaux (¹³²). Le rôle de HSP110 à particulièrement été décrit dans le cancer colorectal. En effet, l'expression d'HSP110 est associée à un mauvais pronostique chez les patients, favorisant la progression tumorale et la présence de métastases (¹³³ and ¹³⁴).

Son rôle exact dans le cancer n'a été rapporté que très récemment par notre équipe : HSP110 participe à la croissance des cellules de cancer colorectal via des mécanismes intra et extracellulaires. Pour la partie intracellulaire, HSP110 se lie directement avec STAT3, favorisant sa phosphorylation par JAK2 et favorisant la prolifération des cellules via cet axe HSP110 / STAT3 (135). Dans son rôle extracellulaire, HSP110 est excrétée par les cellules de cancer colorectal où elle interagit avec le TLR4 des monocytes infiltrant la tumeur pour favoriser leur différentiation en macrophages de type M2 (¹³⁶). Les macrophages de type M2 sont de mauvais pronostic dans le cancer colorectal puisqu'ils produisent un ensemble de cytokines immuno modulatrices (IL10 et TGF-B) ou favorisant l'angiogenèse (VEGF) (¹³⁷). Enfin, en 2011, notre laboratoire a identifié une forme tronquée d'HSP110 exprimée dans certain sous-types de cancer colorectal. Ce mutant se comporte comme un dominant négatif d'HSP110 (¹³⁸). La présence de ce mutant, et donc d'un inhibiteur « endogène » de HSP110 dans le cancer colorectal comporte un impact sur la réponse à la chimiothérapie : un niveau élevé de mutant est de bon pronostic pour les patients (¹³⁹). Du fait de son identification comme protéine impliquée dans le soutient de la croissance tumorale, nous avons voulu étendre les champs d'exploration d'HSP110 dans le lymphome B.

HSP110 et cancer lymphome DLBCL.

Pourquoi le lymphome B de type DLBCL ? Ce choix repose sur les publications issues d'une équipe italienne basée à Milan, études rapportant de nouvelles fonctions pour HSP110 dans

le lymphome non hodgkinien humain. Cette équipe travaillait initialement sur le lymphome B hodgkinien mais avec une approche très éloignée de la thématique HSP. Leur axe de recherche était en effet basé sur l'établissement d'une vaccination médiée par des cellules dendritiques autologues pulsées aux antigènes de la tumeur du patient (140). Leur étude semble montrer une efficacité intéressante sur leurs patients porteurs de DLBCL (lymphomes folliculaire principalement) puisque sur 18 patients, 6 répondrons au traitement avec 3 rémissions complètes (140). En voulant s'intéresser aux anticorps produits par les répondeurs aux traitements, ils ont identifié plus tard un important taux sérique d'anticorps anti-HSP110 (141). Ils font alors deux constats : les patients porteur d'un fort taux d'anticorps dirigés contre HSP110 présentent des cellules de lymphome positives pour HSP110 à leur membrane (¹⁴¹). De plus, une croissance tumorale sur xénogreffe de souris en présence d'un anticorps dirigé contre HSP110 réduit la croissance tumorale au contraire d'un traitement véhicule seul (141). Enfin, en s'intéressant au rôle que pouvait jouer HSP110 dans le DLBCL, cette équipe a publié en 2015 une corrélation entre HSP110 et deux facteurs clefs du lymphome GC : BcL6 et c-Myc. Selon leurs données, HSP110 interagit avec BcL6 et c-Myc en les stabilisants, et un siRNA dirigé contre HSP110 pourrait ralentir la croissance tumorale in-vivo dans des modèles de souris xénogreffées (142).

Ainsi, avec l'émergence des données liant HSP110 et lymphome, nous nous sommes demandé si cette HSP110 pouvait aussi comporter un rôle dans le lymphome DLBCL le plus agressif : le lymphome **ABC-DLBCL.** C'est sur ce questionnement que s'est ouvert mon travail de thèse : HSP110 est-il exprimé dans les lymphomes ABC ? Si oui, cette HSP comporte-t-elle un rôle spécifique ?

Matériel et méthode

Echantillons patients et lignées cellulaires.

Les lignées de lymphome ABC ont été achetées chez ATCC ou DSMZ (U2932 / Oci-Ly3 / Oci-Ly10 / SUD-HL2) ou très gracieusement fournies par le Prof. Dr. Daniel Krappmann's du centre Helmholtz Zentrum München, Germany (HBL1/ TMD8). Les cellules ont été maintenues dans du RPMI 1640 (Dominique Dutscher, Brumath, France) supplémenté de sérum inactivé par la chaleur (Dominique Dutscher) à hauteur de 10% 10% (U2932 / TMD8), 15% (Oci-ly3) or 20% (HBL1 / Oci-Ly10 and SUD-HL2) et 1% d'antibiotiques (Dominique Dutscher). Les échantillons primaires de patients ont été fournis par le centre de ressources biologiques Ferdinand Cabanne (BB-0033-00044, Dijon, France), ou par le Service de Pathologie du centre Léon Bérard (Lyon, France) pour les études d'immuno histochimie, ou encore par le centre de Ressources Biologiques-Santé (BB-0033-00056) de l'hôpital de Rennes pour l'analyse d'ARNm dans les tumeurs de patients. Tous les patients avaient fourni leur consentement.

Transfection

L'ensemble des lignées ABC-DLBCL a été transfecté par électroporation à l'aide des kits Lonza de type AMAXA Nucleofector kit et du AMAXA Nucleofector 2b device (Lonza, Basel, Switzerland). Pour chaque point de transfection 0.8 10⁶ ABC-DLBCL lavées en PBS ont été resuspendues dans les Nucleofector kit T (HBL1 / Oci-Ly3 / Oci-Ly10) or V (U2932 / SUD-HL2 / TMD8) puis incubées avec 5µL de 100µM de siRNA control (MISSION® siRNA Universal Negative Control #1, Sigma-Aldrich, Lyon, France) ou dirigé contre hsph1 targeting siRNA (Silencer™ Select Pre-Designed siRNAsiRNA ID: s21242 , Life technologies, Saint-Aubin, France). Les programmes spécifiques à chaque lignées sont : U-15 for U2932, P-005 for SUD-HL2 / TMD8, G-016 for HBL1 / Oci-Ly3 / Oci-Ly10. Immédiatement après électroporation, les cellules sont remise dans du milieu frais à 37°C. Pour les autres HSP, les siRNA utilisés sont le Silencer® Pre-Designed siRNA pour HSP27 (ID: 122371 -HSPB1) et HSP70 (IDs6966- HSPA1A), et l'inhibiteur chimique de HSP90 est le PU-H71 trihydrochloride (1µM 16h,**Axon Medchem BV**, Groningen, The Netherlands,).

Pour la transfection des HEK293T, le réactif utilisé est le Genjet Vii reagent (TebuBio, Le Perrayen-Yvelines, France) selon les recommandations de la fiche technique. Les plasmides GFP, HSP110-GFP et DE9-GFP (mutant d'HSP110) ont été fait par notre équipe, les plasmides Myd88 WT and L265P ont été donnés par le Dr. Wolz Olaf Oliver (Department of Immunology, University of Tübingen, Germany), et le plasmide rapporteur pour NFkB (pGL4.32[luc2P/NFκB-RE/Hygro] Vector, Promega E849A) à été fourni par l'équipe du professeur Philippe Gaulard (IMRB, U955 Inserm – Université Paris Est Créteil, UPEC, France).

Particules lentivirales

Les particules lentivirales utilisées ont été décrites précédemment (¹⁴³et ¹⁴⁴). Les particules ont été générées par l'équipe du Dr. Els Verhoeyen (Inserm U758, Human Virology Department, ENS Lyon) de manière à porter un pseudotype dit H/F, c'est-à-dire exprimant les antigènes H et F modifiés de la souche virale de la rougeole. Cet antigène permet un taux d'infection bien plus important qu'un système classique avec antigène VSV-G. Les virus H/F portent un vecteur shRNA de type shRNA contrôle (Sigma MISSION® SHC016-1EA) ou dirigés contre HSP110 (Sigma MISSION[®] shRNA Plasmid DNA type SHCLND-NM 006644, clone TRCN0000275617). Les vecteurs shRNA sont également porteur d'un gène rapporteur GFP et d'un gène de sélection puromycine afin de sélectionner les cellules infectées. Les virus seront produits par des HEK293T et le surnageant viral concentré par ultracentrifugation. Pour la transduction, les HBL1, Oci-Ly3, et U2932 ont été incubées avec le surnageant viral à une multiplicité d'infection (MOI) de 2 pendant 24h avant lavage et remise en culture dans du milieu frais complet. 48h après transfection, les cellules ont été sélectionnées par ajout de la puromycine durant 96h. La viabilité des cellules GFP+ a été mesurée par cytométrie en flux à l'aide du LSR II Flow Cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) en utilisant les kits Annexine V / 7AAD de chez (Becton Dickinson, Franklin Lakes,).

Western Blot.

Les extraits cellulaires totaux ont été préparés à l'aide d'un tampon de lyse commercial de chez Cell Signaling Technologies (Cell Signaling Technologies 10X lysis buffer #9803, 50mM Tris HCL, 140mM NACL, 0.5 % NP40, 10% glycérol, 2mM EDTA) et complété avec des inhibiteurs de protéases (complete protease inhibitor cocktail tablets, Roche) du PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Roche) et des inhibiteurs de phosphatases via les phosphatase Inhibitor Cocktail 2 and 3 de chez Sigma-Aldrich. Les extraits protéiques sont ensuite séparés selon une électrophorèse SDS-PAGE et transférés en tampon borate sur membrane de PVDF

avant révélation par chimie-luminescence (Clarity™ and Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrates ou SuperSignal[™] West Femto Maximum Sensitivity Substrate de ThermoFisher Scientific). Les anticorps primaires utilisés pour les immuno-empreintes sont : anti-Bcl-xL (2764S), c-Myc (9605S), Cyclin D1 (2926S), P-STAT3 (9145S) and STAT3 (9139S) from Cell signaling (Danvers, USA); Mcl-1 (sc-819), HSC70 (sc-7298), HSP110 (sc-6241), GFP (sc-8334), BcL10 (331.3), et P-IRAK1 (sc-325147) from Santa Cruz biotechnologies (Dallas, TX, USA); anti-HSP110 [ab109624], for IHC staining, anti-BcL10 [ab199011], CD79a [ab199001], IgM [ab20054], IKBa [ab32518], P-IKBa [ab133462] Myd88 [ab119048], HSP90 [ab59459], HA [ab130275], HSP70 [ab5439], Ubiquitin (linkage-specific K63) [ab179434] from abcam (Paris, France); anti-IkBa [#4812], IRAK1 [#4504], Myd88 [#4883], c-Rel [#4727], TRAF6 [#8028], p65 [#8242], BcL2 [#2870], cleaved caspase 3 Asp175 [#9664], total caspase 3 [#9662], laminA/C [#4777], et HSP60 [#12165] from Cell Signaling Technologies (Danvers, USA); anti-p50 [616702] from Biolegend (San Diego, USA); HSP27 [ADI-SPA-800] from Enzo Life (Villeurbanne, France), et monoclonal Anti-β-Actin–Peroxidase antibody [A3854] from SIGMA. Les anticorps primaires et secondaires ont étés incubés dans un tampon salin à base Tris (pH8) complété par de l'albumine issu du sérum de bœuf (BSA) à hauteur de 3% et du Tween 0.1%.

Les fractionnements cytoplasme – noyau ont été réalisés via le kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (ThermoScientific) selon les recommandations du fabricant.

Immunoprecipitation

Les immuno precipitations ont été réalisés selon un protocole précédemment publié (⁵⁰). Les cellules HEK293T ou ABC sont lysées à approximativement 10 millions de cellules / mL de tampon de lyse de type RIPA (0.5%Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 0.05%SDS, 10mM Tris, pH8.0, 50mM NaCl, 10mM EDTA, 1mM Na3VO4, 30mM pyrophosphate, 10mM glycerophosphate, 1mM PMSF, 1.0µg / mL aprotinin and 0.01% NaN3) pendant 10 minutes sur glace. Les lysats sont ensuite clarifiés par centrifugation (15min 14.000g à 4°C) puis leur concentration en protéine est évaluée par dosage colorimétrique selon une méthode Lowry modifié (RC DC[™] Protein Assay, Biorad). Une quantité minimale de 500µg de protéine a été utilisée pour chaque point d'immuno-précipitation, et les lysats protéiques seront incubés avec un anticorps primaire sur la nuit et sous agitation sur roue à 4°C. Les anticorps utilisés pour l'immuno-précipitation ont été décrit précédemment (pour l'anticorps dirigé contre

HSP110, il s'agit de l'abcam anti-HSP105 [EPR4576 / ab109624]). Le jour suivant les lysats contenant l'anticorps primaire sont incubés 25min à 4°C avec des billes de sépharose couplées à des protéines A ou G (Merck Fast Flow agarose beads, protein G [16-266] and protein A [16-156], Merk Millipore). Les lysats contenant les billes d'agarose / anticorps sont ensuite lavés abondamment dans du tampon de lyse avant d'être bouillis à 95°C dans du Laemli et analysés par western blot.

Vecteur rapporteur NFkB et analyse

Les expériences ont été réalisés dans des HEK293T transfectées transitoirement via le réactif Genjet Vii et via les plasmides suivant : 0.4µg de pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro], 0.4µg de Myd88 WT ou L265P comportant un tag HA, des quantité variables de vecteur HSP110 tagué HA (0.1 à 0.7µg) et 0.3µg de vecteur GFP pour la normalisation. Les cellules transfectées ont été préparées selon le protocole et les réactifs de lyse Promega® (Luciferase assay system E1500) et la luminescence des lysats fut analysée en triplicatas par le lecteur de plaque EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer,USA). Toutes les lectures sont normalisées selon la moyenne de fluorescence du gène rapporteur GFP.

Immunofluorescence et expériences de Duolink® (proximity ligation assay)

Les immunofluorescences des cellules ABC en culture ou transfectées sont réalisées après lavage en PBS, fixation par de la paraformaldéhyde (PFA) 4% 10minutes sur glace et perméabilisation dans du méthanol 100% froid (-20°C). Les cellules sont ensuite centrifugées sur lames en utilisant un appareil de type Cytopsin (5 minutes 300rpm). Les cellules sont ensuite saturées par une solution de Tris BSA 3% pendant 45 minutes à température ambiante puis les lames seront incubées avec les anticorps primaires dilués au 1/100 ième suivant : anti-lgM [IM260], anti-IkBa [ab32518], anti HSP105 [EPR4576], anti HSP70 (ab5439), anti Myd88 (ab119048).

Le lendemain, les expériences du Duolink[®] sont réalisées selon le protocole du fabricant (Sigma-Aldrich). Pour la description de la technique, il s'agit d'incuber des anticorps secondaires couplés à des sondes d'ADN complémentaires (étape 2) après l'incubation des échantillons avec l'anticorps primaire (étape 1), voir schéma ci-dessous.



Si les sondes sont à une proximité inférieure ou égale à 40nm, l'étape de ligation (étape 3) permettra de créer une séquence double brin qui sera amplifiée (étape 4) et que l'on pourra détecter à l'aide de sondes fluorescentes (étape 5). Après réaction d'amplification, les cellules sont ensuite incubées dans le milieu de montage (Prolong diamond, ThermoScientific) pour fixer la fluorescence. Les images sont ensuite acquises à l'aide d'un Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) et d'une caméra de type AxioCam MRm CCD camera (Carl Zeiss GmbH, x40objective). La détection des points Duolink[®] a été réalisée à l'aide du logiciel ICY et l'analyse statistique de ces spots à l'aide du logiciel GraphPad Prism6 (Man and Whitney non apparié).

Extraction d'ARN et PCR en temps réel :

Les ARN totaux sont isolés via le « Trizol reagent » (Invitrogen) suivi d'une extraction au chloroforme et une précipitation en éthanol 100%. La concentration des ARN extraits et leur pureté sont évaluée via NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Les ADN complémentaires sont synthétisés par retro-transcription en utilisant le kit de « MLV-Reverse Transcriptase » (Promega). Les PCR quantitatives sont réalisées via l'automate « Fast 7500 » (Applied Biosystems) en utilisant les « SDS Biosystems analysis software » pour l'analyse. Pour l'analyse des échantillons patients ou les échantillons de ganglion réactifs, les quantitatives RT-PCRs ont été réalisés avec le TaqMan Universal Master Mix et des primers Taqman de type Taqman Gene Expression Assays (Life Technologie- Applied Biosystems) avec une amorce HSP110 : hs-00971475-m1 et un standard interne de type ABL/hs001104728-m1. L'ensemble des analyses de gène est faite selon la méthode ΔCT. Les analyses statistiques sont faites via le logiciel Prism software (GraphPad software) en utilisant un test Mann-Whitney non paramétrique U-test (* P < 0.05, ** P < 0.01). Pour les autres PCR quantitatives, les primer utilisés sont les : PrimePCR™ SYBR[®] Green Assay RPS18 humain (Biorad), MyD88 F:

GTTGTCTCTGATGATTACCTG, MyD88 R: GGGGAACTCTTTCTTCATTG (Sigma Aldrich), tandis que les primers pour HSP110 ont été décrit précédemment (¹³⁹).

Objectifs de la thèse :

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire HSP pathies dirigée par Carmen Garrido et dont la thématique s'articule autour des protéines de choc thermique. Mon travail a consisté à étudier l'expression d'HSP110 chez les patients atteints d'un lymphome ABC DLBCL et l'étude du rôle d'HSP110 dans les lignées de lymphomes ABC.

Les résultats de ce manuscrit est composé de deux grands axes :

- Le premier pose les bases de ce projet en explorant l'expression et le rôle de HSP110 dans le lymphome ABC-DLBCL.
- Le deuxième axe s'intéresse à l'application de cette découverte. En effet, du fait de l'intérêt porté par l'équipe HSP pathies à l'inhibition d'HSP110 dans le cancer colorectal, notre équipe a débuté une collaboration avec le laboratoire du CERMN (CENTRE D'ÉTUDES ET DE RECHERCHE SUR LE MÉDICAMENT DE NORMANDIE) afin d'identifier des molécules chimiques inhibitrices d'HSP110. Après un criblage sur une banque de molécules, nous avons eût la chance d'obtenir quelques molécules inhibitrices de l'activité d'HSP110 in vitro. Le second chapitre des résultats s'intéresse donc au test de ces molécules dans le lymphome.

Résultats

Partie 1 : HSP110 comme une cible thérapeutique potentielle du lymphome ABC-DLBCL.

Les données présentées sont les figures de l'article premier auteur que j'ai eût la tâche de préparer durant cette thèse les résultats sont actuellement en révision dans la revue Blood avec un article portant le titre suivant :

HSP110 SUSTAINS MYD88-DEPENDENT NF-KB SIGNALING IN ACTIVATED B CELL DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA.

Running title: HSP110 sustains chronic NF-KB signaling

Christophe Boudesco,¹ Els Verhoeyen,²⁻³ Laurent Martin,⁴ Catherine Chassagne-Clement,⁵ Leila Salmi,¹ Céline Pangault,⁶ Thierry Fest,⁶ Fabrice Jardin,⁷ Olaf-Oliver Wolz,⁸ Alexander N. R. Weber,⁸ Carmen Garrido, ¹⁻⁹ and Gaetan Jego ¹

¹INSERM, LNC UMR866, Université Bourgogne Franche-Comté, Equipe Labellisée « Ligue Nationale Contre le Cancer » F-21000 Dijon, France

²CIRI, EVIR Team, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, Université de Lyon-1, ENS de Lyon, Lyon, France.

³Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, "Contrôle Métabolique des Morts Cellulaires," Nice, France.

⁴Service pathologie du Plateau de Biologie du CHU Dijon, 21000 Dijon, France

⁵Service Anatomie et Cytologie pathologiques du Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁶UMR U1236, INSERM, Université Rennes 1, Etablissement Français du Sang Bretagne, CHU de Rennes, laboratoire d'hématologie, Rennes, France

⁷INSERM, U918, Rouen.

⁸Department of Immunology, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany

⁹Centre Georges François Leclerc (CGFL), Dijon, France

Impact de la déplétion d'HSP110 sur des cellules ABC DLBCL

Du fait de l'implication d'HSP110 dans le lymphome GC-DLBCL, nous avons cherché à inhiber HSP110 dans des lignées de lymphome de type ABC-DLBCL pour voir si cette HSP comportait également un rôle dans ce sous-type. Pour cela, nous avons utilisé deux approches de déplétion dirigée contre le gène hsph1 codant pour HSP110 : l'une utilisant un shRNA porté par un vecteur lentiviral et l'autre utilisant une transfection transitoire par siRNA via l'électroporation. Les résultats de la partie shRNA sont présentés dans la **figure 23** :





La **figure 23A** présente la viabilité des cellules de lymphomes infectées pour exprimer un shRNA dirigé contre HSP110. La viabilité présentée sur les graphiques est exprimée en pourcentage. En faisant cela, nous pouvons voir si notre stratégie virale et / ou l'introduction d'un shRNA est toxique pour nos cellules. Ainsi, chaque mesure de viabilité est rapportée à celle de cellules non traitées / non infectées. Les résultats de cette **figure 23A** montrent que la viabilité des cellules infectées par shRNA contrôle ne varie pratiquement pas comparée aux cellules non infectées. Seule la mesure au jour 7 (J7) des Oci-Ly3 présente une viabilité des shRNA contrôle meilleure que celle des cellules non infectées. Cette

figure indique qu'un shRNA dirigé contre HSP110 diminue la viabilité des cellules en culture dès J5 pour les HBL1 et J9 pour les Ly3 (**figure 23A et 1B**). En revanche, la viabilité des U2932 ne semble pas varier entre les deux shRNA. La **figure 23C** présente un western blot sur les HBL1 5 jours après infection. Nous avons cherché à évaluer l'expression de marqueurs anti-apoptotiques et voir ainsi si la diminution de viabilité des cellules de lymphome est liée à un mécanisme d'apoptose. Bien que réalisé sur très peu de cellules, donnant un rendu de faible qualité, ce western blot indique que le clivage de la caspase 3 est plus marqué dans les HBL1 portant le shRNA dirigé contre HSP110 et que les marqueurs pro-survie BcL2 et BcL-XL sont également diminués. Etant donné le peu de cellules disponibles pour le western blot dans les autres lignées, nous n'avons pas pu confirmer ces résultats dans les autres lignées.

La survie et la prolifération des cellules de lymphome ABC-DLBCL est principalement induite par la voie NFkB. Aussi, afin de comprendre l'impact de l'extinction d'HSP110 dans des lignées de lymphome ABC-DLBCL, nous avons effectué des interférences ARN et évalué le niveau de la voie NFkB dans ces lignées ABC-DLBCL. Pour cela, nous avons utilisé une technique d'électroporation pour modifier transitoirement nos cellules DLBCL avec des siRNA. Après avoir déterminé les programmes d'électroporation nécessaires pour chaque lignée, nous avons évalué le niveau d'activation de la voie en mesurant la phosphorylation d'IKB. Les résultats de ces expériences sont présentés dans la **figure 24**.



Figure 24 : Phosphorylation d'IKBα dans les lignées ABC-DLBCL modifiées par siRNA. A Les lignées présentées ont été modifiées pour exprimer transitoirement un siRNA dirigé contre hsph1 (HSP110). Après 48h de transfection, les cellules sont lysées et la phosphorylation de IKBα est évaluée par western blot. **B** Analyse Densitométrique du niveau de P-IKB entre les lignées ABC-DLBCL transfectées par un siRNA contrôle versus un siRNA dirigé contre HSP110 (n=5, p<0.01, Mann and Whitney). **C** Western Blot du niveau P-IKBα dans les lignées ABC-DLBCL utilisés versus une lignée GC-DLBCL (SUD-HL4).

Les résultats de la **figure 24 A** présentent le niveau de phosphorylation d'IkBa après 48h d'interférence ARN. Dans le siRNA contrôle, on constate que chaque lignée ABC-DLBCL présente une activation NFkB (signal P-IKB fort). En revanche, dès que l'on supprime HSP110 par siRNA, on observe une diminution de la phosphorylation d'IkBa dans toutes les lignées ABC-DLBCL, sauf les U2932. Cette diminution est statistiquement significative comme en témoigne la densitométrie réalisée sur ces westerns blot (**Figure 24B**). On remarque que seule la lignée U2932 ne montre pas cette diminution de phosphorylation d'IkBa (**Figure 24A**). A ce propos, l'activité NFkB dans ces lignées est assez différente d'une lignée à l'autre (**Figure 24C**). Certaines lignées ont un signal P-IKB NFkB très important (Ly3, SUD-HL2) comparée aux HBL1 et Ly10 et U2932. Cependant, dans toute les cas, les lignées ABC-DLBCL ont un ratio P-IKBa / IKBa indiquant une forte activation de la voie, surtout lorsque comparé à une lignée GC-DLBCL (**Figure 24C**).

Pour aller un peu plus loin dans la caractérisation de la connexion NFkB et HSP110, nous avons voulu évaluer la répartition nucléaire et cytoplasmique des sous-unités NFkB dans des lignées modifiées transitoirement par un siRNA HSP110. La famille des sous-unités NFkB comporte 5 membres : RelA (p65), NFkB1 (p50 ;p105), NFkB2 (p52 ;p100), RelB and c-Rel (¹⁴⁵). On discerne deux voies NFkB, l'une dite canonique où une stimulation de récepteur aboutie à la translocation nucléaire des dimères p50/p65 ou p50/c-Rel tandis que la voie alterne NFkB met en jeu des dimères p52/RelB activés par la kinase NIK (¹⁴⁶). La voie NFkB retrouvée dans le lymphome est la voie dite canonique avec une large majorité de dimère p50/p65 retrouvés dans les fractions nucléaires des ABC-DLBCL (¹⁴⁵). La voie alterne n'est active que chez 10% des patients et est liée à la mutation de TRAF3 ou TRAF2 qui régule négativement la kinase NIK (¹⁴⁷). Bien que provoquant une hyperplasie plasmocytaire chez la souris lorsque activée de manière chronique, la voie alterne NFkB ne semble pas suffisante seule pour induire une transformation des cellules vers le DLBCL : Il faut une cooccurrence des mutations pour la voie alterne et BcL6 pour induire ce phénomène (¹⁴⁷). Ainsi, nous nous sommes concentrés sur la voie NFkB classique en regardant la répartition de p65, p50 et c-Rel dans les noyaux des ABC-DLBCL modifiées transitoirement par un siRNA HSP110

Nous avons réalisé ces données sur un ensemble de lignées et les résultats sont présentés pour les lignées Oci-Ly3 et SUD-HL2 dans la **figure 25** suivante.



Figure 25 : Répartition cytoplasme / noyau des sous-unités NFkB dans les lignées ABC-DLBCL modifiées par siRNA. A Les lignées Oci-Ly3 et SUD-HL2 ont été modifiées pour exprimer transitoirement un siRNA dirigé contre hsph1 (HSP110). Après 48h de transfection, les fractions cytoplasme / noyau sont séparées à l'aide du kit NE-PER[®] de Thermofisher. **B** Analyse densitométrique des westerns blot du niveau des sous-unités p65/p50/c-Rel dans les différentes lignées utilisées (SUD-HL2, Oci-Ly3, HBL1). **C** Western Blot du niveau P-IKBα dans la lignée SUD-HL2 après 48h de transfection avec un plasmide HSP110-GFP.

La **figure 25A** et **B** indiquent que lorsqu'on réduit l'expression d'HSP110 par siRNA, les protéines p65 et p50 sont moins présentes dans la fraction nucléaire des cellules DLBCL. Dans les Oci-Ly3, on pourra aussi remarquer que la quantité totale de p65 semble réduite dans les cellules puisque on en observe moins en fraction nucléaire mais aussi moins dans le cytoplasme. On observe aussi que HSP110 peut se retrouver dans le compartiment nucléaire. Si cette donnée est déjà connue dans la littérature dans le modèle du cancer colorectal et est synonyme de mauvais pronostique (¹⁴⁸), rien n'est décrit à ce jour sur le rôle nucléaire de HSP110 dans le lymphome B. La répartition cytoplasme / noyau de la protéine c-Rel est en revanche inchangée. Nous avons aussi cherché à surexprimer HSP110 dans les lignées de lymphome. Une seule lignée parmi celle à notre disposition est capable de se transfecter avec un plasmide par électroporation, et il s'agit des SUD-HL2. Le plasmide utilisé pour la surexpression d'HSP110 est un plasmide HSP110-GFP, permettant de voir la forme surexprimée sur western blot (apparition d'une bande à 130/140kD). A titre indicatif, le pourcentage de cellules transfectées (GFP positives) évalué par cytométrie avant la lyse des cellules est de 23.8% pour 0.5µg de plasmide et 34% pour la condition 1µg de plasmide. Au-dessus de 1µg de plasmide, l'électroporation devient toxique pour les cellules. Les résultats de cette expérience présentés dans la **figure 25C**. On observe que lorsque l'on exprime transitoirement 1µg de plasmide dans la lignée SUD-HL2, on augmente le signal de phosphorylation d'IKBα.

L'ensemble de ces résultats présentent donc une interconnexion entre HSP110 et la voie NFkB au sein des cellules de lymphomes. Avant d'aller plus loin dans la mécanistique de ce constat, nous avons voulu savoir si ce phénomène était spécifique à HSP110 ou si l'inhibition d'autres HSP menait aux mêmes résultats. En effet, mis à part HSP90, les HSP sont peu décrites dans le lymphome ABC-DLBCL et nous ne savions pas à ce moment-là si les HSP27/HSP70 pouvaient participer à la voie NFkB dans le lymphome. Pour répondre à cette question, nous avons inhibé les autres HSP par siRNA ou inhibition chimique transitoirement dans les lignées ABC-DLBCL. Les résultats sont présentés dans la **figure 26**.



Figure 26 : Phosphorylation d'IKBα dans les lignées ABC-DLBCL HBL1, Oci-Ly3, U2932 après inhibition HSP. Les lignées HBL1, Oci-Ly3, U2932 ont été transfectées par électroporation durant 48h avec des siRNA HSP27, HSP70, HSP110 ou avec un inhibiteur de HSP90, le PUH71 (1µM 16h). Les cellules sont ensuite lysées et la phosphorylation d'IKBα est évaluée par western blot. Les lignées HBL1, Oci-Ly3, U2932 ont été transfectées par électroporation durant 48h avec des siRNA HSP27, HSP70, HSP110 ou avec un inhibiteur 48h avec des siRNA HSP27, HSP70, HSP110 ou avec un inhibiteur 48h avec des siRNA HSP27, HSP70, HSP110 ou avec un inhibiteur 48h avec des siRNA HSP27, HSP70, HSP110 ou avec un inhibiteur de HSP90, le PUH71 (1µM 16h). Les cellules sont ensuite lysées et la phosphorylation d'IKBα est évaluée par western blot.

Pour réaliser la **figure 26**, nous avons utilisé les lignées répondant au siRNA HSP110 par une diminution de phosphorylation d'IKBα (HBL1, Oci-Ly3) et une ne présentant pas cette diminution (U2932). Avant

de s'intéresser au P-IKBα, on remarque que le profil HSP dans les lignées ABC-DLBCL est assez différent. Certaines HSP sont exprimées dans toutes les lignées (HSP110 et 90) avec des niveaux assez importants. En revanche, l'expression de HSP27 et HSP70 comporte un profil variable : HSP27 est exprimé chez les Oci-Ly3 et très faiblement chez les HBL1, mais est absente dans les U2932. Même chose pour HSP70 ou un signal positif est retrouvé dans les Oci-Ly3 et faiblement dans U2932, mais absent dans les HBL1. Ce constat est intéressant car il va aussi renforcer notre intérêt pour HSP110 : il s'agit de l'HSP dont le niveau est retrouvé de manière assez importante et surtout de manière **constante** dans les lignée DLBCL. Car, pour ne pas perdre notre objectif de vue, il s'agit d'explorer le rôle potentiel d'autre HSP que HSP90 dans le ABC-DLBCL, afin de proposer une cible potentielle dans ce lymphome agressif.

En ce qui concerne la phosphorylation d'IKBα, la **figure** 26 montre une réponse différente en fonction des HSP inhibées pour nos différentes lignées. L'inhibition chimique de HSP90 par le PUH-71 réduit la phosphorylation d'IKBα dans les lignées HBL1 et Oci-Ly3, constat en accord avec la littérature (voir introduction). De manière surprenante, ce n'est pas le cas dans les lignées U2932. On remarque également que le niveau de HSP70 est augmenté dans toutes les lignées lors de l'inhibition d'HSP90, chose également connu en publication et décrite par notre équipe (¹¹⁷). L'inhibition de HSP27 et HSP70 ne semble avoir que des effets limités dans les lignées présentées, avec parfois même des effets sur la forme totale d'IKBα (Oci-Ly3). L'inhibition d'HSP110 est encore une fois accompagnée d'une diminution de la phosphorylation de IKBα, sans effet compensatoire avec d'autres HSP.

Les résultats de ces premières figures permettent de dresser les constats suivant :

- L'expression des HSP est variable dans les lignées de lymphome, sauf pour HSP110 et HSP90.
- L'inhibition d' HSP110 diminue la phosphorylation ΙΚΒα, de manière similaire à HSP90.
- La surexpression d'HSP110 augmente la phosphorylation IKBα.
- L'inhibition à long terme de HSP110 par shRNA induit la mort des cellules ABC-DLBCL in vitro.
- U2932 ne présente pas de diminution de phosphorylation IKB lors de l'inhibition HSP110.

Fort de ces constats, nous nous sommes ensuite lancés dans la grande aventure moléculaire d'HSP110 dans les cellules ABC-DLBCL avec quelques questions principales : *quel est le rôle d'HSP110? Pourquoi ses effets ne sont pas observés dans toutes les lignées ? Les patients disposent-ils aussi d'un niveau HSP110 important ?*

Nous avons tenté de répondre à ces questions dans les paragraphes suivants.

HSP110 dans la voie NFkB

Comme décrit en introduction, deux voies principales sont responsables de l'activité NFkB : les voies TLR et BCR. L'activation de ces voies est dépendante de mutation, et chaque lignée dispose de mutations spécifiques. Celles-ci sont résumées dans le tableau suivant :

Lignée cellulaire	Signalisation BCR	Myd88	CD79	CARD11	A20	Source
OciLy3	+	Mutated L265P	WT	Mutated L251P	WT	PMID: 21179087 PMID 19412164
U2932	+	WT	WT	WT	Mutated	PMID: 23238016 PMID: 20054396
SUD-HL2	-	Mutated S225R	WT	WT	Mutated	PMID: 21179087 PMID 19412164
OciL10	+	Mutated L265P	CD79A (L191_G208del)	WT	WT	PMID: 21179087 PMID: 20054396
HBL1	+	Mutated L265P	CD79B (Y196F)	WT	WT	PMID: 21179087 PMID: 20054396
TMD8	+	Mutated L265P	CD79B (Y196H)	WT	WT	PMID 23292937 PMID23292937

Tableau 2 : Mutations présentées par les lignées ABC-DLBCL utilisées.

On constate que la plupart des lignées sont doublement activées pour la voie BCR et TLR (HBL1, Oci-Ly10, TMD8, Oci-Ly3) ou au moins l'une d'entre elle (SUDHL2). On remarque également que la lignée U2932 ne présente pas les mutations classiques TLR / BCR. Pourtant, la littérature décrit bien une activation BCR pour cette lignée avec un assemblage constitutif du complexe CBM (³⁵). Quelques recherches m'ont amené à comprendre comment cette activation CBM se fait dans cette lignée : entre autres mutations, les U2932 présentent une mutation de la protéine HCK de type L222M ou L201M (¹⁴⁹). Cette protéine appartient à la famille des kinases SRC, c'est donc une kinase proximale du BCR. Il a été montré que l'activité de cette kinase était un facteur de survie dans le modèle de la macroglobulie de Waldenstrom et certaines lignées de lymphome ABC (¹⁵⁰). L'activité de cette protéine est également inductible par l'IL6 et un shRNA de HCK est toxique pour les lignées ABC-DLBCL HBL1 et TMD8 (¹⁵⁰). Ainsi, bien que ne disposant pas des mutations classiques de la voie BCR, les U2932 montrent une activité NFkB et un assemblage du complexe CBM (³⁵).

Puisque HSP110 semble être une HSP intervenant dans l'activité de la voie NFkB, nous avons cherché à identifier si l'une des voies BCR ou TLR était modulée lors de l'interférence ARN dirigé contre HSP110.

En ce qui concerne la voie BCR, nous avons utilisé une approche de type duolink[®] (voir matériel et méthode) qui a été inspirée par les travaux de Louis Staudt présenté lors du congrès de « American Association for Cancer Research » ou AACR2017 à Washington auquel j'ai pu participer. Durant ce congrès et son intervention intitulée *"Mechanisms of oncogenic signaling and therapeutic resistance in lymphoma revealed by CRISPR-Cas9 screens"* il présente un moyen d'étude de l'activité de la voie BCR par duolink[®] : lorsque la voie est activée, les protéines de la voie BCR se retrouvent à proximité. On peut détecter cette proximité par une approche de microscopie tel que présenté dans la **figure 27** ci-dessous.



Figure 27: Images issue de la présentation de Louis Staudt à l'AACR 2017. A Rappel simplifié de la technique duolink : il s'agit d'une technique d'immunofluorescence utilisant un marquage avec des anticorps primaires (1), puis secondaire couplé à des sondes ADN (2). Si les sondes sont à proximités, celles-ci sont ensuite liées et amplifiée en présence d'un marqueur fluorescent donnant une fluorescence rouge (3/4/5). B Exemple de duolink[®] BcL10 x CARD11 dans une lignée activée pour la voie CBM (HBL1). **C** Exemple de duolink[®] de complexe protéiques assez large IgM x P-IkBα ou TLR9 x P-IkBα pour une lignée activée pour la voie BCR (HBL1) et non activée (BJAB).

Cette technique permet donc d'étudier l'activité de la voie BCR sans passer par un système d'immunoprécipitation. Nous avons alors choisi de reproduire cette technique de duolink[®] IgM x P-lkBα dans nos lignées modifiées transitoirement avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigée contre HSP110. Nous avons choisi de travailler sur les trois lignées suivantes : HBL1 (CD79 muté / Myd88 muté), Oci-Ly3 (CARD11 muté / Myd88 muté) et U2932 (BCR actif mais aucune mutation, Myd88 WT). Les résultats de l'expérience duolink[®] sur ces trois lignées est sont présentés dans la **figure 28**.



Figure 28 : Duolink® IgM x P-IkBα dans les lignées HBL1- U2932- Oci-Ly3 après 48h d'interférence ARN. A Les lignées HBL1- U2932- Oci-Ly3 ont été transfectées par électroporation avec un siRNA contrôle ou dirigé contre hpsh1. 72h après transfection, les cellules sont récupérées, fixées et perméabilisées avant incubation avec les anticorps primaires anti-IgM ou anti-P-IkBα. Le lendemain, le

protocole duolink[®] est appliqué selon les recommandations du fabricant. **B** Nombre de « spot » lumineux duolink[®] par cellules obtenus après analyse des images de microscopie. Les images sont analysées par le biais du logiciel ICY et l'analyse statistique est faite par le biais du logiciel graphpad (Mann and Whitney, ***p<0.001, ns= non significatif).

En ce qui concerne les cellules transfectées avec un siRNA contrôle, les données présentées dans la **figure 28 A et B** montrent que les trois lignées ABC-DLBCL ont bien une activité BCR. En revanche lorsque l'on regarde les transfections des siRNA dirigés contre hsph1, les résultats sont différents. Pour les HBL1 et Oci-Ly3, on observe une diminution importante du signal duolink[®] pour IgM x P-IkBα. Or, pour une lignée tel que les U2932, le signal duolink[®] reste le même (**figure 28A et B**). Puisque les U2932 sont actives pour la voie BCR sans mutation des protéines adaptatrices, on en déduit que la protéine HSP110 n'est pas impliquée directement dans la voie BCR ou la stabilisation des complexes protéiques de cette voie. L'effet observé dans les autres lignées ne semble donc pas lié à l'intervention d'HSP110 directement dans cette voie BCR mais potentiellement lié à un autre évènement moléculaire.

Avant de proposer une explication à ce phénomène, il est intéressant de présenter quelques résultats de la voie TLR. Pour analyser la conséquence de l'absence d'HSP110 dans l'activité de la voie TLR, nous avons modifié nos cellules transitoirement par siRNA et regardé la phosphorylation de certaines kinases de cette voie TLR. Les résultats sont présentés dans la **figure 29**.



Figure 29 : Phosphorylation de IRAK1 et K63 ubiquitination de TRAF6 dans des lignées ABC-DLBCL transfectées avec un siRNA contrôle ou hsph1. A Vue schématique de la voie TLR dans le lymphome ABC-DLBCL muté pour Myd88. L'activation continue du Myddosome mène à la phosphorylation d'IRAK1, qui va ensuite se détacher du Myddosome pour interagir avec TRAF6 et entrainer sa K63auto-

ubiquitination. **B** Les lignées HBL1 Oci-Ly3 et U2932 ont été transfectées par un siRNA contrôle ou dirigé contre hsph1 par électroporation. Après 48h d'interférence ARN, les lignées ont été récupérées et lysées afin d'évaluer la phosphorylation d'IRAK1. **C** Immuno précipitation de TRAF6 dans la lignée SUD-HL2 après 48h de transfection par siRNA contrôle ou dirigé contre hsph1. **D** Immuno précipitation des protéines K63 ubiquitinées dans les lignées SUD-HL2 et Oci-Ly10 (Myd88 S222R et L265P respectivement) transfectées 48h par un siRNA contrôle ou dirigé contre hpsh1.

Nous nous sommes intéressés en priorité à IRAK1 car comme le montre la figure 29A, cette kinase se trouve à l'interface entre le Myddosome (Myd88 et IRAK4) et la suite de transduction de signal NFKB (via TRAF6, le complexe TAK1 puis NFkB). Dans la figure 29B, nous observons que les cellules transfectées HBL1 et Oci-Ly3 par siRNA contrôle ont un signal phospho-IRAK1 assez important, tandis que les cellules U2932 ne présentent pas de IRAK1 phosphorylé. Ceci est en accord avec les mutations de chacune des lignées : les HBL1 et Oci-Ly3 sont mutées de manière hétéro ou homozygote pour Myd88 (L265P) tandis que les U2932 présentent deux allèles Myd88 sauvages. Dans le cas des mutations Myd88, l'auto activation de la voie et l'auto assemblage du Myddosome mène à la phosphorylation d'IRAK1. Lorsque l'on réduit l'expression de HSP110 par siRNA, on observe une réduction importante de la phosphorylation d'IRAK1 dans les lignées HBL1 et Oci-Ly3 (figure 29B). Les cellules U2932 ne présentent pas de variation de cette voie (figure 29B). Afin de confirmer la diminution de l'activité de la voie TLR/Myd88, nous avons regardé le niveau de K63 ubiquitination de TRAF6. Cette auto-ubiquitination est en effet nécessaire à la suite de transduction de signal de la voie TLR et est induite après liaison avec IRAK1 phosphorylé. A ce titre, nous avons réalisé des immunoprécipitations de TRAF6 afin de regarder la quantité de P-IRAK1 lié à cette protéine. Les résultats présentés dans la figure 29C montrent que dans des SUD-HL2 transfectées par siRNA contrôle, la protéine TRAF6 interagit avec la protéine P-IRAK1. En revanche, dans les cellules modifiées par siRNA dirigé contre hsph1, l'interaction TRAF6 / P-IRAK1 semble beaucoup moins importante (figure 29C). Ces résultats ont étés reproduits au moins trois fois dans les autres lignées (non montré ici). Nous avons aussi réalisé des immuno-précipitations des protéines K63 ubiquitinées dans les lysats de DLBCL transfectées par siRNA contrôle ou dirigé contre hsph1. Les résultats présentés dans la figure 29D montrent que les cellules transfectées avec un siRNA contrôle présentent une K63-ubiquitination de TRAF6 tandis que les cellules transfectées avec un siRNA hsph1 ne la présentent pas. Ainsi, dans des lignées présentant une mutation Myd88, l'absence d'HSP110 semble diminuer l'activité de la voie TLR/Myd88.

HSP110 semble donc importante pour la survie de la cellule, et potentiellement intervenir dans la voie TLR/Myd88, mais seulement lorsqu'une mutation est présentée par les lignées ABC-DLBCL.

En quoi ce constat aide-t-il à comprendre la figure 6 et les résultats du duolink[®] de la voie BCR ?

L'explication provient encore des données de Louis Staudt : lors de sa présentation à l'AACR 2017, ce dernier a présenté l'interconnexion des deux voies de signalisation BCR et TLR. Cette interconnexion est présentée dans la **figure 30** suivante.



Figure 30 : Extraits des diapositives de Louis M Staudt présentant l'interconnexion entre la voie BCR et TLR (AACR 2017). A Vue schématique de la connexion des voies TLR/ BCR dans le lymphome ABC-DLBCL. B Signal duolink[®] entre les deux adaptateurs CARD11 et BCL10 du complexe CBM en fonction de l'extinction de certaines protéines dans la lignée Oci-Ly10.

Les voies BCR et TLR se rejoignent donc au niveau des endolysosomes (**figure 30A**). Ces deux voies ne sont pas indépendantes l'une de l'autre comme le montre la **figure 30 B**. En effet, le duolink[®] montrant la proximité entre deux adaptateurs BCR (CARD11 x BcL10) peut être modulé en fonction de l'extinction de certaines protéines oncogéniques ou non (**figure 30B**). En effet, dans les Oci-Ly10 (CD79A mutantes, Myd88 L265P), un shRNA CD79A aboli en partie le duolink[®] CARD11 x BcL10 (**figure 30B**). Ce résultat est en accord avec la mutation CD79A de cette lignée : sans CD79A, pas de voie CBM. Or, il devient intéressant de regarder l'effet de l'extinction de deux protéines de la voie TLR (Myd88 et TLR9) dans cette lignée. L'extinction de TLR9 mais surtout de Myd88 réduit l'intensité du signal de duolink dans les Oci-Ly10, et de manière très similaire à l'extinction de CD79A. Ainsi, on constate que les deux voies fonctionnent de manière coordonnée. Seul défaut de la présentation de Staudt : celuici ne présente pas si la réciproque est vraie ! En effet, par pure curiosité scientifique, on est en droit de se demander si l'extinction des protéines telles que CD79 ou du complexe CBM pourrait diminuer l'activité de la voie TLR/Myd88.

Pour compléter un peu plus cette implication de HSP110 dans la voie TLR/ Myd88, nous avons alors utilisé un système de gène rapporteur NFkB introduit dans les cellules en même temps que différents vecteurs plasmidiques codant pour Myd88 ou HSP110. En effet, une collaboration avec l'équipe du professeur Daniel Krappmann nous a permis de récupérer les vecteurs des formes sauvages ou mutées pour Myd88. Nous avons alors co-transfectés ces plasmides dans des lignées non ABC-DLBCL en combinaison avec HSP110 afin de voir si la voie NFkB induite par l'axe TLR/ Myd88 était modulée en présence / absence de HSP110 les résultats de ces expériences sont présentés dans la **figure 31**.



Figure 31 : Signal NFkB dans des lignées de lymphome ou non cancéreuses après combinaisons de transfection Myd88 / HSP110. A La lignée de lymphome GC-DLBCL BJAB a été transfectée par électroporation pour exprimer des plasmides HSP110 GFP (0.5µg), les plasmides Myd88 tagués HA sauvages ou mutés (0.5µg) seuls ou en combinaison. Après 24h de transfection, les cellules sont récupérées et lysées pour analyser leur niveau de P-IKB par western blot. B La lignée non cancéreuse HEK293T a été transfectée transitoirement avec les plasmides GFP et le plasmide rapporteur NFkB (0.4µg dans toutes les conditions), ainsi que les plasmides HSP110 tagué HA, les vecteurs Myd88 tagués HA seuls ou en combinaisons. Les quantités de plasmides utilisées sont indiquées en micro grammes (µg) pour chaque condition. Après 24h de transfection, l'activité luciférase est analysée pour chaque condition.

La figure 31A présente les résultats du niveau de phosphorylation IkBa après transfection des différents vecteurs dans la lignée BJAB. Sans transfection, on constate que ces lignées GC-DLBCL ne présentent pas de signal P-IkBa. Lorsqu'on introduit le plasmide HSP110 GFP (colonne deux), on observe une très légère augmentation du niveau de P-IkBa, de même qu'avec l'ajout du plasmide Myd88 sauvage seul. Lorsqu'on introduit le plasmide Myd88 L265P en revanche, on observe une augmentation de P-IkBa dans la lignée BJAB (colonne 4). Ceci est en accord avec les données déjà disponibles en littérature et fournies par l'équipe du professeur Krappmann : l'expression seule des vecteurs Myd88 mutés est capable d'induire une activation de la voie NFkB (⁶⁴). Lorsque que l'on fait une combinaison de transfection des plasmides HSP110 et Myd88 sauvage, nous n'observons pas d'augmentation de la phosphorylation d'IkBa par rapport à la transfection seule des deux plasmides. En revanche, la co-transfection des plasmides HSP110 et Myd88 L265P donne un signal de P-IkBa plus marqué, signifiant une activation de la voie plus importante (colonne 6, figure 31A). Ces résultats indiquent une synergie dans l'activation de la voie NFkB entre HSP110 et Myd88 L265P.
Ces résultats ont été confirmés dans la figure 31B. Les cellules HEK293T, lignée non cancéreuse et ne présentant pas d'activité NFkB importante, sont ici transfectées avec la même quantité de plasmide GFP (plasmide normalisateur de transfection) et de plasmide luciférase rapporteur de la voie NFkB. Les cellules seront ensuite transfectées avec une quantité fixe des plasmides Myd88 sauvages ou L265P, plus ou moins une quantité grandissante d'HSP110. Dans cette figure 31B, on observe que l'expression seule de HSP110 (colonnes HSP110 0.7µg / Myd88 0µg) ne permet pas d'obtenir un signal luciférase, donc ne produit pas d'activation NFkB détectable. Les transfections des plasmides seuls Myd88 (colonne HSP110 0µg / Myd88 WT ou L265P 0.4µg) ne donnent également pas de signal NFkB, bien qu'un léger pic soit observé pour la forme Myd88 L265P. Si l'expression d'HSP110 à de faibles doses (0.1µg et 0.35µg) ne permet pas de voir un signal luciférase dans les HEK293T transfectées avec le Myd88 sauvage, l'expression de 0.7µg d'HSP110 pour la même quantité de Myd88 sauvage permet d'obtenir un signal NFkB conséquent. Pour la forme L265P, si 0.1µg d'HSP110 ne permet pas d'obtenir un signal luciférase important, les conditions 0.35µg et 0.7µg d'HSP110 pour la même quantité de Myd88 L265P donnent une intensité luciférase importante et surtout maximale pour la condition 0.7µg. Ces figures nous indiquent donc que HSP110 peut avoir un effet synergique avec Myd88 pour l'induction de la voie NFkB, et particulièrement avec Myd88 L265P.

De tous ces résultats, nous pouvons dresser les constats suivant :

- HSP110 ne semble pas intervenir dans la voie BCR en absence de mutation Myd88.
- L'inhibition d' HSP110 diminue l'activité de la voie TLR dans les lignées mutées pour Myd88.
- L'inhibition d' HSP110 diminue l'activité de la voie BCR dans des lignées mutées pour Myd88 puisque les deux voies sont interconnectées.
- HSP110 semble renforcer la voie NFkB induite par Myd88 L265P.

Avec ces constats, nous tenions une première piste de l'implication d'HSP110 dans l'activité de la voie NFkB dans le lymphome ABC : HSP110 semble intervenir dans la voie TLR/Myd88. Puisque nous avions cette étroite corrélation avec Myd88, et ; sachant que les HSP sont des protéines chaperonnes connues pour stabiliser les protéines mutées dans d'autres pathologies ; nous nous sommes demandé si HSP110 pouvait interagir avec Myd88 dans les cellules ABC-DLBCL. A cet effet, nous avons alors d'abord réalisé des expériences de duolink[®] pour voir si les protéines se trouvaient à proximité. Les résultats de ces expériences sont présentés dans la **figure 32**.



Figure 32 : Duolink® HSP110 Myd88 dans les cellules ABC-DLBCL. A Duolink® dans les lignées HBL1 Oci-Ly3 et U2932 pour les couples de protéines HSP110 x Myd88 et HSP110 x HSP70 dans les lignées contrôles ou transfectées par un siRNA dirigé contre hsph1. **B** Analyse du nombre de spots par cellules pour chaque couple de protéines réalisée avec le logiciel ICY (***= P<0.001, Mann and Whitney).

On observe dans la figure 10 qu'une proximité entre HSP110 et Myd88 peut-être retrouvée *in cellulo* dans les lignées HBL1, Oci-Ly3 et U2932 (**figure 32 A et B**). Cette proximité semble plus importante en terme de nombre de spots par cellule que la proximité des protéines HSP110 et HSP70 (qui sert de contrôle positif, **figure 32B**). Lorsque l'on diminue l'expression de HSP110 par siRNA, nous n'observons plus de signal duolink[®] dans les cellules ABC-DLBCL.

Fort de ce constat, nous avons cherché à savoir si le signal duolink[®] observé entre nos deux protéines était lié à une interaction directe entre celles-ci. Nous avons donc réalisé des expériences d'immuno-précipitation avec les lignées de lymphome, les résultats sont présentés dans la **figure 33**.

La figure 33A nous présente l'immuno-précipitation d'HSP110 et Myd88 dans les lignées L265P ABC-DLBCL. On observe qu'il semble y avoir interaction entre HSP110 et Myd88 dans ces deux lignées puisque l'immuno-précipitation fonctionne dans les deux sens, avec de bons niveaux retrouvés pour chacune des protéines. Pour les U2932 qui présentent un Myd88 sauvage, l'immuno-précipitation fonctionne aussi (figure 33B). Si cette figure 33B indique que la forme sauvage de Myd88 semble également être immuno-précipité lorsqu'on immuno précipite HSP110, le niveau retrouvé est beaucoup plus faible que pour les forme Myd88 L265P. Pour être sûr de notre constat, nous avons utilisé le modèle HEK293T dans lequel nous avons transfecté transitoirement les plasmides codant pour HSP110 GFP et Myd88 HA. Les résultats sont présentés dans la figure 33C. On confirme alors que l'interaction existe pour les deux formes Myd88 (sauvage et muté) avec HSP110



Figure 33 : Etude de l'interaction HSP110 / Myd88 par immuno précipitation dans des lignées ABC-DLBCL et dans une lignée non cancéreuse HEK293T. A Les lysats des lignées HBL1 et Oci-Ly3 ont été utilisés pour une immuno précipitation avec un anticorps non relevant (Ig) un anticorps dirigé contre HSP110 ou Myd88. Deux lg sont présentés puisque les anticorps HSP110 et Myd88 ne sont pas du même isotype. B Immuno précipitation d'HSP110 dans les U2932 pour observer l'interaction avec Myd88. **C** Immuno précipitation contrôle, HA ou GFP dans des HEK293T transfectées par des combinaisons de plasmide HSP110GFP et Myd88 sauvage ou L265P tagué HA.

Nous tenions donc une piste intéressante sur la relation HSP110 / voie TLR/NFkB : HSP110 semble capable d'interagir avec Myd88, l'acteur principal tout en amont de la voie TLR oncogénique dans le lymphome ABC. Il nous restait cependant à identifier comment cette interaction induisait l'activité de la voie Myd88. Un élément a alors guidé notre réflexion : il faut pour cela revenir à la **figure 31A**. Dans cette figure, nous avions transfecté dans les BJAB (lignée **GC-DLBCL**) les formes sauvage (WT) et L265P de Myd88. On pouvait suivre l'efficacité de transfection de Myd88 en regardant le niveau de tag HA par western blot. Lorsque les deux formes Myd88 sont transfectées seules avec la même quantité de plasmide, on observe que le niveau de Myd88 sauvage (WT) et L265P ne sont pas les même : le niveau HA correspondant au Myd88 sauvage exprimé est deux fois plus important que le niveau HA correspondant au Myd88 L265P. La forme Myd88 L265P semble donc avoir une stabilité moins importante que la forme sauvage, constat en accord avec la littérature utilisant ces mêmes plasmides (⁶⁴). De manière intéressante, dans cette même **figure 31A**, nous avions aussi co-exprimé les formes Myd88 en présence d'HSP110. Si l'expression d'HSP110 en présence de Myd88 sauvage ne semble pas faire varier le niveau HA total, l'expression d'HSP110 avec la forme Myd88 L265P permet d'obtenir un niveau bien plus important de signal HA, presque aussi fort que dans la double transfection Myd88

sauvage / HSP110. Ceci est une donnée intéressante lorsque l'on s'intéresse aux HSP. En effet, les HSP sont décrites pour stabiliser un ensemble de protéines cellulaires, mais ont parfois une affinité plus importante pour des protéines mutées (¹¹⁷). Ainsi, nos recherches se sont orientées vers l'étude de la stabilisation de Myd88 par HSP110. Dans cette optique, nous avons essentiellement travaillé avec la lignée HEK293T : en effet, nous avions besoin d'un modèle se modifiant facilement et par des quantités de plasmide importantes.

Stabilité de Myd88 en fonction de l'expression d'HSP110

Dans un premier temps, nous voulions confirmer le constat fait dans la **figure 9A** chez les HEK293T. Pour cela, nous avons transfecté des quantités croissantes d'HSP110 dans les HEK293T en présence d'une quantité fixe de plasmide Myd88 sauvage ou muté. Les résultats sont présentés dans la **figure 34**.



Figure 34 : Conséquence de l'effet dose d'HSP110 sur le niveau d'expression Myd88 sauvage ou muté dans des HEK293T. La lignée HEK293T a été transfectée avec une dose fixe de 0.4µg de plasmide Myd88 sauvage (**A**) ou muté (**B**). A cette dose unique de plasmide Myd88 s'ajoute des doses croissantes de plasmide codant pour HSP110 GFP (voir figure pour les quantités) ou une dose de 0.7µg de mutant inhibiteur d'HSP110 (DE9GFP). Après 48h de transfection, les cellules sont lysées et analysées par western blot. **C** Niveau mRNA de Myd88 L265P dans les effets dose d'HSP110 dans les HEK293T. Une partie des cellules transfectées issues de la figure 12B a été récupérée pour réaliser des extractions

d'ARNm suivie de qPCR pour évaluer le niveau de transcription du plasmide Myd88. Nous avons utilisé deux sets de primers Myd88 pour cette amplification. **D** Niveau de Myd88 L265P dans des HEK transfectées avec un plasmide HSP110 NLS, plasmide codant pour un HSP110 déficient pour le site NLS (Nuclear Location Site).

Les figures 34 A et B nous présentent les résultats de la surexpression croissante d'HSP110 dans les HEK293T en présence d'une dose unique de plasmide Myd88. Pour la figure 34A, on observe qu'une surexpression d'HSP110 semble faire varier le niveau Myd88 WT dès la dose de 0.1µg de plasmide HSP110-GFP, car le niveau HA est plus important que dans la condition GFP (0.7µg). Aux conditions 0.25µg et 0.5µg de plasmide HSP110-GFP transfectées, nous observons un signal d'expression HA maximal pour Myd88 sauvage. Nous avons également utilisé le mutant d'HSP110 dans cette expérience (DE9). Ce « mutant naturel » a été identifié par notre équipe lors de l'étude d'HSP110 dans le cancer colorectal. Ce mutant correspond à la protéine HSP110 qui aurait perdu sont PDB ou Peptide Binding Domain. Il agit comme dominant négatif, c'est-à-dire un inhibiteur de l'action d'HSP110. La présence de ce mutant DE9 est de meilleur pronostique pour le traitement des patients atteints de cancer colorectal (¹³⁸). Dans notre expérience, l'expression du mutant d'HSP110 permet de l'utiliser comme un inhibiteur d'HSP110. On observe que la transfection de ce mutant (bande GFP apparaissant à 70 kilo dalton) permet de diminuer le niveau Myd88 par rapport à des cellules transfectées pour la GFP (figure 34A). Le même phénomène est retrouvé avec la forme mutée de Myd88 (figure 34B). Plus on exprime HSP110 GFP, plus le niveau de Myd88 semble augmenter, et ce légèrement dès 0.1µg mais fortement dès 0.25µg. Là encore, l'utilisation du mutant DE9 permet de diminuer l'expression de Myd88 par rapport à la condition GFP. Enfin, en regardant les deux expériences A et B, on observe que le niveau global de Myd88 semble initialement plus important pour la forme sauvage que la forme L265P dans la condition GFP seule. Ceci est en accord avec les résultats que nous avions trouvés précédemment dans les BJAB (figure 31).

Si le niveau Myd88 varie autant, il y avait deux explications possibles : la surexpression d'HSP110 pouvait agir soit au niveau transcriptionnel (augmentation de la transcription du gène Myd88) soit directement au niveau de la stabilité de la protéine. Même si nous avions identifié une interaction avec les formes Myd88 (**figure 33**), il nous fallait vérifier qu'il n'y avait pas d'effet transcriptionnel d'HSP110 sur Myd88. Pour répondre à cette question, nous avons procédé à deux expériences : la première est de mesurer le niveau d'ARNm de Myd88 (**figure 34C**) et la deuxième étant d'utiliser encore un mutant de HSP110 (**figure 34D**). Dans la **figure 34C**, on observe que lorsque l'on surexprime HSP110 en présence d'une quantité fixe de plasmide Myd88, le niveau total d'ARNm de Myd88 ne varie pas. De même, nous avons utilisé un mutant d'HSP110 déficient pour son site NLS, son site de localisation nucléaire. Cela signifie que nous n'observons avec ce mutant que les actions cytoplasmiques de HSP110. Là encore, le niveau HA correspondant à Myd88 L265P est augmenté en surexprimant cette

protéine HSP110 NLS, avec une dose similaire à la **figure 34B** (0.5µg). Ainsi, l'ensemble de ces figures montre que des doses croissantes d'HSP110 augmentent le niveau de la protéine Myd88, selon un mécanisme non lié à un effet transcriptionnel.

Pour déterminer si la protéine HSP110 était impliquée dans la stabilisation de Myd88, nous avons procédé à des expériences d'inhibition de la traduction avec le cycloheximide. Pour cela, nous avons reproduit la transfection des HEK293T avec les formes Myd88 sauvage ou L265P en présence de GFP, de plasmide HSP110-GFP, et de mutant DE9-GFP. Ces différentes transfections ont ensuite été exposées à des doses de 100µg/mL de cycloheximide (CHX) pendant les temps indiqués dans la **figure 35**.



Figure 35 : Conséquence de la transfection d'HSP110 sur la stabilité de Myd88. La lignée HEK293T a été transfectée avec une dose fixe de plasmide Myd88 sauvage (**A**) ou L265P (**B**) à raison de 0.4µg, en combinaison avec la GFP (0.7µg), HSP110 GFP (0.5µg) ou DE9GFP (0.7µg). Après 24h de transfection, les cellules ont été incubées en présence de cycloheximide (CHX) à 100µg/mL pendant les temps indiqués. Les cellules ont été récupérées puis lysées et le niveau de Myd88 HA a été évalué par western blot (A et B). La densitométrie du western blot présentée en **A** et **B** est résumée dans la figure **C**.

Dans la **figure 35A et B**, on observe que notre expérience de cycloheximide à plutôt bien fonctionnée puisque le niveau de cycline B1, cycline impliquée dans les phases de mitose, est diminué au fur et à mesure du temps. On observe également que la protéine HSP110 comporte une stabilité d'environ 24h. En effet, dans les conditions de transfection GFP ou HSP110 GFP, le signal HSP110 est constant

jusqu'à 24h, puis diminue à 48h. Dans la **figure 35A** correspondant à la forme Myd88 WT exprimée en parallèle de la GFP, on observe que la stabilité de la forme Myd88 WT semble de 12h, puisque le niveau est constant jusque-là et chute de moitié à 24h (**figure 35C**) et est quasi nul à 48h (**figure 35A et C**). Pour la transfection avec HSP110, le niveau initial de Myd88 est plus important pour Myd88 WT au temps 0 et est maintenu à 12h (**figure 35A et C**). A 24h, le niveau Myd88 sauvage est encore important comparé à la transfection GFP seule (deux tiers du signal temps 0), et un signal Myd88 est encore observable à 48h, signifiant que HSP110 peut augmenter la stabilité de cette protéine.

Les mêmes constats peuvent être réalisés avec la forme Myd88 L265P (**figure 35B et C**). Dans la condition GFP, le niveau Myd88 L265P est stable jusqu'à 12h et chute ensuite à 24h. Pour ce qui est de la transfection Myd88 L265P en présence d'HSP110, le profil observé est très intéressant : non seulement le niveau initial de Mdy88 est bien plus élevé que dans la condition GFP ou DE9, mais il est maintenu à 12h et surtout à 24h, puis chute enfin à 48h. On observe donc que la surexpression de HSP110 permet de stabiliser Myd88 au cours du temps, avec un doublement du temps de demi-vie de la forme Myd88 L265P notamment.

Pour finir, il fallait confirmer ces résultats dans le modèle du lymphome. Nous avons donc repris nos trois lignées d'intérêt et effectué des électroporations afin de voir si le niveau de Myd88 variait en fonction de la présence/absence d'HSP110. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la **figure 36**.



Figure 36 : Niveau de Myd88 dans les lignées ABC-DLBCL après transfection. A Les lignées HBL1 Oci-Ly3 et U2932 ont été transfectées par un siRNA contrôle ou dirigé contre hsph1 par électroporation. Après 72h d'interférence ARN, les lignées ont été récupérées et lysées afin d'évaluer le niveau Myd88. B La lignée HBL1 a été transfectée par un siRNA contrôle ou dirigé contre hsph1 par électroporation. Après 72h d'interférence ARN, les transfections ont été soumises à une inhibition de la dégradation protéasomale de Myd88 par MG132 (10μM) durant les temps indiqués.

La **figure 36A** présente le niveau de Myd88 après 72h de transfection des lignées ABC-DLBCL. Nous avons choisi le temps 72h car les siRNA comportent une efficacité maximale 48h post transfection et ;

69

sachant que la stabilité de la protéine Myd88 était de 12h (**figure 35**), nous voulions nous placer dans la fenêtre de temps correspondante à la diminution attendue de Myd88. La **figure 36A** nous indique que les lignées portant le Myd88 muté L265P ont un niveau diminué lorsqu'elles sont modifiées avec un siRNA dirigées contre hsph1 (HBL1 et Oci-Ly3). En revanche, les U2932 ne montrent pas de diminution de niveau de Myd88. Cela semble conforter les résultats présentés précédemment allant dans le sens d'une stabilisation de Myd88 par la protéine HSP110. Enfin, nous montrons que cette stabilisation semble dépendante d'un processus de dégradation protéasomale (**figure 36B**). En effet, dans des cellules modifiées avec un siRNA contrôle, l'ajout de l'inhibiteur du protéasome MG132 ne modifie pas le niveau Myd88. En revanche, dans des cellules dont l'expression de HSP110 est diminuée par siRNA, le niveau de Myd88 est diminué au temps 0 puis peu à peu restauré à 3 et 5h d'inhibition du protéasome.

Ainsi, au terme de ces expériences, nous disposions des informations suivantes :

- HSP110 interagit avec Myd88 sauvage et L265P.
- HSP110 augmente la stabilité de Myd88 sauvage mais surtout muté selon un mécanisme non transcriptionnel
- L'inhibition d' HSP110 diminue le niveau de Myd88 dans les lignées Myd88 mutés.
- HSP110 semble stabiliser Myd88 et inhiber sa dégradation protéasomale.

L'ensemble de ces données semble indiquer que l'inhibition d'HSP110 pourrait induire la mort des cellules ABC-DLBCL *in vitro*. Cette information pourrait être d'intérêt si un inhibiteur d'HSP110 venait à être caractérisé (voir partie 2 : inhibition d'HSP110 par des molécules chimiques dans le lymphome ABC-DLBCL). Avant de passer à cette partie, il nous manque un dernier point.

HSP110 et lymphome ABC-DLBCL : une cible potentielle chez les patients ?

Dernier point de notre démonstration ; HSP110 est-il bien exprimé chez les patients ABC-DLBCL ? Car si l'inhibition de cette protéine pourrait potentiellement permettre d'ajouter une cible supplémentaire à l'arsenal clinique anti ABC-DLBCL, encore faut-il que cette protéine ait une expression suffisante dans le lymphome ABC-DLBCL. Pour cela, nous avons évalué l'expression d'HSP110 chez des patients ABC DLBCL, GC-DLBCL ainsi que dans des coupes d'amygdales saines non tumorales. Les résultats sont présentés dans la **figure 37**.



Figure 37 : Etude de l'expression de HSP110 dans des échantillons de tissu non tumoraux et tumoraux. A Etude de l'expression de l'expression de HSP110 par immuno-histochimique. Les échantillons présentés correspondent à des coupes d'amygdales réactives issues de patients non cancéreux (Normal Tonsil) ou de biopsie de tumeurs de patients atteint de lymphome GC ou ABC DLBCL (ABC ou GC DLBCL Lymph Nod). B Exemple d'intensité de marquage histochimique de la protéine HSP110 dans des patients ABC-DLBCL, avec une table résumant les intensités de marquage en E. C Niveau ARNm de HSP110 extraits des ganglions non tumoraux réactifs (RLN pour réactive lymph nods) ou de biopsies des lymphomes de type GC ou ABC. D Exemple de l'expression des HSP au cours de l'activation lymphocytaire B normale suivie par western blot sur 7 jours après activation de lymphocytes B humains isolés du sang in vitro avec une activation T mimétique activation (BCR, CD40L, CpG IL15). E Tableau récapitulatif de l'intensité de marquage HSP110 pour chaque patient de la figure **B. F** Exemple de l'expression des HSP au cours de l'activation lymphocytaire B normale suivie par western blot sur 72h après activation de lymphocytes B humains isolés du sang in vitro avec une activation T mimétique activation (BCR, CD40L, CpG IL15). G Immuno Cyto Chimie sur l'amygdale humaine réactive non pathologique. En bleu : marquage DAPI, en vert : Ki67, en rouge : HSP110, et la superposition des 3 images est proposées en bas à droite.

Actine

Les résultats présentés dans la **figure 37A** montrent que la protéine HSP110 est exprimée dans l'amygdale normale. Plus particulièrement, les images prises aux plus gros grossissements montrent que les plus forts marquages pour HSP110 sont observés dans une structure particulière de

l'amygdale : les centres germinatifs. Ceci est une donnée intéressante étant donné que les centres germinatifs sont composés à plus de 90% par des lymphocytes activés et en différenciation. De plus, les lymphocytes tumoraux DLBCL proviennent de lymphocytes du centre germinatif : l'expression d'HSP110 semble donc un élément commun aux lymphocytes en différenciation et tumoraux. Dans les tumeurs ABC ou GC-DLBCL, on retrouve une forte expression d'HSP110, partout dans la masse tumorale (figure 37A). En s'intéressant un peu plus aux coupes issues des biopsies des patients ABC-DLBCL, on s'aperçoit que toutes sont positives pour HSP110, avec plusieurs intensités d'immunomarquage retrouvée (figure 37B et E). La plupart des marquages HSP110 sont observés à une intensité forte (intensité 3, figure 37E). Ces constats vont de pair avec l'analyse du niveau ARNm d'HSP110 : comparé à une amygdale réactive, le niveau ARNm de HSP110 dans les tumeurs ABC ou GC-DLBCL est retrouvé significativement plus important (figure 37C). L'ensemble de ces constats montrent donc une expression de la protéine HSP110 chez les 13 patients ABC étudiés mais également dans le centre germinatif. Chose intéressante, HSP110 semble absente dans les lymphocytes B naïfs. En effet, après ces premiers marquages HSP110 dans l'amygdale normale, nous avions effectué un ensemble d'activations B in vitro pour en étudier le profil HSP. L'un de ces profils est présenté en figure 37D pour une activation sur 7 jours, et en figure 37F sur 72h. Les lymphocytes B naïfs (D0) présentent un faible taux de HSP, et surtout une expression variable : HSP90 et HSP27 peuvent parfois avoir une expression faible (figure 37D), mais les cellules ne présentent généralement pas d'expression HSP (Figure 37F). Cependant, dans toutes nos activations in vitro, la stimulation T mimétique de lymphocytes B naïfs a conduit à l'expression de HSF1, le facteur de transcription principal des HSP. Cette induction est progressive, avec une expression dès 24h (figure 37F) et devient maximale au jour 7 (figure 37D). Conjointement à l'expression de HSF1, nous avons toujours observé une induction d'HSP110 dans les mêmes délais, les autres HSP variant peu par rapport au temps 0 (figure 37F et 37 D). Cette expression HSP110 est maintenu pendant 4 jours in vitro, et pourrait correspondre aux stades de prolifération du centre germinatifs et /ou aux stades préplasmocytaires. Il y a donc une expression importante de HSP110 dans des échantillons normaux comportant des B activés, mais surtout dans les biopsies de patients DLBCL. La question que nous nous sommes ensuite posé était de savoir si l'expression de HSP110 pouvait être corrélée à celle de Myd88 et si nous pouvions observer une proximité par duolink[®] dans ces échantillons patients. Les résultats de ces expériences sont présentés dans la figure 38.



Figure 38 : Corrélation entre l'expression d'HSP110 et Myd88 chez les patients ABC-DLBCL et proximité dans les échantillons patients. A Niveau d'expression des protéines HSP110 Myd88 dans 13 biopsies de tumeurs de patients ABC-DLBCL. B Graphique de corrélation de Pearson entre le niveau d'HSP110 et de Myd88 déterminé par densitométrie après western blot. R = coefficient de corrélation. C Duolink[®] HSP110 x Myd88 sur une lame de biopsie de patients ABC-DLBCL.

Pour réaliser la **figure 38A et B**, nous avons extraits les protéines des biopsies de tumeurs de patients ABC-DLBCL. Après western blot, on visualise une corrélation entre le niveau d'HSP110 présent dans la tumeur des patients et le niveau de Myd88. Durant la rédaction de ces lignes, on précise que nous ne disposions pas encore du statut mutationnel Myd88 chez ces patients. Quoiqu'il en soit, le coefficient de corrélation présenté dans la **figure 38B** montre bien une corrélation d'expression entre nos deux protéines dans ces échantillons. Enfin, le duolink[®] entre HSP110 et Myd88 fonctionne également dans les tumeurs de patients. En effet, un observe un ensemble de spot rouge apparaitre dans l'intérieur de la tumeur. A l'extérieur de la tumeur, il semble qu'il y ait moins d'amplification duolink[®] ou carrément apparition de bruit de fond. Ceci pourrait être dû au fait que la zone péri-tumorale n'est peut-être pas composée que de cellules DLBCL mais de tissu de soutient ou de cellules immunitaires.

Conclusion

En conclusion sur cette première partie, nous montrons que la protéine HSP110 est liée à la voie NFkB du lymphome ABC. Cette interconnexion s'effectue au niveau de la voie TLR/Myd88 par une interaction avec Myd88. Cette interaction induit une stabilisation de la protéine Myd88, ce qui semble augmenter le signal de la voie NFkB. Enfin, nous retrouvons une expression importante de HSP110

chez tous les patients ABC-DLBCL, expression corrélée à celle de Myd88. Puisque l'inhibition par shRNA de HSP110 semble toxique pour les cellules ABC et que HSP110 est exprimé dans les cellules tumorales des patients, nous avons dans l'idée que des inhibiteurs d'HSP110 pourraient s'avérer d'intérêt dans la lutte contre le lymphome ABC. En effet, nous pourrions combiner les thérapies R-CHOP +/- ibrutinib +/-inhibiteur d'HP110 pour obtenir une réponse au traitement maximale en clinique, ou pour ajouter une cible supplémentaire lors des fréquentes rechutes qu'effectuent les patients. A noter que ce genre de thérapie utilisant HSP110 pourra s'avérer utile dans les cas de mutation Myd88.

Jusqu'à la fin de ma thèse, aucun inhibiteur d'HSP110 n'avait encore été caractérisé. Les résultats que je présente dans cette première partie, bien que intéressant, comportaient donc une portée très limité en terme de thérapie. Nous avons eût la chance d'obtenir des candidats inhibiteurs durant ma fin de thèse. Le chapitre suivant s'attache donc à étudier ces inhibiteurs dans le lymphome ABC-DLBCL.

Partie 2 : inhibition de HSP110 par des molécules chimiques dans le lymphome ABC-DLBCL.

Notre équipe à obtenue par le biais d'une collaboration avec l'équipe de Anne-sophie Voisin-Chiret du CERMN (CENTRE D'ÉTUDES ET DE RECHERCHE SUR LE MÉDICAMENT DE NORMANDIE) des inhibiteurs potentiels d'HSP110. Pour des raisons de confidentialités (brevet en cours de dépôt), nous ne présenterons pas dans le détail les propriétés physicochimique de ces inhibiteurs ainsi que la structure de chacun d'eux. Ces inhibiteurs appartiennent à la classe des foldamère abiotiques. Ce sont de petits oligomères issus de synthèse chimique qui peuvent s'apparenter à de petits peptides. L'intérêt d'utiliser de telles molécules par rapport à des peptides réside dans le fait que l'on peut donner aux foldamères une structure tridimensionnelle fixe bien définie, et qu'ils présentent une résistance à la protéolyse (¹⁵¹). Cela permet de créer des petites molécules capables de se fixer dans un site actif de protéine, dans des sites d'interaction protéine – protéine (¹⁵¹). Une collaboration entre l'équipe de Anne-sophie Voisin-Chiret et la nôtre a permis de débuter un criblage de ce type de molécule pour inhiber l'activité d'HSP110. Deux articles sont en préparation sur l'utilisation de ces composés : l'un caractérisant les propriétés inhibitrices et la spécificité de certains foldamères pour HSP110 dans un modèle du cancer colorectal, l'autre utilisant ces inhibiteurs dans le modèle du DLBCL de type ABC. Le paragraphe ci-dessous présente quelques résultats de la caractérisation des inhibiteurs de HSP110 dans le cancer colorectal auquel j'ai participé. Les résultats concernant le lymphome seront développés plus amplement juste après.

Criblage des foldamères dans le cancer colorectal.

Le criblage des composés a été réalisé de la manière suivante : définir un foldamère ayant la capacité d'inhiber la capacité d'anti-agrégation d'HSP110 et inhibant l'interaction HSP110 / STAT3. En effet, les publications de l'équipe présentent ces deux activités comme deux fonctions principales d'HSP110 dans le cancer colorectal (¹³⁸ ¹³⁵). Les tests d'anti-agrégation et d'inhibition de l'interaction protéique *in vitro* entre HSP110 et STAT3 ont menés à l'identification de trois molécules : elles sont dénommées 5051, 5052 et 5033. Ces 3 molécules ont été retenues par notre équipe pour des tests biologiques in vitro sur cellules de cancer colorectal : ces résultats sont présentés dans la **figure 39**. Cette figure est issue de mes travaux et résume l'essentiel des informations pour comprendre l'emploi de ces molécules comme inhibiteur d'HSP110. Pour ce projet, j'ai généré des lignées de cancer colorectal transfectées stablement par infection lentivirale afin que celles-ci-expriment un shRNA contrôle ou dirigé contre hsph1 (**figure 39**).





Figure 39: Criblage des molécules dans l'inhibition de l'axe HSP110 STAT3. A La lignée SW480 exprimant stablement un shRNA contrôle (Ct) ou dirigé contre HSP110 (110) a été cultivée 48h avec 10µM de DMSO ou des composés indiqués. Les cellules ont ensuite été récupérées pour évaluer le niveau de phosphorylation de STAT3. B La lignée SW480 exprimant stablement un shRNA contrôle ou dirigé contre HSP110 a été cultivée 48h avec 10µM de DMSO ou des composés indiqués. Les lignées sont ensuite utilisées pour l'Immuno-précipitation de la protéine STAT3.

La figure 39 présente l'utilisation de la lignée SW480 comme l'une des lignées permettant la validation biologique in vitro des molécules identifiées. La figure 39A illustre bien la fonction d'HSP110 sur la voie STAT3 : à JO (cellules non traitées), les cellules disposant d'un shRNA contrôle ont une phosphorylation STAT3 assez forte. Les cellules présentent également une prolifération normale puisque la voie STAT3 est reliée à la prolifération de ce type de cancer. Dans les cellules dont l'expression d'HSP110 est diminuée par shRNA, la phosphorylation de STAT3 est complètement abolie. De même, la prolifération des cellules est fortement ralentie (non montré). Mon travail a ensuite été de regarder si les molécules identifiées comportent une activité sur la voie STAT3 in vitro. Quatre molécules ont étés utilisées : 3 comportant une activité sur l'activité anti agrégation de HSP110 (5051, 5052, 5033) et une ne comportant pas d'action (5061). Après 48h de traitement in vitro, on observe que les cellules portant un shRNA contrôle traité au DMSO conservent bien une activité STAT3. La molécule 5061 ne semble pas moduler la phosphorylation de STAT3. En revanche, les composés 5052, 5033 et 5051 diminuent cette phosphorylation de STAT3 à 48h comparé au traitement DMSO. Cette diminution n'est pas encore tout à fait identique au shRNA dirigé contre hsph1 mais est suffisamment importante pour entrainer une différence de prolifération (non montré). La figure 39B tente d'expliquer le mécanisme de cette perte d'interaction. On sait que HSP110 soutient la voie STAT3 en favorisant sa

phosphorylation (¹³⁵). Lorsque l'on immuno-précipite STAT3, on observe que HSP110 est l'un de ses partenaire d'interaction (**figure 39B**, ligne 3 du western blot). La molécule 5061 ne semble pas faire varier cette interaction (ligne 7), de même que la protéine 5051, ce qui est assez surprenant étant donné que la phosphorylation de STAT3 peut-être impactée par cette molécule. Nous n'utiliserons donc plus cette molécule dans la suite de l'exposé. Enfin, les molécules 5052 et 5033 permettent de diminuer l'interaction HSP110-STAT3 (ligne 4 et 5). Les molécules seront également utilisées pour des tests de croissance tumorale avec des résultats allant dans le sens d'une diminution de la croissance tumorale avec le composé 5033 sur des souris xénogreffées avec des cellules HCT116 (non montré).

Criblage des foldamères inhibiteurs d'HSP110 dans le lymphome ABC-DLBCL.

Sur la base des données acquise pour l'utilisation des foldamères dans le cancer colorectal, nous avons entrepris de tester ces inhibiteurs dans le modèle du lymphome ABC-DLBCL. Il est à noter que l'utilisation de ses composés étant récente, toutes les figures présentées ne seront pas parfaite ou parfois issue d'une expérience pour une seule lignée. Certaines expériences nécessiteront d'être refaite. Notre première interrogation a été de voir si ces inhibiteurs étaient capables de diminuer la voie NFkB, de la même manière que l'inhibition de HSP110 que nous avions réalisé par siRNA et présenté dans le chapitre précédent. Nous avons donc exposé nos cellules en culture à nos composés, à des temps de 24h et 48h. Les temps de 24h nous permettent de voir si les composés comportent rapidement une action sur la voie activatrice NFkB et une incidence sur le niveau Myd88 tandis que le temps 48h nous permet de mesurer le clivage de la caspase 3 pour voir si nos composés induisent une mort cellulaire apoptose dépendante. Les résultats sont présentés dans la **figure 40**.





Figure 40 : Utilisation des molécules candidats inhibiteurs 5052 et 5033 en culture sur des lignées ABC-DLBCL. A Les lignées présentées ont été exposée 24h à une concentration de 20μM des composés indiqués. Les cellules ont été lysées et analysées par western blot pour évaluer la phosphorylation d'IKBα. **B** Les même lignées ont été incubées 48h avec 20μM des composés indiqués. Les lignées sont ensuite récupérées pour analyse par western blot de leur niveau Myd88, HSP110 et caspase 3 clivée (fragment Asp175, 17kD).

La figure 40A nous présent l'utilisation des composés ayant une activité dans le cancer colorectal (5052 et 5033) ainsi que le composé n'ayant pas démontré d'action (5061). L'analyse à 24h montre qu'un traitement DMSO n'induit pas de variation de la phosphorylation d'IKBα, ce qui écarte toute influence de ce solvant dans l'analyse des résultats. On constate que le composé 5061 ne comporte pas d'action sur la phosphorylation d'IKBa pour les lignées Oci-Ly3, TMD8 et U2932. Les HBL1 en revanche montrent une activation de la phosphorylation d'IKBα comparé au traitement DMSO 24h. Ce résultat un peu étonnant demande à être confirmé ou infirmé à travers une nouvelle expérience. En ce qui concerne les composés 5052 et 5033, on constate que les lignée Oci-Ly3 et TMD8 ont un signal P-IKBα presque intégralement aboli en comparaison au traitement DMSO et 5061. Pour la lignée HBL1, la molécule 5052 ne semble pas faire varier ce signal P-IKB α par rapport au DMSO, et la molécule 5033 réduit en partie ce signal P-IKBα comparé au DMSO. En ce qui concerne la lignée U2932, le niveau de P-IKBα ne semble pas varier entre la molécule 5033 et la condition DMSO 24h. La molécule 5061 induit un signal P-IKBα un peu plus intense tandis que la molécule 5052 induit une très légère baisse de P-IKBα pour les U2932. Ainsi, de manière similaire à l'inhibition d'HSP110 par l'emploi de siRNA HSP110 dans la partie 1 des résultats, l'utilisation du composé 5033 semble inhiber la voie NFkB dans les lignées mutées pour Myd88, mais non les U2932 (Myd88 sauvage). La molécule 5052 fait en effet varier le niveau P-IKB dans toutes les lignées, y compris les U2932, ce qui n'est pas 100% similaire aux résultats obtenus avec le siRNA dirigé contre HSP110. Quand on regarde le niveau Myd88 à 24h, nous n'observons pas de différence entre les composés 5061 et le traitement DMSO, confirmant encore l'inactivité du DMSO et l'inactivité du foldamère 5061 dans ces cellules ABC-DLBCL. Les molécules 5052 et 5033 réduisent légèrement le niveau Myd88 dès 24h dans les lignées Oci-Ly3 et TMD8, tandis qu'aucune action n'est observée dans U2932. Pour les HBL1, une très faible réduction est observable à 24h. A noter que tous les traitements n'entrainent pas de variations du niveau total d'HSP110 à 24h.

Si on analyse ces résultats à 48h maintenant, la figure 40B nous présente les niveaux HSP110, Myd88 et le clivage de la caspase 3. Si on s'intéresse au niveau d'HSP110 dans les lignées traitées, on constate là encore que le composé 5061 ne comporte pas d'action sur l'expression de HSP110 par rapport au DMSO, et ce dans toutes les lignées. La molécule 5052 provoque une réponse variable entre les lignées : les Oci-Ly3 et U2932 ne montrent pas de variation d'HSP110 tandis que les TMD8 et HBL1 semblent montrer une diminution de cette protéine. Enfin, la molécule 5033 semble provoquer une diminution d'expression d'HSP110 dans toutes les lignées considérées. En ce qui concerne le niveau Myd88, là encore le niveau de cette protéine ne semble pas varier pour le composé 5061 par rapport au DMSO, sauf pour la lignée Oci-Ly3. Le composé 5052 ne semble pas faire varier le niveau Myd88 sauf pour la lignée TMD8. Le composé 5033 permet une diminution importante du niveau Myd88 dans les lignées L265P (HBL1, Oci-Ly3, TMD8) mais pas dans la lignée U2932. Enfin, nous présentons le clivage de la caspase 3 à 48h induit par ces molécules, le but étant de voir si nos composés sont toxiques après 48h d'incubation. Comparé au DMSO, seul le composé 5033 semble induire un clivage de la caspase 3 (TMD8, HBL1 et U2932), avec une induction de clivage différente en fonction des lignées. Les Oci-Ly3 ne présentent cependant pas se clivage. Le niveau de la caspase 3 totale varie un peu bizarrement dans les Oci-LY3 et nécessitera d'être refait.

Pour résumer cette **figure 40**, il semble que nos inhibiteurs 5052 et 5033 soient efficaces pour diminuer le niveau P-IKBα dans les lignées ABC-DLBCL, mais que toutes les lignées ne sont pas sensibles de la même manière. En effet, les HBL1 ne répondent qu'a la molécule 5033 tandis que les U2932 ne semblent pas répondre à cette dernière. De même, le niveau Myd88 semble être réduit fortement dans les lignées L265P, principalement avec la molécule 5033. Un clivage de caspase 3 semble indiquer un début d'apoptose induite pour les cellules dès 48h avec le composé 5033. Pour mettre en perspective ces résultats avec ceux présentés en partie 1, on pourrait penser que 5033 est la molécule candidat la plus intéressante. En effet, elle permet de faire varier le niveau P-IKBα dans toutes les lignées Myd88 mutées, en faisant baisser ce niveau Myd88, de manière très similaire à ce que l'on avait observé avec nos transfection transitoire utilisant les siRNA. Les U2932 semblent peu sensible à ce composé, tout comme l'inhibition de HSP110 qui avait peu d'incidence sur cette lignée. Ainsi, seule la molécule 5033 donne des résultats 100% similaire à ceux obtenus avec les siRNA dirigés contre HSP110. La molécule 5052 semble donner des réponses variables entre les lignées, et notamment entre les lignées Myd88 mutées.

Pour confirmer que ces composés comportaient une activité dépendante de l'inhibition d'HSP110, nous avons réalisé une étude de l'activité de la voie BCR par duolink[®] et des immuno précipitation de Myd88 pour regarder l'interaction Myd88 / HSP110. Les résultats sont présentés dans la **figure 41**.





Figure 41: Etude de la voie BCR et Myd88 après traitement par les molécules candidats pour l'inhibition d'HSP110. A Les lignées Oci-Ly3 et TMD8 ont été exposées 3h à une concentration de 20µM

80

des composés indiqués. Les cellules ont été fixées et perméabilisées pour réaliser des expériences duolink[®] entre les protéines IgM et P-IKBα. **B** Analyse du nombre de spot IgM x P-IKBα par cellules réalisée avec le logiciel ICY. **C** La lignée HBL1 a été exposée 24h à une concentration de 20µM des composés indiqués. Les cellules ont ensuite été récupérées pour réaliser une immuno-précipitation de Myd88 et regarder le niveau de HSP110 lié à cette protéine.

Les résultats présentés dans la **figure 41** décrivent l'activation du BCR après 3h de traitements avec nos composés. Nous avons choisi le temps 3h car c'est suffisamment rapide pour que les molécules entrent dans les cellules mais pas suffisant dans le temps pour diminuer le niveau Myd88 dans les lignées DLBCL. En effet, les voies TLR/Myd88 et BCR étant connectées, nous devons nous placer dans un temps où les molécules ne diminuent pas la voie BCR par le biais de celle TLR/Myd88. Si nos composés ont un effet dépendant d'HSP110, il ne devrait pas y avoir de variation de la voie BCR à 3h. Les résultats présentés dans la **figure 41 A et B** montrent que le duolink[®] IgM x P-lkBa présente une action parfois différente d'une molécule à l'autre sur nos lignées. La molécule 5061 semble augmenter l'activité de la voie BCR dans les TMD8 par rapport au DMSO, mais pas dans les Oci-Ly3. La molécule 5052 comporte une action sur les 2 lignées, augmentant la voie BCR pour les Oci-Ly3 et TMD8 par rapport au DMSO. Enfin, la molécule 5033 ne semble pas faire varier la voie BCR pour les lignées Oci-Ly3 et TMD8. La molécule 5033 ne semble donc pas avoir d'effet direct sur cet axe BCR, puisque elle n'entraine pas de variation du nombre de spot IgM x P-lkBa comparée au DMSO pour des cellules traitées seulement quelques heures. En conclusion sur cette figure : nos composés ne semblent pas avoir d'action directe dans la voie BCR.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'action de nos composés sur l'interaction HSP110/Myd88. Lorsque l'on immuno-précipite la protéine Myd88, on observe que HSP110 est retrouvé comme partenaire lorsque les cellules sont incubées en présence du DMSO ou du composé 5061 (**figure 41C**). Lorsque l'on utilise les composés 5052 et 5033, on observe une diminution de l'interaction HSP110 / Myd88. Bien évidemment, ces résultats demandent à être confirmés dans les autres lignées ABC-DLBCL, notamment les Oci-Ly3 et TMD8. En effet, ces dernières sont celles montrant une variation de Myd88 dès 24h et il sera intéressant de voir si ces constats sont confirmés dans ces lignées. Cependant, on pourra conclure de ces données que les composés testés et notamment le 5033 semblent bien inhiber la voie NFkB selon un mécanisme impliquant l'interaction HSP110 Myd88.

Puisque la voie NFkB semble diminuer avec l'emploi de nos molécules et ; sachant que l'on observe un clivage de la caspase 3 à 48h, nous avons ensuite suivi la viabilité de nos lignées ABC-DLBCL traités par nos composés sur plusieurs jours. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la **figure 42**.



Figure 42 : viabilité des lignées U2932, HBL1 et TMD8 pour les trois composés utilisés. Les cellules ont été exposés en culture aux DMSO (courbe bleu) ou à des concentrations de 5, 10 ou 20μM des composés 5061 (courbes noires), 5052(courbes vertes) et 5033 (courbes rouges) aux temps indiqués. Les molécules sont soit introduite en mono traitement (**A**, HBL1 uniquement) soit remises dans le milieu de culture tous les deux jours (**B**) et la viabilité a été suivie par cytométrie et marquage annexine V-7AAD. Les données présentées correspondent à des triplicatas.

Nous avons choisi d'exposer nos cellules tous les deux jours in vitro. En effet, un mono traitement ne comporte qu'une efficacité limité dans l'induction de la mort chez nos cellules DLBCL (**figure 42A**). Lorsque l'on expose les cellules tous les deux jours aux composés d'intérêt, on constate que la viabilité des lignées varie en fonction des lignées considérée et des composés (**figure 42B**). En ce qui concerne les U2932, la viabilité ne varie pas lorsqu'on expose les cellules au DMSO durant 6 jours, de même que pour le composé 5061 à 5 et 10µM. A 20µM, ce composé induit une légère mort dans les cellules U2932 (environ 20%). Les composés 5052 et 5033 réduisent la viabilité des cellules U2932 à 48h (50% de cellules viable pour toute les concentrations de 5033), mais cette baisse de viabilité est stabilisé dans le temps : il n'y a pas de mortalité supplémentaire a 4 et 6 jours de culture. En ce qui concerne les HBL1 et les TMD8, les résultats sont plus intéressants. Le composé 5061 ne modifie pas la viabilité des cellules sur 6 jours comparé au DMSO (à part les HBL1 20µM ou une légère variation des écarts type est observée). Lorsqu' on utilise la molécule 5052, on observe une réponse différente entre HBL1 et TMD8. Sur la ignée HBL1, le composé 5052 induit une mort dose dépendante, seulement 20 et 35% de

viabilité sont observée pour les concentrations 20 et 5 μ M respectivement 144h après traitement. En revanche, la lignée TMD8 ne présente pas cet effet dose de mort, et ne présente même qu'une mortalité de 30% environ induite à 6 jours à la plus forte des doses de 5052. Pour le composé 5033, les résultats sont plus constants entre ces deux lignées. On observe une mort progressive baissant de 20% tous les deux jours quel que soit la concentration utilisée pour les deux lignées. Au jour 6, entre 20% et 30% de cellules viables seulement sont retrouvées pour les deux lignées aux concentrations de 10 et 20 μ M.

Ces données sont intéressantes sur deux points : un traitement unique n'induit pas une mortalité importante des cellules HBL1 au bout de 6 jours. Ceci renvoi aux figures de viabilité de la partie 1 des résultats (**figure 23**). Dans cette figure, on montre que la viabilité des cellules HBL1 disposant d'un shRNA dirigé contre HSP110 n'est impactée qu'au bout d'un certain temps (jour 5 = 50% de viabilité par rapport au temps 0, avec un maximum au jour 7). Les résultats observés avec ces molécules confirment qu'il faut une inhibition dans le temps de HSP110 pour que des effets sur la viabilité soient observés. De la **figure 42B**, nous pourront penser que la viabilité doit être étendue à d'autres lignées L265P (Oci-Ly3 notamment) et Myd88 sauvage (Ri-1 par exemple). En effet, il existe une réponse différente au composé en fonction des lignées et nous avons besoin de multiplier nos expériences sur d'autres lignées afin d'obtenir des résultats très robustes. Dans l'ensemble, il semble que les molécules 5052 et 5033 provoquant une réponse in vitro sur les voies de signalisation NFkB et l'interaction HSP110 - Myd88 induisent des effets sur la viabilité des lignées ABC-DLBCL, avec un composé 5033 plus efficace sur les lignées HBL1 et TMD8 (L265P).

Concernant les U2932, nous pouvons proposer une explication pour expliquer la baisse de viabilité des cellules traitées aux 5033 malgré la présence d'un Myd88 sauvage. Les U2932, bien qu'ayant une viabilité diminuant à 48h puis se stabilisant, montrent surtout une diminution de prolifération (non montré). L'implication de HSP110 est en effet bien décrite par notre équipe dans la prolifération induite par la voie STAT3. Or, les lymphomes ABC-DLBCL présentent une activation P-STAT3 constitutive. Celle-ci est induite par la sécrétion de cytokines autocrines IL6 et II10 qui sont elle-même induite par l'activation de la voie NFkB (^{29,50}). Nous avions également remarqué que la diminution de HSP110 dans les cellules DLBCL induit une diminution de la voie P-STAT3 (**figure 43**).



Figure 43 : Voie P-STAT3 dans les lymphomes ABC-DLBCL modifiés par siRNA. Les lignées indiquées ont étés modifiées par électroporation pour exprimer un siRNA contrôle ou dirigé contre hsph1. 48h après transfection, les cellules sont lysées pour observer le niveau d'activation de la voie STAT3.

La **figure 43** montre que la voie STAT3 est activée dans la plupart des lignées de lymphome ABC-DLBCL, à part la lignée HBL1 qui ne montre qu'un signal assez faible. Lorsque l'on inhibe transitoirement la protéine HSP110 par siRNA, la voie P-STAT3 est diminuée. Ainsi, si nos composés n'ont pas d'effet sur la voie NFkB dans les U2932, l'inhibition d'HSP110 peut moduler la voie STAT3 et entrainer une prolifération moins importante des U2932, et une modulation de leur viabilité.

A ce stade, nous disposons des constats suivant sur ces molécules :

- 5052 et 5033 ; identifiés pour le criblage de l'inhibition HSP110 ; semblent diminuer avec la voie NFkB dans le lymphome ABC-DLBCL.
- La diminution NFkB induite par 5033 ressemble à celle induite par l'inhibition d'HSP110 :
 - Pas de modification de la voie CBM
 - Effet sur les lignées L265P seulement
 - o Diminution du niveau Myd88
 - Induction de mort apoptose dépendante
- Les composés 5052 et 5033 peuvent inhiber l'interaction HSP110 Myd88.

Initialement identifiés dans le modèle du cancer colorectal, ces molécules comportent une action *in vitro* dans le modèle du lymphome ABC. Pour la molécule 5033, cette action semblant ressembler à celle induite par un siRNA ou un shRNA dirigé contre HSP110, cela donne quelques indices supplémentaires sur la spécificité de ce composé. Cependant, nous ne pouvons pas exclure à ce stade que la spécificité de ces molécule soit absolue envers HSP110.

Les résultats étant intéressant *in vitro* et notre laboratoire disposant d'un modèle de souris immunodéficiente de type NSG, avons débuté une collaboration avec Oleg Demidov, détenteur de ce modèle NSG, pour pouvoir tester in vivo ces molécules. Ce modèle NSG avait déjà été utilisé lors du criblage des molécules pour l'inhibition HSP110-STAT3, via des xénogreffes de cellules HCT116 chez la souris. Une réduction de la croissance tumorale avait alors été observée avec le composé 5033, via des injections intra péritonéales tous les 2 jours à raison de 5mg/kg. La suite de notre projet sera de réaliser des xénogreffes des lignées ABC-DLBCL sur des groupes de souris NSG que nous traiterons avec le véhicule (DMSO) ou le composé 5033. Puisque cette collaboration a débuté seulement récemment, nous ne présenterons pas de données relative à ces expériences. De plus, à terme, nous voulons utiliser notre candidat inhibiteur en combinaison avec des molécules déjà employées en cliniques tel l'ibrutinib par exemple.

Discussion

Le travail présenté dans ce manuscrit permet de comprendre comment l'expression d'HSP110 lors de la mutation Myd88 peut contribuer à améliorer la prise en charge clinique des patients diagnostiqués avec cette forme commune et agressive de lymphome, l'ABC-DLBCL. Nos résultats présentent HSP110 comme une cible thérapeutique additionnelle dans le lymphome ABC. En effet, HSP110 se lie à Myd88, que ce soit dans sa forme mutée ou sauvage. Dans le lymphome ABC-DLBCL, la mutation Myd88 mène à l'activation de la voie NFkB, ou à son amplification si d'autres mutations activatrices de la voie NFkB sont présentes au sein des cellules tumorales. HSP110 stabilise Myd88 L265P, menant à l'amplification de la voie NFkB. Nous observons une expression importante d'HSP110 dans les échantillons de patients, ainsi qu'une corrélation d'expression entre HSP110 et Myd88. La déplétion d'HSP110 dans ces cellules de lymphomes semble induire une mort par apoptose. Ainsi, cibler cette HSP pourrait s'avérer être une stratégie pertinente afin de bloquer un mécanisme de survie essentiel des tumeurs ABC-DLBCL.

Cependant, un ensemble de points restent à améliorer dans ce travail, que ce soit sur la compréhension du rôle d'HSP110 ou sur les problématiques qui découlent de l'inhibition pharmacologique d'HSP110 chez un patient donné.

1 – HSP110 et lymphome

Dans notre étude, nous présentons HSP110 comme impliqué dans la voie NFkB. Pour renforcer ce constat, nous aurions pu choisir d'étudier la phosphorylation de p65 dans nos lignées de lymphome modifiées par siRNA, en plus de P- IkB α . En effet, la protéine IkB α est dégradée après phosphorylation, mais de manière très rapide après phosphorylation, son niveau total dans la cellule varie donc constamment dans une lignée ABC-DLBCL. Nous aurions pu nous intéresser à la phosphorylation de p65, l'une des sous-unités majeures du complexe de signalisation NFkB. La phosphorylation à la sérine 468 de p65 kB est induite par les kinases (IKK)- β and IKK ϵ (¹⁵² ¹⁵³). Cette phosphorylation permet la translocation au noyau, et phospho-p65 sera également dégradé par le protéasome, mais seulement après liaison aux promoteurs cibles de NFkB (¹⁵⁴).

Pour renforcer l'hypothèse de l'implication de HSP110 dans la voie TLR, nous aurions pu faire un « PCR array » après extraction des ARNm des cellules modifiées par siRNA ou shRNA. Ceci nous aurait permis d'étudier les gènes induits par la voie TLR (panels de gènes disponibles dans de nombreuses publications). De plus, nous aurions pu mesurer la sécrétion de cytokines telles que l'IL6 ou l'IL10, qui sont principalement induite par la voie NFkB médié par la voie TLR/Myd88 (^{29,50}).

Nos données présentent également une interconnexion, entre l'axe de signalisation TLR et CD79. Cette interconnexion révélée récemment provient encore des données de Louis Staudt : lors de sa présentation à l'AACR, ce dernier a présenté l'interconnexion des deux voies de signalisation BCR et TLR (**figure 44**).



Figure 44 : Extraits des diapositives de Louis M Staudt présentant l'interconnexion entre la voie BCR et TLR (AACR 2017). A Vue schématique de la connexion des voies TLR/ BCR dans le lymphome ABC-DLBCL. **B** Signal duolink[®] entre les deux adaptateurs CARD11 et BCL10 du complexe CBM en fonction de l'extinction de certaines protéines dans la lignée Oci-Ly10. **C** La protéine Myd88 est utilisée dans des tests dits de BiolD2 assay. Ces tests impliquent l'expression dans la cellule d'une protéine de fusion Myd88-enzyme de biotinylation. La protéine va ensuite interagir avec un ensemble de partenaires, et il sera possible de les identifier en faisant des immuno-précipitations utilisant le système de billes couplées à la streptavidine.

Les voies BCR et TLR se rejoignent donc au niveau des endolysosomes (**figure 44A**). Ces deux voies ne sont pas indépendantes l'une de l'autre comme le montre la **figure 44B**. Le duolink[®] montrant la proximité entre deux adaptateurs BCR (CARD11 x BcL10) peut être modulé en fonction de l'extinction de certaines protéines oncogéniques ou non (**figure 44B**). En effet, dans les Oci-Ly10 (CD79A mutantes, Myd88 L265P), un shRNA CD79A aboli en partie le duolink CARD11 x BcL10 (**figure 44B**). Ce résultat est en accord avec la mutation CD79A de cette lignée : sans CD79A, pas de voie CBM. Or, il devient intéressant de regarder l'effet de l'extinction de deux protéines de la voie TLR (Myd88 et TLR9) dans cette lignée. L'extinction de TLR9 mais surtout de Myd88 réduit l'intensité du signal de duolink[®] dans les Oci-Ly10, et de manière très similaire à l'extinction de CD79A. Ainsi, on constate que les deux voies fonctionnent de manière coordonnée. Seul défaut de la présentation de Staudt : celui-ci ne présente pas si la réciproque est vraie ! En effet, par pure curiosité scientifique, on est en droit de se demander

si l'extinction des protéines telles que CD79 ou du complexe CBM pourrait diminuer l'activité de la voie TLR/Myd88. Enfin, cette équipe montre que Myd88 interagit avec les composants BCR CARD11 et MALT1 A (**figure 44C**).

Nos données présentent aussi cette interconnexion entre ces deux axes de signalisation. Nous pourrions confirmer cette diminution de l'axe CBM par immuno précipitation et également regarder si l'interaction Myd88-CARD11 ou Myd88-MALT1A est maintenue lors d'un siRNA dirigé contre HSP110.

La conséquence de l'inhibition de HSP110 par shRNA sur les lignées de DLBCL est une diminution de viabilité des cellules. Nous pourrions compléter ces données sur plus de lignées, que ce soit pour l'étude de viabilité par cytométrie ou l'étude de marqueurs de survie par western blot (comme montré dans la **figure 23**). Si nous arrivons à mettre au point nos shRNA inductibles, nous pourrions également réaliser des expériences de xénogreffe de lignées de lymphome sauvage ou portant un shRNA dirigé contre HSP110 dans des souris immunodéficientes. Ainsi, nous pourrions comparer *in vivo* si l'inhibition d'HSP110 se traduit par une réduction de la croissance tumorale par rapport aux souris portant des lignées de lymphome sauvages, comme nos résultats *in vitro* le suggèrent. De même, pour montrer que l'inhibition d'HSP110 provoque la mort cellulaire selon un mécanisme dépendant de NfkB, nous pouvons proposer des expériences de « rescue ». Il existe en effet des plasmides codant pour une forme constitutivement activée des kinases IKK (nommé IKK-2 S177E S181E). Nous pourrions en effet infecter des cellules pour exprimer la forme active de IKK. Puis, par une seconde infection lentivirale, nous pourrions inhiber l'expression d'HSP110. Ce type d'expérience pourrait permettre de confirmer de manière plus absolue que le rôle d'HSP110 dans nos cellules est dépendant de NfkB.

Nous montrons que le rôle de HSP110 dans la voie NFkB est dépendant de MyD88. Est-ce le seul mode d'action de HSP110 dans cette voie ? En effet, une part de doute est encore possible. En effet, dans la **figure 31**, l'expression seule de HSP110 dans une lignée Myd88 sauvage (BJAB) suffit à légèrement induire la voie NFkB. Est-ce lié à la capacité de HSP110 d'agréger les Myd88 endogène pour favoriser l'activation de la voie NFkB ? HSP110 comporte-il un autre rôle dans la voie NFkB ? Car de même, dans la **figure 30**, l'utilisation de la molécule 5033 – en admettant qu'elle soit 100% spécifique de HSP110-montre que la voie NFkB est diminuée alors que le niveau Myd88 n'est que très légèrement impacté. Il nous faudrait alors confirmer que HSP110 n'interagit spécifiquement qu'avec Myd88, par un système FRET ou BiolD2 assay (voir **figure 44C**). Aussi, ces expériences de clonages pour le FRET entre HSP110 et Myd88 pourraient être réalisées avec seulement des domaines de HSP110. Ceci permettait de définir les domaines d'interaction impliqués entre HSP110 et Myd88. A l'heure où les molécules

inhibitrices sont de plus en plus synthétisées pour correspondre à une poche / un site protéique donné, identifier les domaines d'interaction exacts entre HSP110 et Myd88 pourrait faciliter la découverte d'inhibiteurs HSP110.

En parlant des molécules inhibitrices, les molécules que nous utilisons comportent une concentration d'action *in vitro* assez importante (de 10 à 20µM), surtout lorsque l'on compare à l'ibrutinib (de l'ordre de 0.1µM) ! Notre laboratoire ne dispose d'aucune expérience ou compétence pour améliorer cette molécule mais peut-être que de futures collaborations permettrons de résoudre ces soucis. Nous ne montrons pas encore de combinaison avec d'autres molécules dans ce travail. Il serait bon de tester au moins *in vitro* si notre inhibiteur comporte une synergie avec d'autres molécules utilisées dans la thérapie des lymphomes. Dans nos expériences, il nous faudrait de plus harmoniser certaines figures. Par exemple, nous proposons des voies de signalisation à 24 et 48h (**figure 40**) ou à 3h (**figure41**). Il serait bon de refaire les figures duolink[®] au moins à 24 et 48h pour observer une diminution progressive de l'activité de l'axe BCR après traitement aux inhibiteurs d'HSP110.

Enfin, HSP110 appartient à la famille des chaperons moléculaires : leur fonction n'est pas aussi définie qu'une kinase ou qu'une caspase, dont le mécanisme d'action est identique d'une cellule à une autre ou même spécifique à un substrat donné. Les HSP ont pour fonction « d'interagir », dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire. Ainsi, leurs interactions sont multiples, et c'est aussi le cas d'HSP110. Cette protéine interagit avec de nombreux éléments de la cellule. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'interaction avec l'un des inducteurs majeurs de la voie NFkB dans le lymphome B : Myd88. L'interaction HSP110 Myd88 muté amenant une activité NFkB soutenue renforce l'intérêt de cibler cette HSP dans le lymphome activé. Mais il ne faut pas oublier que HSP110 comportent également des interactions avec d'autres protéines oncogéniques du lymphome.

HSP110 et BcL6

En effet, HSP110 interagit avec BcL6, protéine dont le rôle oncogénique est associé au lymphome GC mais dont l'expression est aussi retrouvée dans le lymphome ABC. En effet, la figure 23 présente l'expression de BcL6 dans des lignées ABC, les même que celles que nous avons utilisés.



Figure 45 : Niveau BcL6 et inhibition de BcL6 dans le lymphome ABC-DLBCL. A Niveau BcL6 dans les lignées ABC-DLBCL. **B** Inhibition de BcL6 par shRNA dans trois lignées ABC-DLBCL. Issues des Supplemental figures and methods de Cardenas et al, "Rationally designed BCL6 inhibitors target activated B cell diffuse large B cell lymphoma » JCI 2016¹⁵⁵.

On observe que BcL6 est exprimé dans certaines lignées, avec des niveaux différents. Les Oci-Ly3, HBL1, U2932 comportent une expression importante, les Oci-Ly10 un niveau intermédiaire tandis que les TMD8 et SUD-HL2 ont une expression faible (**figure 45 A**). HSP110 est connu pour stabiliser cette protéine et on ne peut écarter que l'inhibition de HSP110 ne joue pas aussi sur le niveau BcL6 dans le lymphome ABC. Cependant, même si c'était le cas, il est probable qu'il y ait peu de conséquence dans notre étude. En effet, la viabilité des cellules dont l'expression pour BcL6 est diminuée par shRNA n'est impactée qu'au bout d'une dizaine de jours (Oci-Ly10 ou HBL1) ou ne diminue la viabilité qu'au bout de 3 jours et se stabilise autour de 50% de cellules viables pour les TMD8 (**figure 45 B**). Cette donnée renforce aussi l'idée que les cellules ABC-DLBCL ne sont pas dépendantes de l'oncogène BcL6. Ainsi, les effets que nous observons sur nos cellules ne semblent pas liés à la relation BcL6 / HSP110. Mais, sur le long terme, l'inhibition de HSP110 en clinique peut, en plus des effets sur NFkB, diminuer les effets prolifératifs et pro-survie induit par l'expression de BcL6.

• HSP110 et STAT3

La déplétion d'HSP110 comporte également un effet sur la prolifération des cellules. Ce constat a initialement été établi par notre équipe dans le cancer colorectal, et est lié à la relation HSP110/STAT3 (¹³⁵), où HSP110 favorise la phosphorylation de STAT3 et permet d'augmenter la prolifération des cellules de cancer colorectal. Dans le ABC-DLBCL, la voie STAT3 est également activée puisque la voie BCR induit l'expression de cytokines telles l'IL6 et L'IL10, qui induisent à leur tour l'activité de JAK2 qui phosphoryle STAT3 (²⁹). La même constatation peut être faite quant à l'effet de l'inhibition de HSP110 : la voie STAT3 est affectée. En effet, comme présenté en figure 43 la phosphorylation de STAT3 diminue lors de l'utilisation d'un siRNA dirigé contre HSP110. Deux explications peuvent être liées à ce phénomène : d'une part, la stabilisation de STAT3 par HSP110, et d'autre part, la voie P-STAT3 est induite par la voie NfkB dans le lymphome ABC-DLBCL (²⁹). Donc la diminution de l'activité de la voie Myd88 / TLR (lié à la relation HSP110 - Myd88), diminue aussi l'activité de la voie BCR et donc provoque une source supplémentaire de diminution de l'activité de STAT3. De même, HSP110 est capable d'interagir avec c-Myc (¹⁴²). Ce facteur de transcription comporte de multiples rôles dans une cellule normale et pathologique mais principalement des rôles prolifératifs. Ainsi, les interactions HSP110-STAT3 et HSP110-c-Myc pourraient être à l'origine de la diminution de prolifération des lignes ABC-DLBCL. Ainsi, en plus des effets sur NFkB, les cellules inhibées pour HSP110 peuvent montrer une diminution de prolifération liée aux autres fonctions d'HSP110. Ceci est intéressant dans ce genre de pathologies où les cellules ont un fort taux de prolifération : on peut imaginer que l'emploi d'un inhibiteur HSP110 pourrait sensibiliser les cellules aux chimiothérapies R-CHOP ou à d'autres chimiothérapies en ralentissant leur prolifération.

L'activité de la voie STAT3 semble aussi modulée dans le lymphome ABC-DLBCL lors de l'inhibition de HSP110. Ce n'est pas non plus une donnée anodine pour la protéine Myd88. En effet, une équipe a proposé récemment un mécanisme interconnectant STAT3 et Mdy88. Ce constat est fait sur les lignées ABC-DLBCL : certaine lignées sont résistantes à l'ibrutinib, c'est le cas des lignées portant un allèle Myd88 L265P. Un siRNA dirigé contre STAT3 tend à sensibiliser les cellules ABC-DLBCL Myd88 L265P à l'ibrutinib, mais non les lignées Myd88 sauvage (⁸⁴). L'équipe montre que ce mécanisme est dépendant des histones désacétylases, et que l'utilisation d'inhibiteurs des histones désacétylases (panobinostat) montre une synergie d'action avec l'ibrutinib pour tuer *in vitro* les cellules ABC-DLBCL. Si le mécanisme employé n'est pas clairement défini, il tend à montrer que la voie STAT3 pourrait effectuer une boucle d'amplification de la voie Myd88. Ainsi, inhiber HSP110 dans le lymphome ABC-DLBCL tend à réduire l'expression de Myd88 de manière directe selon nos données mais également de manière indirecte selon cet article.

Dernier point sur cette voie STAT3 : celle-ci permet de réguler un certain nombre de gènes dans la cellule (NF-ĸB, PI3K/AKT/mTORC1, et STAT3 lui-même) (¹⁵⁶). Parmi ces gènes, STAT3 réprime l'expression de IRF7 et IRF9. Comme expliqué dans le paragraphe sur le lenalidomide de ce manuscrit, IRF7 contrôle la production de l'interféron de type I, interféron toxique pour les cellules ABC-DLBCL. Diminuer la voie STAT3, c'est donc aussi permettre d'actionner un mécanisme supplémentaire de mort des cellules ABC-DLBCL. Ainsi, il semblerait que la voie STAT3 soit critique dans le lymphome ABC-DLBCL. Cbiler HSP110 permettrait également de moduler cette voie et ainsi de favoriser au maximum la perte de viabilité des cellules ABC-DLBCL.

2 – HSP110 et différenciation normale

Nous disposons d'un modèle de souris KO pour HSP110 au laboratoire, modèle parfaitement viable et sans phénotype hormis une reproduction plus lente que des souris sauvages. Nous avions utilisé ce modèle pour évaluer le rôle d'HSP110 dans l'activation TLR. Après activation des lymphocytes B *in vitro*, nous avions regardé l'activation de la voie NFkB et aussi l'expression de HSP110. Nous avions eût alors la mauvaise surprise de révéler une bande à 110kDa sur ces western blot avec l'anticorps Santa Cruz poly clonal que nous utilisons en routine. Cet anticorps reconnait également les isoformes de HSP110, APG-1 et APG-2.Lorsque nous avons utilisé un anticorps ne reconnaissant que la forme C-terminale de HSP110, lieu de modification génétique dans nos souris, nous n'observons plus cette bande à 110kDa dans nos western blot. Ceci laisse présager que nos souris HSP110 présentent des compensations en exprimant d'autres isoformes d'HSP110. Ainsi, nous n'avons pas pu exploiter ce modèle pour étudier HSP110 dans la différenciation normale.

Nos données montrent que HSP110 n'est pas exprimé dans les lymphocytes naïfs mais est exprimé lors de l'activation lymphocytaire B, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* sur des coupes d'amygdales non tumorales (**figure 37**). La littérature montre que HSP110 interagit avec BcL6

92

et c-myc : on pourrait alors imaginer qu'un KO de HSP110 (et ses isoformes) chez la souris pourrait diminuer la différenciation normale des lymphocytes B, mener à une réaction des centres germinatifs avortée, diminuer la production de lymphocytes sécréteurs d'anticorps ou encore abolir la réponse T-dépendante.

Enfin, nous ne disposons finalement que de peu d'informations quant à la relation d'HSP110 avec Myd88 sauvage. Notre étude tend à montrer que HSP110 peut améliorer la stabilité de Myd88 sauvage (**figure 34 et 35**), mais l'inhibition de HSP110 n'empêche pas l'expression de Myd88 sauvage (**figure 36**, voir U2932). On peut alors se demander si ; en dehors de tout contexte de lymphome et de mutation Myd88 ; l'activation TLR normale est dépendante/ modulée par HSP110 ? Il pourrait alors être intéressant d'étudier la fonction d'HSP110 dans les réponses TLR normales des cellules immunitaires. Si HSP110 peut participer à une signalisation TLR normale, il serait alors intéressant de regarder son expression et rôle dans des pahtologies auto-immunes TLR et MyD88- dépendantes telles que le lupus systémique érythémateux.

3 – HSP110 et inhibition pharmacologique : quel avenir ?

L'inhibition de HSP110 semble porter un intérêt pour les pathologies dépendantes d'une mutation Myd88. Nous pourrions alors exporter cette stratégie à d'autres maladies Myd88 L265P dépendantes, telles la macroglobulinémie de Waldenström (90% des patients expriment la mutation L265P, (¹⁵⁷), les lymphomes du MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) tels les lymphomes spléniques de la zone marginale (SMZL, 15% de mutations ¹⁵⁸), ou les leucémies lymphoïdes chroniques (CLL, 3% des patients ¹⁵⁹). Comme dans le lymphome ABC, les mutations L265P favorisent la survie et la prolifération des cellules tumorales. Ainsi, l'inhibition de Myd88 L265P par l'inhibition d'HSP110 dans ces pathologies pourrait être une stratégie thérapeutique pertinente. Cependant, une grande prudence doit être apportée dans l'utilisation d'inhibiteurs HSP. En effet, comme présenté en introduction, l'inhibition pharmacologique d'une HSP, HSP90, a déjà été envisagée dans le lymphome B, avec des résultats peu concluants en monothérapie du fait de la faible tolérance des patients pour l'inhibiteur. HSP110 est exprimé de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus de l'organisme (tissu cérébral, colon, rein, foie, testicule et ganglions réactifs). HSP110 favorise également la réponse aux stress cellulaires, notamment dans les maladies dégénératives liées

à l'accumulation de protéines agrégées (¹⁶⁰). Il faudra donc évaluer la toxicité des futurs inhibiteurs, ou augmenter leur spécificité envers la tumeur en utilisant un système d'anticorps anti-CD20 conjugués aux inhibiteurs HSP110. Que ce soit via ce système de conjugaison ou en molécule seule, l'emploi d'inhibiteurs HSP110 pourraient permettre de cibler préférentiellement les lymphocytes B tumoraux (et en différentiation) sans toucher au répertoire B normal naïf, ce qui présenterai déjà une avancée par rapport à l'immuno-chimiothérapie RCHOP qui cible l'ensemble des lymphocytes B du patient.

Conclusion générale

En conclusion sur ces paragraphes : notre travail ne démontre pas la spécificité d'interaction d'HSP110 dans un mécanisme précis d'une pathologie donné, mais il tend à renforcer l'intérêt clinique de cette HSP dans le lymphome ABC-DLBCL, notamment en proposant un mécanisme d'action novateur: **HSP110 favorise directement l'activation NFkB via son rôle chaperon de Myd88**. Via ses autres interactions *in cellulo*, HSP110 diminue également la signalisation prosurvie conséquente d'NFkB, notamment via son interaction avec la voie STAT3. Ainsi, combiner des inhibiteurs d'HSP110 aux thérapies actuelles du lymphome B (RCHOP +/-lénalidomide/ ibrutinib) pourrait s'avérer une stratégie pertinente dans la lutte contre le lymphome B de type activé.

Bibliographie

- 1. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, et al. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes: 2016 US Lymphoid Malignancy Statistics by World Health Organization Subtypes. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2016;66(6):443–459.
- 2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019–5032.
- 3. Rimsza L, Pittaluga S, Dirnhofer S, et al. The clinicopathologic spectrum of mature aggressive B cell lymphomas. *Virchows Archiv*. 2017;
- 4. Farrell K, Jarrett RF. The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma: Molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Histopathology*. 2011;58(1):15–25.
- 5. Ansell SM. Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2015;90(11):1574–1583.
- 6. Pasqualucci L, Zhang B. Genetic drivers of NF-κB deregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Seminars in Cancer Biology*. 2016;39:26–31.
- 7. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al. Molecular Diagnosis of Primary Mediastinal B Cell Lymphoma Identifies a Clinically Favorable Subgroup of Diffuse Large B Cell Lymphoma Related to Hodgkin Lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(6):851–862.
- 8. Steidl C, Gascoyne RD. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2011;118(10):2659–2669.
- 9. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2012;120(19):3986–3996.
- 10. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The Genetic Landscape of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Seminars in Hematology*. 2015;52(2):67–76.
- 11. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503–511.
- 12. Lenz G, Wright GW, Emre NCT, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(36):13520–13525.
- 13. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and Function of NF-κB Transcription Factors in the Immune System. *Annual Review of Immunology*. 2009;27(1):693–733.
- 14. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-κB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717–721.
- 15. Gerondakis S, Siebenlist U. Roles of the NF- B Pathway in Lymphocyte Development and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(5):a000182–a000182.
- 16. Kaileh M, Sen R. NF-κB function in B lymphocytes: NF-κB function in B lymphocytes. *Immunological Reviews*. 2012;246(1):254–271.
- 17. Basso K. Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood*. 2004;104(13):4088–4096.
- Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996;381(6585):751– 758.
- 19. Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity*. 2007;27(2):190–202.
- 20. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. Annu. Rev. Immunol. 2012;30:429-457.
- 21. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, et al. Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter. *Cell*. 2010;143(4):592–605.

- 22. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(3):137–148.
- 23. De Silva NS, Anderson MM, Carette A, et al. Transcription factors of the alternative NF-κB pathway are required for germinal center B-cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(32):9063–9068.
- 24. Heise N, De Silva NS, Silva K, et al. Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF-κB transcription factor subunits. *The Journal of Experimental Medicine*. 2014;211(10):2103–2118.
- 25. Shaffer AL, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of Human B Cell Lymphomas. *Annual Review of Immunology*. 2012;30(1):565–610.
- 26. Dominguez-Sola D, Victora GD, Ying CY, et al. The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nature Immunology*. 2012;13(11):1083–1091.
- 27. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive Nuclear Factor κB Activity Is Required for Survival of Activated B Cell–like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001;194(12):1861–1874.
- 28. Lam LT, Davis RE, Pierce J, et al. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(1):28–40.
- 29. Lam LT, Wright G, Davis RE, et al. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2008;111(7):3701–3713.
- 30. Huntington ND, Xu Y, Puthalakath H, et al. CD45 links the B cell receptor with cell survival and is required for the persistence of germinal centers. *Nature Immunology*. 2006;7(2):190–198.
- 31. Rawlings DJ, Sommer K, Moreno-García ME. The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(11):799–812.
- 32. Chen ZJ. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK: Ubiquitin-mediated activation of IKK. *Immunological Reviews*. 2012;246(1):95–106.
- 33. Iwai K. Diverse ubiquitin signaling in NF-κB activation. *Trends in Cell Biology*. 2012;22(7):355–364.
- 34. Eitelhuber AC, Warth S, Schimmack G, et al. Dephosphorylation of Carma1 by PP2A negatively regulates T-cell activation: Dephosphorylation of Carma1 by PP2A. *The EMBO Journal*. 2011;30(3):594–605.
- 35. Ferch U, Kloo B, Gewies A, et al. Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell–like diffuse large B cell lymphoma cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(11):2313–2320.
- 36. Hong JJ, Yankee TM, Harrison ML, Geahlen RL. Regulation of Signaling in B Cells through the Phosphorylation of Syk on Linker Region Tyrosines: A MECHANISM FOR NEGATIVE SIGNALING BY THE Lyn TYROSINE KINASE. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(35):31703–31714.
- 37. Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity*. 1997;7(1):69–81.
- 38. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88–92.
- 39. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 Mutations in Human Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676–1679.
- 40. Kato M, Sanada M, Kato I, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 2009;459(7247):712–716.
- 41. Emmerich CH, Schmukle AC, Walczak H. The Emerging Role of Linear Ubiquitination in Cell Signaling. *Science Signaling*. 2011;4(204):re5-re5.
- 42. Dubois SM, Alexia C, Wu Y, et al. A catalytic-independent role for the LUBAC in NF- B activation upon antigen receptor engagement and in lymphoma cells. *Blood*. 2014;123(14):2199–2203.

- 43. Yang Y, Schmitz R, Mitala J, et al. Essential Role of the Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex in Lymphoma Revealed by Rare Germline Polymorphisms. *Cancer Discovery*. 2014;4(4):480–493.
- 44. Young RM, Shaffer AL, Phelan JD, Staudt LM. B-Cell Receptor Signaling in Diffuse Large B-Cell lymphoma. *Seminars in Hematology*. 2015;52(2):77–85.
- 45. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature*. 2012;490(7418):116–120.
- 46. Paul J, Soujon M, Wengner AM, et al. Simultaneous Inhibition of PI3Kδ and PI3Kα Induces ABC-DLBCL Regression by Blocking BCR-Dependent and -Independent Activation of NF-κB and AKT. *Cancer Cell*. 2017;31(1):64–78.
- 47. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-κB by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine*. 2007;13(11):460–469.
- 48. Doyle SE, Vaidya SA, O'Connell R, et al. IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program. *Immunity*. 2002;17(3):251–263.
- 49. Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME, et al. The Interferon Regulatory Factor, IRF5, Is a Central Mediator of Toll-like Receptor 7 Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(17):17005–17012.
- 50. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115–119.
- 51. Burns K, Martinon F, Esslinger C, et al. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* 1998;273(20):12203–12209.
- 52. Burns K, Janssens S, Brissoni B, et al. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* 2003;197(2):263–268.
- 53. Lin S-C, Lo Y-C, Wu H. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 2010;465(7300):885–890.
- 54. Motshwene PG, Moncrieffe MC, Grossmann JG, et al. An Oligomeric Signaling Platform Formed by the Toll-like Receptor Signal Transducers MyD88 and IRAK-4. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(37):25404–25411.
- 55. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*. 1996;383(6599):443–446.
- 56. Windheim M, Stafford M, Peggie M, Cohen P. Interleukin-1 (IL-1) Induces the Lys63-Linked Polyubiquitination of IL-1 Receptor-Associated Kinase 1 To Facilitate NEMO Binding and the Activation of I B Kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 2008;28(5):1783–1791.
- 57. Cui W, Xiao N, Xiao H, et al. -TrCP-Mediated IRAK1 Degradation Releases TAK1-TRAF6 from the Membrane to the Cytosol for TAK1-Dependent NF- B Activation. *Molecular and Cellular Biology*. 2012;32(19):3990–4000.
- 58. Fujimoto M, Naka T. SOCS1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and TLR Responses, in Human Liver Diseases. *Gastroenterology Research and Practice*. 2010;2010:1–7.
- 59. Muroi M, Tanamoto K. IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*. 2012;1823(2):255–263.
- 60. Han C, Jin J, Xu S, et al. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nature Immunology*. 2010;11(8):734–742.
- 61. Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of Interleukin-1- and Lipopolysaccharide-Induced NF-κB Activation by Alternative Splicing of MyD88. *Current Biology*. 2002;12(6):467–471.
- 62. Vickers TA, Zhang H, Graham MJ, et al. Modification of MyD88 mRNA splicing and inhibition of IL-1beta signaling in cell culture and in mice with a 2'-O-methoxyethyl-modified oligonucleotide. *J. Immunol.* 2006;176(6):3652–3661.
- 63. Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends in Immunology*. 2012;33(9):449–458.

- 64. Avbelj M, Wolz O-O, Fekonja O, et al. Activation of lymphoma-associated MyD88 mutations via allostery-induced TIR-domain oligomerization. *Blood*. 2014;124(26):3896–3904.
- 65. Yang Y, Shaffer AL, Emre NCT, et al. Exploiting Synthetic Lethality for the Therapy of ABC Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 2012;21(6):723–737.
- 66. Bohers E, Mareschal S, Bouzelfen A, et al. Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma: Dlbcl Activating Mutations. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2014;53(2):144–153.
- 67. Cen H, Tan X, Guo B. A20 Mutation Is Not a Prognostic Marker for Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *PLOS ONE*. 2015;10(12):e0145037.
- Dong G, Chanudet E, Zeng N, et al. A20, ABIN-1/2, and CARD11 Mutations and Their Prognostic Value in Gastrointestinal Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(6):1440–1451.
- 69. Choi J-W, Kim Y, Lee J-H, Kim Y-S. MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Human Pathology*. 2013;44(7):1375–1381.
- Dubois S, Viailly P-J, Bohers E, et al. Biological and Clinical Relevance of Associated Genomic Alterations in MYD88 L265P and non-L265P–Mutated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Analysis of 361 Cases. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(9):2232–2244.
- Wang JQ, Jeelall YS, Beutler B, Horikawa K, Goodnow CC. Consequences of the recurrent *MYD88* ^{L265P} somatic mutation for B cell tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*. 2014;211(3):413–426.
- 72. Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H, et al. BLIMP1 Is a Tumor Suppressor Gene Frequently Disrupted in Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 2010;18(6):568–579.
- 73. Testoni M, Zucca E, Young KH, Bertoni F. Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Annals of Oncology*. 2015;26(6):1069–1080.
- 74. Jardin F, Jais J-P, Molina T-J, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood*. 2010;116(7):1092–1104.
- 75. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*. 2011;471(7337):189–195.
- 76. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, et al. Combined Genetic Inactivation of β2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 2011;20(6):728–740.
- 77. Grønbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood*. 1998;92(9):3018–3024.
- 78. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature Genetics*. 2011;43(9):830–837.
- 79. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(10):3879–3884.
- 80. Nowakowski GS, Czuczman MS. ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2015;35:e449–e457.
- 81. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013;121(20):4021–4031.
- 82. Chao M. Treatment challenges in the management of relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma – novel and emerging therapies. *Cancer Management and Research*. 2013;251.
- 83. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature Medicine*. 2015;21(8):922–926.
- 84. Mondello P, Brea EJ, De Stanchina E, et al. Panobinostat acts synergistically with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma cells with MyD88 L265 mutations. *JCI Insight*. 2017;2(6):.
- Kuo H-P, Ezell SA, Schweighofer KJ, et al. Combination of Ibrutinib and ABT-199 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Follicular Lymphoma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2017;16(7):1246– 1256.
- 86. Jerkeman M, Hallek M, Dreyling M, et al. Targeting of B-cell receptor signalling in B-cell malignancies. *Journal of Internal Medicine*. 2017;282(5):415–428.
- Wilson W, Gerecitano J, Goy A, et al. The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor, Ibrutinib (PCI-32765), Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Interim Results of a Multicenter, Open-Label, Phase 2 Study. 2015;120 issue 21:686.
- 88. Lionakis MS, Dunleavy K, Roschewski M, et al. Inhibition of B Cell Receptor Signaling by Ibrutinib in Primary CNS Lymphoma. *Cancer Cell*. 2017;31(6):833–843.e5.
- 89. Horwood NJ, Page TH, McDaid JP, et al. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4induced TNF, but not IL-6, production. J. Immunol. 2006;176(6):3635–3641.
- 90. Younes A, Thieblemont C, Morschhauser F, et al. Combination of ibrutinib with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) for treatment-naive patients with CD20-positive B-cell non-Hodgkin lymphoma: a non-randomised, phase 1b study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(9):1019–1026.
- 91. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2009;113(24):6069–6076.
- 92. Chen L, Monti S, Juszczynski P, et al. SYK Inhibition Modulates Distinct PI3K/AKT- Dependent Survival Pathways and Cholesterol Biosynthesis in Diffuse Large B Cell Lymphomas. *Cancer Cell*. 2013;23(6):826–838.
- 93. Chapuy B, Cheng H, Watahiki A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease. *Blood*. 2016;127(18):2203–2213.
- 94. Young RM, Hardy IR, Clarke RL, et al. Mouse models of non-Hodgkin lymphoma reveal Syk as an important therapeutic target. *Blood*. 2009;113(11):2508–2516.
- 95. Naylor TL, Tang H, Ratsch BA, et al. Protein Kinase C Inhibitor Sotrastaurin Selectively Inhibits the Growth of CD79 Mutant Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Cancer Research*. 2011;71(7):2643–2653.
- 96. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(13):2578–2585.
- 97. Chiappella A, Vitolo U. Lenalidomide in Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Advances in Hematology*. 2012;2012:1–5.
- 98. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Zinzani PL, et al. Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer*. 2011;117(22):5058–5066.
- Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, et al. Lenalidomide Combined With R-CHOP Overcomes Negative Prognostic Impact of Non–Germinal Center B-Cell Phenotype in Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(3):251– 257.
- 100. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. Pathology. 2017;
- 101. Goldstein RL, Yang SN, Taldone T, et al. Pharmacoproteomics identifies combinatorial therapy targets for diffuse large B cell lymphoma. *J. Clin. Invest.* 2015;125(12):4559–4571.
- 102. Brodsky JL, Hamamoto S, Feldheim D, Schekman R. Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic Hsc70. *J. Cell Biol.* 1993;120(1):95–102.

- 103. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14(10):630–642.
- 104. Santoro MG. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.* 2000;59(1):55–63.
- 105. Wu C. Heat Shock Transcription Factors: Structure and Regulation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1995;11(1):441–469.
- 106. Home T, Jensen RA, Rao R. Heat Shock Factor 1 in Protein Homeostasis and Oncogenic Signal Integration. *Cancer Research*. 2015;75(6):907–912.
- 107. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*. 1990;248(4957):850–854.
- 108. Lanneau D, Wettstein G, Bonniaud P, Garrido C. Heat Shock Proteins: Cell Protection through Protein Triage. *The Scientific World JOURNAL*. 2010;10:1543–1552.
- 109. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2013;14(10):703–718.
- 110. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.
- 111. Jego G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* 2013;332(2):275–285.
- 112. Gobbo J, Marcion G, Cordonnier M, et al. Restoring Anticancer Immune Response by Targeting Tumor-Derived Exosomes With a HSP70 Peptide Aptamer. *JNCI-J. Natl. Cancer Inst.* 2016;108(3):djv330.
- 113. Vandekerckhove J, Ribeil J-A, Zermati Y, et al. Hsp70, l'ange gardien de GATA-1 lors de la différenciation des globules rouges. *médecine/sciences*. 2008;24(1):37–40.
- 114. Boudesco C, Rattier T, Garrido C, Jego G. Do not stress, just differentiate: role of stress proteins in hematopoiesis. *Cell Death Dis.* 2015;6:UNSP e1628.
- 115. Jego G, Lanneau D, De Thonel A, et al. Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. *Leukemia*. 2014;28(8):1676–1686.
- 116. Ho N, Li A, Li S, Zhang H. Heat Shock Protein 90 and Role of Its Chemical Inhibitors in Treatment of Hematologic Malignancies. *Pharmaceuticals*. 2012;5(12):779–801.
- 117. Mjahed H, Girodon F, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Experimental Cell Research*. 2012;318(15):1946–1958.
- 118. Valbuena JR, Rassidakis GZ, Lin P, et al. Expression of heat-shock protein-90 in non-Hodgkin's lymphomas. *Modern Pathology*. 2005;18(10):1343–1349.
- 119. Cerchietti LC, Lopes EC, Yang SN, et al. A purine scaffold Hsp90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6–dependent B cell lymphomas. *Nature Medicine*. 2009;15(12):1369–1376.
- 120. Oki Y, Younes A, Knickerbocker J, et al. Experience with HSP90 inhibitor AUY922 in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Haematologica*. 2015;100(7):e272–e274.
- 121. Yasuda K, Nakai A, Hatayama T, Nagata K. Cloning and expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105. J. Biol. Chem. 1995;270(50):29718–29723.
- 122. Kaneko Y, Kimura T, Nishiyama H, Noda Y, Fujita J. Developmentally Regulated Expression of APG-1, a Member of Heat Shock Protein 110 Family in Murine Male Germ Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;233(1):113–116.
- 123. Kaneko Y, Kimura T, Kishishita M, Noda Y, Fujita J. Cloning of apg-2 encoding a novel member of heat shock protein 110 family. *Gene*. 1997;189(1):19–24.
- 124. Lin HY, Masso-Welch P, Di YP, et al. The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. *Mol. Biol. Cell*. 1993;4(11):1109– 1119.
- 125. Oh HJ, Easton D, Murawski M, Kaneko Y, Subjeck JR. The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J. Biol. Chem.* 1999;274(22):15712–15718.

- 126. Hatayama T, Yasuda K, Yasuda K. Association of HSP105 with HSC70 in High Molecular Mass Complexes in Mouse FM3A Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;248(2):395–401.
- 127. Oh HJ, Chen X, Subjeck JR. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J. Biol. Chem.* 1997;272(50):31636–31640.
- 128. Andreasson C, Fiaux J, Rampelt H, Druffel-Augustin S, Bukau B. Insights into the structural dynamics of the Hsp110-Hsp70 interaction reveal the mechanism for nucleotide exchange activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(43):16519–16524.
- 129. Mattoo RUH, Sharma SK, Priya S, Finka A, Goloubinoff P. Hsp110 Is a *Bona Fide* Chaperone Using ATP to Unfold Stable Misfolded Polypeptides and Reciprocally Collaborate with Hsp70 to Solubilize Protein Aggregates. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(29):21399–21411.
- 130. Rampelt H, Kirstein-Miles J, Nillegoda NB, et al. Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation: Disaggregation by animal Hsp110-Hsp70-Hsp40. *The EMBO Journal*. 2012;31(21):4221–4235.
- 131. Shorter J. The Mammalian Disaggregase Machinery: Hsp110 Synergizes with Hsp70 and Hsp40 to Catalyze Protein Disaggregation and Reactivation in a Cell-Free System. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e26319.
- 132. Kai M, Nakatsura T, Egami H, et al. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol. Rep.* 2003;10(6):1777–1782.
- 133. Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, et al. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol. Rep.* 2009;21(5):1235–1241.
- 134. Hwang TS, Han HS, Choi HK, et al. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003;18(6):690–700.
- 135. Berthenet K, Bokhari A'dem, Lagrange A, et al. HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation. *Oncogene*. 2016;
- 136. Berthenet K, Boudesco C, Collura A, et al. Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer. *OncoImmunology*. 2016;5(7):e1170264.
- 137. Das A, Sinha M, Datta S, et al. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *The American Journal of Pathology*. 2015;185(10):2596–2606.
- 138. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nature Medicine*. 2011;17(10):1283–1289.
- 139. Collura A, Lagrange A, Svrcek M, et al. Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability and Large Deletions in HSP110 T-17 Have Improved Response to 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy. *Gastroenterology*. 2014;146(2):401–+.
- 140. Di Nicola M, Zappasodi R, Carlo-Stella C, et al. Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. *Blood*. 2009;113(1):18–27.
- 141. Zappasodi R, Bongarzone I, Ghedini GC, et al. Serological identification of HSP105 as a novel non-Hodgkin lymphoma therapeutic target. *Blood*. 2011;118(16):4421–4430.
- 142. Zappasodi R, Ruggiero G, Guarnotta C, et al. HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2015;125(11):1768–1771.
- 143. Frecha C, Costa C, Levy C, et al. Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood*. 2009;114(15):3173–3180.
- 144. Frecha C, Levy C, Costa C, et al. Measles Virus Glycoprotein-Pseudotyped Lentiviral Vector-Mediated Gene Transfer into Quiescent Lymphocytes Requires Binding to both SLAM and CD46 Entry Receptors. *Journal of Virology*. 2011;85(12):5975–5985.
- 145. Zhang M, Xu-Monette ZY, Li L, et al. RelA NF-κB subunit activation as a therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma. *Aging*. 2016;8(12):3321–3340.

- 146. Gilmore TD. Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680–6684.
- 147. Zhang B, Calado DP, Wang Z, et al. An Oncogenic Role for Alternative NF-κB Signaling in DLBCL Revealed upon Deregulated BCL6 Expression. *Cell Reports*. 2015;11(5):715–726.
- 148. Kimura A, Ogata K, Altan B, et al. Nuclear heat shock protein 110 expression is associated with poor prognosis and hyperthermo-chemotherapy resistance in gastric cancer patients with peritoneal metastasis. *World Journal of Gastroenterology*. 2017;23(42):7541–7550.
- 149. Zhang J, Grubor V, Love CL, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(4):1398–1403.
- 150. Yang G, Buhrlage SJ, Tan L, et al. HCK is a survival determinant transactivated by mutated MYD88, and a direct target of ibrutinib. *Blood*. 2016;127(25):3237–3252.
- 151. Guichard G, Huc I. Synthetic foldamers. *Chemical Communications*. 2011;47(21):5933.
- 152. Schwabe RF, Sakurai H. IKKβ phosphorylates p65 at S468 in transactivaton domain 2. *The FASEB Journal*. 2005;19(12):1758–1760.
- 153. Mattioli I, Geng H, Sebald A, et al. Inducible Phosphorylation of NF-κB p65 at Serine 468 by T Cell Costimulation Is Mediated by IKKε. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(10):6175–6183.
- 154. Geng H, Wittwer T, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Schmitz ML. Phosphorylation of NF-κB p65 at Ser468 controls its COMMD1-dependent ubiquitination and target gene-specific proteasomal elimination. *EMBO reports*. 2009;10(4):381–386.
- 155. Cardenas MG, Yu W, Beguelin W, et al. Rationally designed BCL6 inhibitors target activated B cell diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(9):3351–3362.
- 156. Lu L, Zhu F, Zhang M, et al. Gene regulation and suppression of type I interferon signaling by STAT3 in diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(3):E498–E505.
- 157. Treon SP, Cao Y, Xu L, et al. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2014;123(18):2791–2796.
- 158. Martinez-Lopez A, Curiel-Olmo S, Mollejo M, et al. MYD88 (L265P) Somatic Mutation in Marginal Zone B-cell Lymphoma: *The American Journal of Surgical Pathology*. 2015;39(5):644– 651.
- 159. Qin S-C, Xia Y, Miao Y, et al. MYD88 mutations predict unfavorable prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia patients with mutated IGHV gene. *Blood Cancer Journal*. 2017;7(12):.
- 160. Nagy M, Fenton WA, Li D, Furtak K, Horwich AL. Extended survival of misfolded G85R SOD1linked ALS mice by transgenic expression of chaperone Hsp110. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(19):5424–5428.

Annexes

Article 1 : HSP110 sustains chronic NF-κB signaling in activated B cell diffuse large B cell lymphoma through MyD88 stabilization

HSP110 sustains chronic NF-κB signaling in activated B cell diffuse large B cell lymphoma through MyD88 stabilization

Running title: HSP110 sustains chronic NF-KB signaling

Christophe Boudesco,¹ Els Verhoeyen,²⁻³ Laurent Martin,⁴ Catherine Chassagne-Clement,⁵ Leila Salmi,¹ Céline Pangault,⁶ Thierry Fest,⁶ Fabrice Jardin,⁷ Olaf-Oliver Wolz,⁸ Alexander N. R. Weber,⁸ Carmen Garrido, ¹⁻⁹ and Gaetan Jego ¹

¹INSERM, LNC UMR866, Université Bourgogne Franche-Comté, Equipe Labellisée « Ligue Nationale Contre le Cancer » F-21000 Dijon, France

²CIRI, EVIR Team, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, Université de Lyon-1, ENS de Lyon, Lyon, France.

³Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, "Contrôle Métabolique des Morts Cellulaires," Nice, France.

⁴Service pathologie du Plateau de Biologie du CHU Dijon, 21000 Dijon, France

⁵Service Anatomie et Cytologie pathologiques du Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁶UMR U1236, INSERM, Université Rennes 1, Etablissement Français du Sang Bretagne, CHU de Rennes, laboratoire d'hématologie, Rennes, France

⁷INSERM, U918, Rouen.

⁸Department of Immunology, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany

⁹Centre Georges François Leclerc (CGFL), Dijon, France

Correspondence to: Gaetan Jego, INSERM, UMR 1231, Université Bourgogne Franche-Comté, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France. Tel : (33) 3 80 39 33 45, Fax (33) 3 80 39 34 34.E-mail: <u>gaetan.jego@u-bourgogne.fr</u>

Word count for text:

Word count for abstract: 210

Figure count: 5

Table count: 1

References: 48

Key Points

- 1) HSP110 sustains chronic NF-κB signaling in activated B cell diffuse large B cell lymphoma through MyD88 stability.
- 2) HSP110 is highly expressed in cells of patients with activated B cell diffuse large B cell lymphoma and correlates with MyD88 expression

Abstract

Activated B cell diffuse large B cell lymphoma (ABC-DLBCL) is an aggressive lymphoproliferative disorder involving chronic NF-κB activation. Several mutations in the BCR and the MyD88 signaling pathway components, such as MyD88 L265P, are implicated in this aberrant activation. Among heat-shock proteins, HSP110 has recently been identified as a prosurvival and/or proliferation factor in many cancers but its role in ABC-DLBCL survival mechanisms remained to be established. We observed that shRNA-mediated HSP110 silencing decreased the survival of several ABC-DLBCL cell lines, decreased IgM-MyD88 co-localization and subsequent NF-kB signaling. Conversely, over-expression of HSP110 in ABC-DLBCL or non-DLBCL cell lines increased NF-KB signaling, indicating a tight interplay between HSP110 and the NF-kB pathway. Using immunoprecipitation and proximity ligation assays, we identified an interaction between HSP110 and both wild type MyD88 and MyD88 L265P. HSP110 stabilized both MyD88 forms with a stronger effect on MyD88 L265P, therefore facilitating chronic NF-KB activation. Finally, HSP110 expression was higher in lymph-node biopsies of patients with ABC-DLBCL than in normal reactive lymph nodes and a strong correlation was found between the level of HSP110 and MyD88. In conclusion, we identified HSP110 as a regulator of NF-kB signaling through MyD88 stabilization in ABC-DLBCL. This finding reveals HSP110 as a new potential therapeutic target in ABC-DLBCL.

Introduction:

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of aggressive non-Hodgkin lymphoma (NHL) in adults. Although R-CHOP therapy has led to an improvement in survival, a significant percentage of patients are still refractory to the treatment or eventually relapse.¹ It is therefore important to find new molecular targets for the treatment of DLBCL patients. Advanced genome sequencing studies have unveiled the complexity of DLBCL and revealed a heterogeneous group of tumors characterized by specific genetic alterations and molecular signatures that could account for the heterogeneous response to treatment. One way to overcome the heterogeneity of this lymphoma is to identify and target mechanisms that drive or sustain oncogenic signaling/survival of lymphoma cells, regardless of their somatic mutations. Interestingly, a body of literature has highlighted the fact that tumor cells acquire a biological addiction to heat shock proteins (HSPs)/stress proteins during malignant transformation.^{2,3} HSPs are highly conserved molecular chaperone proteins whose expression is induced in response to multiple physiological and environmental stresses.⁴ In these contexts, they control a large array of cellular functions in order to rescue the cell from debilitating conditions. Cancer cells can be considered highly stressed cells due to their numerous mutations, translocation or polyploidy, and microenvironment. ⁵⁻⁶ Therefore, HSPs are often overexpressed in cancer cells, where they contribute to cancer resistance, notably to apoptosis and to the clearance of cancer cells by immune cells. ^{7,8} As a consequence, it has been proposed to target HSPs in various types of cancer. Several reports have shown that HSPs are also highly expressed in hematological malignancies, where they are involved in several key proliferative and survival functions.⁹ In particular, in lymphoma, HSP90 has been shown to have multiple roles in key DLBCL oncogenic pathways. Indeed, its capacity to enhance Bcell-like (BCL) 6 oncogenesis ³ and to interact and stabilize key B-cell receptor (BCR) protein complexes (CD79A/B-SYK-BTK-PLCy2,²) suggest that targeting HSP90 could represent an interesting additional option in the treatment of DLBCL. Unfortunately, a recent clinical trial using the HSP90 inhibitor AUY922 in DLBCL (NCT01485536) was halted early due to a limited response and adverse effects in 100% of patients (anemia, fatigue, abdominal pain, diarrhea), prompting the search for other potential targets.

Among HSPs, HSP110 is a high molecular weight chaperone with anti-aggregation properties and, through its interaction with HSP70, participates in the correct folding of newly synthesized or misfolded proteins. ¹⁰⁻¹¹ In cancer, we have recently demonstrated that HSP110 is a major factor of colon cancer growth through intra- and extra-cellular functions. ^{12,13} At the intra-cellular level, HSP110 binds directly to STAT3, facilitating its phosphorylation by JAK2 and contributing to STAT3-dependent tumor growth. At the extracellular level, we have demonstrated that colon cancer cells secrete HSP110 to promote macrophage polarization towards a pro-cancer phenotype (M2). ¹³ Furthermore, we have identified a truncated form of HSP110, called HSP110DE9, in colorectal tumors with microsatellite instability that acts as an endogenous HSP110 inhibitor. ¹⁴ The high expression of HSP110DE9 and/or the low expression of wild type HSP110 in colon cancer patients was associated with a highly effective response to chemotherapy. ¹⁵ Recent studies have shown major new roles for HSP110 in human NHL. In particular, HSP110 was shown to be an immunogenic antigen in a xenograft model of NHL, and expression of HSP110 was shown to correlate with the aggressiveness and proliferation index of tumor cells from patients. ¹⁶ A significant positive correlation between HSP110 and BCL-6 expression was also found in germinal center (GC) B cell-like/BCL-6+ DLBCL, which could be explained by the stabilization of BCL6. ¹⁷

Given the emerging role of HSP110 in cancer and NHL in particular, we investigated the role of HSP110 in activated B cell-like DLBCL (ABC-DLBCL) and which relies on the NF-κB signaling pathway for growth and survival. ¹⁸ Mutations affecting MyD88 (L265P) and the CD79/CARD11/MALT1/BCL10 signaling cascade are mostly responsible for the aberrant NF-κB activation. ^{19,20} We show here that HSP110 is an essential survival factor for these tumor cells. Furthermore, we demonstrate that HSP110 binds to and stabilizes wild type and mutated MyD88 in cell lines and patient's samples and thereby amplifies the aberrant NF-κB signaling pathway. In conclusion, we have identified a new role for HSP110 in tumor cells and have confirmed that HSP110 is a potential target for the development of future therapies in NHL.

Methods Primary tumors and cell lines.

ABC-DLBCL cell lines were purchased from ATCC (U2932 / OCI-Ly3 / OCI-Ly10 / SUD-HL2) or kindly provided by Prof. Dr. Daniel Krappmann (The Helmholtz Zentrum Munich, Germany) (HBL1/ TMD8) and cultured in RPMI1640 (Dominique Dutscher, Brumath, France) plus FBS (Dominique Dutscher) at 10% (U2932 / TMD8), 15% (OCI-ly3) or 20% (HBL1 / OCI-Ly10 and SUD-HL2). Tumors for immunoblots and IHC were provided by the Biological Resource Center Ferdinand Cabanne BB-0033-00044, Dijon, France, and by the Service de Pathologie, CLB, Lyon, France. Samples for mRNA analysis were from the Centre de Ressources Biologiques-Santé (BB-0033-00056) of Rennes Hospital. The study using human biopsies was approved by each relevant institutional review board or ethics committee and all human participants gave informed consent.

Transfection

ABC-DLBCL cell-lines were transfected with the AMAXA Nucleofector 2b device (Lonza, Basel, switzerland) and the Nucleofector kit T (HBL1, OCI-Ly3, OCI-Ly10) or V (U2932, SUD-HL2, TMD8). siRNA control (MISSION® siRNA Universal Negative Control #1, Sigma-Aldrich, Lyon, France) or hsph1 targeting siRNA (Silencer[™] Select Pre-Designed siRNAs, Life technologies, Saint-Aubin, France) were used. Specific AMAXA programs were applied (U-15 for U2932; P005 for SUD-HL2, TMD8; G016 for HBL1, OCI-Ly3, OCI-Ly10). For other HSPs, Silencer[®] Pre-Designed siRNA for HSP27 (ID: 122371 -HSPB1) and HSP70 (IDs6966- HSPA1A) were used, or the specific functional inhibitor of HSP90 PU-H71, 1 μM 16 h (**Axon Medchem,** Groningen, The Netherlands,). HEK293T transfections were performed using Genjet Vii reagent (TebuBio, Le Perray-en-Yvelines, France). GFP, HSP110-GFP and HSP110DE9 mutant–GFP were homemade plasmids. Myd88WT and L265P plasmid were used as described,²¹ pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] Vector (Promega E849A) was kindly provided by Dr. Philippe Gaulard (IMRB, U955 Inserm – Université Paris Est Créteil, UPEC, France).

Lentiviral particles

Human shRNA lentiviral vectors pseudotyped with measles virus glycoproteins have been described elsewhere. ^{22,23} These lentiviral vectors were produced in 293T cells with GFP expressing shRNA control (Sigma MISSION[®] SHC016-1EA) or hsph1 targeting shRNA lentiviral

constructs (Sigma MISSION[®] shRNA Plasmid DNA type SHCLND-NM_006644, clone TRCN0000275617). HBL1, Ly3 and U2932 were incubated using viral supernatant at MOI 2 for 24h before washing. 48h after transduction, cells were subjected to puromycin selection for 96h. GFP+ cells viability over time was followed using LSRII Flow Cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Immunoblot analysis

Primary antibodies used in this work were: anti-Bcl-xL (2764S), c-Myc (9605S), Cyclin D1 (2926S), P-STAT3 (9145S) and STAT3 (9139S), P-IkBa Ser32/36 (9246) from Cell Signaling (Danvers, USA); Mcl-1 (sc-819), HSC70 (sc-7298), HSP110 (sc-6241), GFP (sc-8334), BcL10 (331.3), and P-IRAK1 (sc-325147) from Santa Cruz biotechnologies (Dallas, TX, USA); anti-HSP110 [ab109624], for IHC staining, anti-BcL10 [ab199011], CD79a [ab199001], IgM [ab20054], IKBa [ab32518], P-IKBa [ab133462] Myd88 [ab119048], HSP90 [ab59459], HA [ab130275], HSP70 [ab5439], Ubiquitin (linkage-specific K63) [ab179434] from abcam (Paris, France); anti-IkBa [#4812], IRAK1 [#4504], Myd88 [#4883], c-Rel [#4727], TRAF6 [#8028], p65 [#8242], BcL2 [#2870], caspase 3 Asp175 [#9664], total caspase 3 [#9662], laminA/C [#4777], and HSP60 [#12165] from Cell Signaling Technologies (Danvers, USA); anti-p50 [616702] from Biolegend (San Diego, USA); HSP27 [ADI-SPA-800] from Enzo Life (Villeurbanne, France), and monoclonal anti-β-Actin–Peroxidase antibody [A3854] from SIGMA. Cytoplasmic and nuclear extracts were obtained using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagent kit (Thermo Scientific, Waltham, USA). immunoprecipitations were performed as previously described, ¹⁹ and the HSP110 primary antibody (ab109624) was used.

NF-кВ reporter assay

HEK293T cells were transfected using Genjet Vii reagent and 0.4 μg of pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] Vector (Promega, Madison, USA), 0.4 μg of Myd88 WT or L265P HA tagged, increasing amount of HSP110-HA tagged plasmid (0.1 to 0.7 μg) and 0.3 μg of GFP vector for normalization. Samples were prepared according to the Promega protocol (Luciferase assay system E1500). Luminescence from equivalent amounts of lysate was read in triplicate on an EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer,USA). All readings were normalized to the mean fluorescence intensity of GFP expression.

109

Immunofluorescence and Duolink[®] proximity ligation assay

Briefly, non-transfected or transfected ABC-DLBCL cells were harvested, washed, fixed with PFA 4% (10min on ice) and permeabilized using 100% chilled MetOH (10min, -20°C). Cells were spin down on Ghäasel slides using Cytospin (5min 300 rpm). After overnight incubation of primary antibodies (anti-IgM [IM260], anti-IkBa [ab32518], anti HSP105 [EPR4576], anti HSP70 (ab5439), anti Myd88 (ab119048)), Duolink[®] experiments were performed according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Microscopy images were taken on an Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) and images were acquired using AxioCam MRm CCD camera (Carl Zeiss GmbH, x63 oil objective). The 'Spot detector plugin' of ICY software was used to count the number of spots per cell and statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6 (Unpaired Mann-Whitney U test, at least 100 cells counted for each condition).

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated with Trizol (Invitrogen, CA, USA) and reverse transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega) and random hexamers (Promega). Quantitative RT-PCR for reactive lymph nodes and patient's sample were done as follows: Quantitative RT-PCRs were performed using the TaqMan Universal Master Mix and specific Taqman Gene Expression Assays (Life Technologie- Applied Biosystems): HSP110/hs-00971475-m1 and ABL/hs001104728-m1, (for internal standard gene). Gene expression was measured using the Δ CT calculation method. For each sample, the Ct value for HSP110 was determined, normalized to its respective value of *ABL* and compared using the Δ Ct method to the mean value obtained for reactive lymph nodes samples. Statistical analyses were performed with Prism software (GraphPad software Inc, San Diego, CA) using a Mann-Whitney non-parametric U-test (* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01).

For other quantitative RT-PCRs, PrimePCR[™] SYBR[®] Green Assay: RPS18, Human (Biorad), MyD88 F: GTTGTCTCTGATGATTACCTG, MyD88 R: GGGGAACTCTTTCTTCATTG (Sigma Aldrich), and the HSP110 primers used were described earlier. ¹⁵

Results

HSP110 expression impacts B lymphoma cells survival and NF-KB signaling

To explore the role of HSP110 in ABC-DLBCL cell lines, we transduced them with a lentivirus carrying HSP110 shRNA that was optimized to have high transduction capacities towards hard-to-transfect human B cell lines. ^{22,24} We observed decreased survival in the infected cell lines after 5 and 7 days of culture for the HBL1 and OCI-Ly3 cells, respectively, but not for U2932 cells (Figure 1A-B). A decrease in the anti-apoptotic proteins BclxL and Bcl2, together with an increase in caspase-3 cleavage, suggested that depletion of HSP110 is deleterious in certain ABC-DLBCL cell lines and induced apoptotic cell death (Figure 1C). As hyper-activation of the NF-kB signaling pathway is primary responsible for ABC-DLBCL proliferation and survival, in the following experiments we studied the impact of HSP110 on this pathway. Interestingly, again HSP110 knock-down induced a decrease in IkB phosphorylation in all ABC-DLBCL cell lines tested, with the exception of U2932 (Figure 1D-E). It is worth noting that U2932 cells, in contrast to the other cell lines analyzed, do not bear MyD88 and CBM mutations.

Next, we compared the effect observed with HSP110 depletion with that observed by depleting/inhibiting other main HSPs (HSP27, HSP70 and HSP90). We used either a siRNA approach (for HSP27, HSP70 and HSP110) or a chemical inhibitor (PU-H71 for HSP90). As shown in sup Figure 1A, inhibition of HSP90, as already reported,² induced a decrease in IkB phosphorylation similar to that obtained upon HSP110 depletion. In contrast, HSP27 or HSP70 knock-down did not affect P-IkB content. In keeping with the decrease in IkB phosphorylation of p65 and p50, two downstream effectors of NF-kB, were also decreased in the nucleus of cells depleted in HSP110 (Figure 1F and sup Figure 1B). Conversely, transfection of SUD-HL2 by increasing amounts of HSP110 induced an increase in IkB phosphorylation (Figure 1G). Taken together, these data suggest that HSP110 is involved in ABC-DLBCL survival through NF-kB signaling modulation.

Two NF-kB activating pathways have been described in ABC-DLBCL and are major sites of wellcharacterized gain-of-function mutations resulting in spontaneous assembly of signaling protein complexes: the MyD88/IRAK pathway (30% of patients bear the Myd88 L265P mutation) and the B cell receptor pathway (with CD79B and CARD11 mutated in 20% and 9% of patients, respectively). Although these two pathways were identified separately, recent data demonstrated by Staudt ²⁵ pointed out their ability to cooperate at a late endosomal stage. Indeed, BCR components co-localized with MyD88, TLR9 and CARD11-MALT1-BCL10 (CBM) complex in endolysosomes, where they activate the NF-kB pathway. To obtain more insights on the stage of the NF-KB pathway at which HSP110 interfere, we looked at the IgM--MyD88 complex formation when HSP110 is down-regulated. Using proximity ligation assays (PLA), we detected close proximity of IgM and phospho (P)-IkB in the cytosol of ABC-DLBCL control cells (Figure 2A and 2B). Upon siRNA-mediated HSP110 down expression, IgM and P-IKB proximity was strongly reduced in the cell lines bearing dual MyD88 and CBM mutations (HBL1 and OCI-Ly3), but not in the U2932 cell line, which is devoid of these mutations. This suggested that HSP110 could play a role in the IgM- MyD88 complex. We sought to confirm this hypothesis by studying the effect of HSP110 depletion in the IRAK1/TRAF6 complex formation immediately downstream of IgM-and MyD88. Upon HSP110 downregulation we found that IRAK1 was less phosphorylated in HBL1 and OCI-Ly3 (but not in U2932) (Figure 2C), and P-IRAK1 was less bound to TRAF6 (sup Figure 1C). Under normal IRAK1/TRAF6 complex formation, the auto-K63-ubiquitination of TRAF6 appears to enable the recruitment and activation of downstream signaling. ²⁶ However, here, this TRAF6 K63-ubiquitination was also decreased (Figure 2D). These data suggest that HSP110 could intervene upstream of IRAK1/TRAF6 complex formation, at an early stage of the NF-κB signaling pathway when IgM and MyD88 co-localize.

HSP110 enhances MyD88-mediated NF-кB signaling through direct interactions

MyD88 activation upon BCR-TLR complex stimulation on B cells leads to NF-κB signaling and subsequent proliferation. ²⁵ Furthermore, oncogenically active MyD88 in 30% of ABC-DLBCL patients accounts for spontaneous assembling of the IRAK1/IRAK4 complex leading to a strong and sustained NF-κB signal. We, therefore, hypothesized that HSP110 could enhance MyD88-mediated NF-κB signaling. We overexpressed HSP110 together with wild-type (wt) MyD88 or with the most common mutated form of MyD88 (MyD88 L265P) in a Burkitt lymphoma cell line (BJAB) that bears neither the MyD88 mutation nor NF-κB hyperactivation. As shown in Figure 3A, HSP110, MyD88 and MyD88L265P alone enhanced IκB phosphorylation. As

expected, MyD88 L265P promoted a stronger phosphorylation, ²¹ which was enhanced by HSP110 overexpression.

In order to functionally test whether HSP110 was able to promote NF-κB target gene transcription in a MyD88-dependent manner, we used a luciferase reporter gene driven by an NF-κB promoter. HEK293 cells were co-transfected with increasing amounts of HSP110, with or without MyD88 wt or MyD88 L265P. We observed a HSP110 dose-dependent induction of luciferase activity (Figure 3B). Strikingly, whereas MyD88 L265P alone was able to promote this activity (Figure 3A), the addition of HSP110 induced a 100 fold increase at the maximal concentration (Figure 3B). Overall, these data show that HSP110 enhances both MyD88 wt and mutated signaling. This suggests that HSP110 may interact directly with MyD88 in order to reinforce its action.

As shown in Figures 3C-D, HSP110 and MyD88 co-localized in ABC-DLBCL cells and associated *in cellulo* as demonstrated by PLA. Of note, in all three tested cell lines, HSP110-MyD88 binding spots were more abundant than HSP110-HSP70 binding spots (Figure 3C-D), used here as a positive control as HSP70 is a well-known partner of HSP110. No close proximity of HSP70 and MyD88 was observed (data not shown). This *in cellulo* interaction was confirmed by co-immunoprecipitation experiments in OCI-LY3 and SUD-HL2 (Figure 3E). As both cell lines expressed a mutated form of MyD88, we wondered if HSP110 could also bind to the wild-type form. Co-immunoprecipitation experiments of HSP110 and MyD88 wt in HEK293 showed at least similar binding capacities (Figure 3F).

HSP110 stabilizes MyD88

Expression of increasing amounts of HSP110 in HEK293 induced a concomitant increase in soluble MyD88 protein amounts (Figure 4A-B and sup Figure 2A) for both L265P and wt MyD88. This phenomenon was not due to a transcriptional control of the *MyD88* gene as MyD88 mRNA content did not increase (Sup Figure 2B). Furthermore, expression of the HSP110 dominant negative mutant HSP110DE9 (known to inhibit HSP110 wild type at a 1:1 ratio¹⁵ inhibited the expression of MyD88 (Figure 4A-B). Expression of an HSP110 mutant deficient in its nuclear localization signal also increased MyD88 protein expression, suggesting that HSP110 acts directly on MyD88 in the cytosol (Figure 4C). The study of MyD88 half-life in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide showed that HSP110 stabilizes MyD88wt and MyD88L265P in a similar way (Figure 4D). These observations were confirmed

in HBL-1 and OCI-Ly3 as HSP110 down-expression by specific siRNA reduced the expression of MyD88 but not in U2943, which is in keeping with the previous results (Figure 4E). Finally, in the presence of the proteasome inhibitor MG132, the MyD88 level was restored, suggesting that HSP110 stabilized MyD88 by interfering with its proteasomal degradation (Figure 4F).

HSP110 is highly expressed in ABC-DLBCL patients and correlates with the amount of MyD88

Strong HSP110 expression has been found in samples from different cancer patients including those with GC-DLBCL (REF). To get a clinical insight on the role of HSP110 in ABC-DLBCL, we measured HSP110 mRNA levels in a cohort of GC-DLBCL, a cohort of ABC-DLBCL, and samples from nonmalignant reactive lymph nodes. We confirmed stronger though heterogeneous HSP110 mRNA expression on DLBCL of the GC sub-type in comparison to reactive lymph nodes samples, independent of lymphoma sub-type; i.e. GC- or ABC-DLBCL with, respectively, 21 fold-increase (P=0.009) and 30-fold increase (P=0.01) (Figure 5A). This elevated HSP110 expression was then confirmed by IHC in biopsies from 12 patients with the ABC sub-type (Figure 5B and Table 1), as well as in biopsies from patients with the GC subtype (Sup Figure 3). In all cases, more than 80% of cells were positive, with a score of 2 to 3 for the staining intensity, with the exception of samples from two patients with a score of 1. Interestingly, though HSP110 was always present in the cytosol, frequent nuclear localization was also observed. HSP110 staining in reactive lymph nodes was limited to the germinal center, confirming its association with B cell activation. In another cohort of 13 ABC-DLBCL patients, we extracted proteins from the tumor biopsy and observed that the level of HSP110 correlated significantly with that of MyD88 (r=0.8148, n=13) (Figure 5C-D). These data in patients support our results showing that HSP110 plays a role in MyD88 protein expression in B-cell lymphoma.

Discussion

Genomic and functional investigations have shown that ABC-DLBCL tumors are driven either by chronic BCR and/or TLR9/ MyD88 signaling, in contrast to GC-DLBCL. Many downstream effectors are therefore activated, leading to sustained NF-κB activation, on which ABC-DLBCL tumors rely for survival. There is important genetic heterogeneity in ABC-DLBCL tumors accounting for this chronic BCR and MyD88 signaling, as mutations in CD79a/b, MyD88, CARD11 and A20 have been detected in patients' samples. In particular, 29% of tumors harbor a single nucleotide variant that changes a leucine residue at position 265 of the MyD88 coding region to a proline, leading to a mutant protein (MyD88 L265P) that spontaneously assembles with IRAK1 and IRAK4 into so-called Myddosomes.²¹ We showed here that HSP110 directly binds to MyD88, independent of L265P mutation, and stabilizes both protein forms leading to the amplification of NF-κB signaling and to the subsequent improved survival in ABC-DLBCL lines. We also observed a correlation between HSP110 and MyD88 levels in patients, thus confirming our *in vitro* results and suggesting that HSP110 could be a potential target for lymphoma therapy in the future.

As an adaptor of Toll-like receptor signaling, MyD88 is regulated by endogenous mechanisms as well as pathogens. In macrophages, the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 directly binds and polyubiquitinates MyD88 leading to its proteasomal degradation, thus limiting the overproduction of pro-inflammatory cytokines. ²⁷ In the same way, the anti-inflammatory cytokine, TGF-β1, drives MyD88 degradation through the Smad6–Smurf pathway.²⁸ Pathogens have many ways to escape immune surveillance. For example, they can also drive MyD88 through the Ub-proteasome pathway as shown for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. ²⁹ As an adequate inflammatory response to pathogens must be balanced, molecular machinery that opposes MyD88 degradation must exist, and our present work suggests that HSP110 could be involved as it promotes wild type MyD88 stability (even though at a lower level than for MyD88 L265P).

HSPs have multiple roles in cancer cells that relate to their chaperone function; among these stabilization of mutated or over-expressed proteins is common. In addition, proliferation- or survival-dependent activating mutations of signaling molecules show increased dependence on HSPs. ^{30,2,31} In germinal center B cell-like/BCL-6⁺ DLBCL, HSP90 interacts with the oncogene BCL-6 and stabilizes BCL-6 mRNA and protein. ³¹ A significant positive correlation between HSP110 and BCL-6 expression has also been found in GC-DLBCL cell lines and patients. ¹⁶ In addition, in Burkitt lymphoma, HSP110 prevents degradation of the overexpressed oncogene c-Myc. ¹⁷ Therefore, through their multiple oncogene targets in lymphomas, HSPs and particularly HSP110 appear to be crucial to their proliferation and survival, thus confirming the overall addiction of tumors to HSPs.

115

Beyond ABC-DLBCL, the missense mutation of MyD88 has been described in other diseases such as benign monoclonal IgM gammopathy of undetermined significance (47%), Waldenström's macroglobulinemia (WM) (in almost 100% of patients) and chronic lymphocytic leukemia (less than 10%). ³²⁻³³ It is very likely that HSP110 could also have the same MyD88 stabilizing function in these diseases, although this hypothesis needs to be investigated.

We observed that cell lines with MyD88 mutation (HBL1, SUD-HL2, OCI-Ly3 and OCI-Ly10), but not without (U2932), were dependent on HSP110 for their survival. Patients harboring MyD88 L265P or other mutations such as S222R (like SUD-HL2) may therefore be the ones to benefit most from the pharmaceutical inhibition of HSP110. Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) is a direct downstream effector of BCR signaling, and inhibition by Ibrutinib is standard therapy in ABC-DLBCL. However, despite its rapid translation to clinical trials, some patients have shown a limited response or ultimately escape Ibrutinib efficacy. ³⁴ To overcome this problem, it has recently been shown that MyD88 silencing enhances ibrutinib efficacy in ABC-DLBCL cells harboring MyD88 L265P mutations, suggesting that a dual target would improve the therapeutic efficacy. ³⁵ Furthermore, in Waldenström's macroglobulinemia (WM), BTK is a downstream target of MYD88 L265P signaling. ³⁶ We are therefore currently investigating the benefit of combining BTK inhibition with shRNA-mediated HSP110 knock-down in selected cell lines. Interestingly, the HSP110 protein level determined by IHC was found to be low in normal non-activated B cells outside the germinal center (Figure 5B) and the current available HSP110 KO model shows no alteration of B cell number in homeostatic conditions (not shown). This information could be of particular interest for the rationale of HSP110 inhibition in DLBCL, as the current R-CHOP based regimen targets normal and pathologic B cells. In contrast, HSP110 inhibition due to its overexpression in NHL may selectively target lymphoma cells but not naive normal B cells. At the time of new therapies that tend to utilize lymphoma oncogenic cell signaling to selectively kill DLBCL cells in preference to normal B cells, HSP110 inhibition could represent a promising new approach.

Several recent reports by us and others have highlighted the importance of this still largely unrecognized HSP, HSP110. We now propose, and bring here new evidence in support of our hypothesis, that HSP110 plays a central role in many cancers and in DLBCL in particular, through its capacity to sustain many critical signaling oncogenic pathways. Once available,

116

HSP110 specific inhibitors will probably play a preponderant role in the therapeutic arsenal for ABC-DLBCL and beyond.

Acknowledgments: This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (GJ and CG), the Conseil Regional de Bourgogne, the French National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-LABX-0021-01- LipSTIC Labex), the German Research Foundation (DFG) CRC685 "Immunotherapy" and Juniorprofessoren-Programm of the Federal State of Baden-Württemberg, Germany (both to AW and OOW). We also thank the FEDER for their support. We thank Gisèle Froment, Didier Nègre and Caroline Costa from the lentivectors production facility /SFR BioSciences Lyon (UMS3444/US8). We thank Thierry Defrance (INSERM U1111, Lyon France) and Karen Leroy (Paris Descartes University, France) for helpful discussions, support and advice.

Contributions : CB, EV, LM, CC C, TF, WA, GJ designed the study and experiments; CB, EV, LS, OOW, performed the experiments; EV, LM, CC C, CP, TF, FJ, AW provided samples and expertise; CB, EV, LM, CC C, TF, FJ, AW, CG, GJ analyzed the experiments; GJ directed the work.

Conflict of Interest Disclosure: the authors declare no competing financial interests

<u>Correspondence to</u>: Gaetan Jego, INSERM, UMR 1231, Université Bourgogne Franche-Comté, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France. Tel: (33) 3 80 39 33 45, Fax (33) 3 80 39 34 34.E-mail: <u>gaetan.jego@u-bourgogne.fr</u>

References

- 1. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. Pathology. 2017;
- Goldstein RL, Yang SN, Taldone T, et al. Pharmacoproteomics identifies combinatorial therapy targets for diffuse large B cell lymphoma. J. Clin. Invest. 2015;125(12):4559– 4571.

- 3. Marullo R, Rutherford SC, Leonard JP, Cerchietti L. Therapeutic implication of concomitant chromosomal aberrations in patients with aggressive B-cell lymphomas. *Cell Cycle*. 2016;15(17):2241–2247.
- 4. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14(10):630–642.
- 5. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2013;14(10):703–718.
- 6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.
- 7. Jego G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* 2013;332(2):275–285.
- 8. Gobbo J, Marcion G, Cordonnier M, et al. Restoring Anticancer Immune Response by Targeting Tumor-Derived Exosomes With a HSP70 Peptide Aptamer. *JNCI-J. Natl. Cancer Inst.* 2016;108(3):djv330.
- 9. Boudesco C, Rattier T, Garrido C, Jego G. Do not stress, just differentiate: role of stress proteins in hematopoiesis. *Cell Death Dis.* 2015;6:UNSP e1628.
- 10. Zuo D, Subjeck J, Wang X-Y. Unfolding the Role of Large Heat Shock Proteins: New Insights and Therapeutic Implications. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:.
- 11. Yamagishi N, Fujii H, Saito Y, Hatayama T. Hsp105β upregulates hsp70 gene expression through signal transducer and activator of transcription-3: Mechanism of Hsp105β-induced Hsp70 expression. *FEBS Journal*. 2009;276(20):5870–5880.
- 12. Berthenet K, Bokhari A 'dem, Lagrange A, et al. HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation. *Oncogene*. 2016;
- 13. Berthenet K, Boudesco C, Collura A, et al. Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer. *Oncolmmunology*. 2016;5(7):e1170264.
- 14. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nature Medicine*. 2011;17(10):1283–1289.
- Collura A, Lagrange A, Svrcek M, et al. Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability and Large Deletions in HSP110 T-17 Have Improved Response to 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy. *Gastroenterology*. 2014;146(2):401–+.
- 16. Zappasodi R, Bongarzone I, Ghedini GC, et al. Serological identification of HSP105 as a novel non-Hodgkin lymphoma therapeutic target. *Blood*. 2011;118(16):4421–4430.
- 17. Zappasodi R, Ruggiero G, Guarnotta C, et al. HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2015;125(11):1768–1771.
- 18. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive Nuclear Factor κB Activity Is Required for Survival of Activated B Cell–like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001;194(12):1861–1874.
- 19. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115–119.
- 20. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88–92.
- Avbelj M, Wolz O-O, Fekonja O, et al. Activation of lymphoma-associated MyD88 mutations via allostery-induced TIR-domain oligomerization. *Blood*. 2014;124(26):3896– 3904.

- 22. Frecha C, Costa C, Levy C, et al. Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood*. 2009;114(15):3173–3180.
- 23. Frecha C, Levy C, Costa C, et al. Measles Virus Glycoprotein-Pseudotyped Lentiviral Vector-Mediated Gene Transfer into Quiescent Lymphocytes Requires Binding to both SLAM and CD46 Entry Receptors. *Journal of Virology*. 2011;85(12):5975–5985.
- 24. Lévy C, Amirache F, Girard-Gagnepain A, et al. Measles virus envelope pseudotyped lentiviral vectors transduce quiescent human HSCs at an efficiency without precedent. *Blood Advances*. 2017;1(23):2088–2104.
- 25. Staudt LM. AACR 2017 Louis Staudt on CRISPR-Cas9 screen in lymphoma. 2017;
- Windheim M, Stafford M, Peggie M, Cohen P. Interleukin-1 (IL-1) Induces the Lys63-Linked Polyubiquitination of IL-1 Receptor-Associated Kinase 1 To Facilitate NEMO Binding and the Activation of I B Kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 2008;28(5):1783–1791.
- 27. Wang C, Chen T, Zhang J, et al. The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 "preferentially" promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nature Immunology*. 2009;10(7):744–752.
- Lee YS, Park JS, Kim JH, et al. Smad6-specific recruitment of Smurf E3 ligases mediates TGF-β1-induced degradation of MyD88 in TLR4 signalling. *Nature Communications*. 2011;2:460.
- 29. Zhao Q, Liang D, Sun R, et al. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Replication and Transcription Activator Impairs Innate Immunity via Ubiquitin-Mediated Degradation of Myeloid Differentiation Factor 88. *Journal of Virology*. 2015;89(1):415– 427.
- 30. Moulick K, Ahn JH, Zong H, et al. Affinity-based proteomics reveal cancer-specific networks coordinated by Hsp90. *Nature Chemical Biology*. 2011;7(11):818–826.
- 31. Cerchietti LC, Lopes EC, Yang SN, et al. A purine scaffold Hsp90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6–dependent B cell lymphomas. *Nature Medicine*. 2009;15(12):1369–1376.
- 32. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101–105.
- 33. Xu L, Hunter ZR, Yang G, et al. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 2013;121(11):2051–2058.
- 34. Wilson W. The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) inhibitor, Ibrutinib (PCI-32765), has preferential activity in the ABC subtype of relapsed/refractory de novo diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): interim results of a multicenter, open-label, phase 2 study. 2012;
- 35. Mondello P, Brea EJ, De Stanchina E, et al. Panobinostat acts synergistically with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma cells with MyD88 L265 mutations. *JCI Insight*. 2017;2(6):.
- 36. Yang G, Zhou Y, Liu X, et al. A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2013;122(7):1222–1232.

Diagnosis	Percentage of positive cells >80%	intensity		
		Score 3	Score 2	<u>Score 1</u>
ABC-DLBCL (13)	100 %	8/13 (61%)	3/13(12%)	2/13 (15%)
GC-DLBCL (7)	100 %	3/7 (43%)	3/7 (43%)	1/7 (14%)

Table 1. Percentage and intensity of HSP110 in DLBCL patients' samples

Figure legends

Figure 1. HSP110 expression impacts survival and NF-κB signaling. (A) Kinetics of cell survival determined by Annexin-V/7AAD staining on shRNA expressing cells. ***P<0.001, ns=not significant. **(B)** Representative Annexin-V/7AAD staining on shRNA-expressing cells determined at d9. **(C)** Immunoblot analysis of HSP110, Bcl-xL, Bcl2, and cleaved Caspase 3, 48h after transduction with a shRNA targeting HSP110 or a control shRNA in HBL1. Beta-actin served as a loading control. **(D)** Immunoblot analysis of HSP110, P-IkB and IkB 48h after transfection with a siRNA targeting HSP110 or a control siRNA. Beta-actin served as a loading control. **(D)** Immunoblots shown in D and determined from all cell lines (except U2932) relative to the loading control (n=5, p<0.01). **(F)** Immunoblot analysis of HSP110, NF-kB p65 and p50 content in the nucleus and cytosol of HBL1, SUD-HL2 and OCI-Ly3 48h after transfection with a siRNA targeting HSP110 or a control siRNA. Beta-actin served as a loading control. **(G)** Immunoblot analysis of HSP110, P-Ik, and IkB, in SUD-HL2 cells 48h after transfection with plasmids coding for HSP110, P-Ik, BC70 served as a loading control.

Figure 2. HSP110 intervenes upstream of the IRAK1/TRAF6 complex formation. In cellulo interaction of IgM with P-IkBa was determined in HBL1, OCI-Ly3 and U2932 by Duolink technology after transfection with a siRNA targeting HSP110 or a control siRNA. Scale Bars 20 μ m. (B) Quantitation of IgM-P-IkBa spots per cell determined by Duolink technology as in (A). ***p<0.001, ns=not significant. (C) Immunoblot analysis of HSP110, P-IRAK1 and total IRAK1 in HBL1, OCI-Ly3 and U2932 48h after transfection with a siRNA targeting HSP110 or a control siRNA. Beta-actin served as a loading control. (D) Immunoprecipitation of Lysine63-linked polyubiquitin chain (K63 Ub) in SUD-HL2 and OCI-Ly10 cells 48h after transfection with a siRNA

targeting HSP110 or a control siRNA, followed by immunoblot using a TRAF6 Ab. Immunoblot of total cell extract (input) shows HSP110 and TRAF6 analysis.

Figure 3. HSP110 interacts with MyD88 to enhance NF-kB signaling. (A) Immunoblot analysis of P-Ik, IKB, HSP110 and MyD88 in BJAB cells 48h after transfection with plasmids coding for HSP110-GFP, and/or MyD88 wt or MyD88 L265P. HSC70 served as a loading control. (B) Luciferase reporter experiment in HEK 293T cells. Cells co-transfected with GFP reporter (internal control) and NF-KB Luciferase reporter plasmid with or without increasing concentrations untagged HSP110 and with or without 0.4 µg of Myd88L265P or Myd88WT plasmids. Shown are relative luciferase values (luciferase/GFP ratio), **, p<0.01, ***p<0.001. (C) In cellulo interaction of HSP110 with MyD88 was determined in HBL1, SUD-HL2 and OCI-Ly3 by Duolink technology, in the presence or not of siRNA HSP110. HSP70 was used here as a positive control of HSP110 interaction. Scale Bars 20 µm. (D) Quantitation of HSP110-MyD88, HSP110-HSP70, spots per cell determined by Duolink technology as in (A). ***P<0.001. (E) Immunoprecipitation of HSP110 (IP HSP110) and of MyD88 (IP MyD88) in SUD-HL2 and OCI-Ly3 cells followed by immunoblot using an anti-MyD88 and anti-HSP110 Ab. Normal mouse serum IgG (sc-2025) and normal rabbit IgG (sc-2027) from Santa Cruz Biotechnologies® were used as non-relevant antibody for control immunoprecipitation (IP control). (F) Immunoprecipitation of HSP110-GFP (IP-GFP) and of MyD88-HA (IP-HA) in HEK293 cells 48h after transfection with plasmids coding for HSP110-GFP, with or without MyD88-HA L265P (0.7µg) or MyD88-HA WT (0.7µg).

Figure 4. HSP110 stabilizes MyD88. (**A**, **B**) Immunoblot analysis of HSP110-GFP, total HSP110, MyD88 L265P (**A**) or MyD88 WT (**B**), 48h after transfection with plasmids coding for MyD88 L265P (0.7µg) together with control GFP, HSP110DE9-GFP or increasing concentrations HSP110-GFP in HEK293. HSC70 served as a loading control. (**C**) Immunoblot analysis of HSP110-GFP and MyD88 L265P 48h after transfection with plasmids coding for MyD88 L265P (0.5µg) together with control GFP or increasing concentrations (0.1 and 0.5µg) of the cytoplasmic-only mutant of HSP110 (HSP110–NLS) in HEK293. (**D**) Immunoblot analysis of HSP110-GFP, total HSP110, MyD88 L265P or MyD88 WT in HEK293 treated with cycloheximide (CHX: 100 µg/ml) during the indicated times, 24h after transfection with control-GFP or HSP110-GFP plasmids. HSC70 served as a loading control. Lower panel shows the MyD88 immunoblot intensity from the above experiment (black line: transfection HSP110-GFP + Myd88-HA, blue line: transfection GFP + Myd88-HA). (E) Immunoblot analysis of HSP110 and MyD88 in HBL1, OCI-Ly3 and U2932 60h after transfection by a universal control siRNA or with a siRNA that targets HSP110. (F) Immunoblot analysis of total HSP110 and MyD88 in HBL1 transfected as in E, and treated or not with MG132 (10 μ M) during the last 3 or 5h of the culture.

Figure 5. High expression of HSP110 correlates with MyD88 expression in patients. (A) the expression of HSP110 mRNA in reactive lymph nodes (RLN), GC-DLBCL and ABC-DLBCL patients lymph nodes determined by qRT-PCR. *, p<0.05, **, p<0.01 ns=not significant. (B) Representative images of reactive lymph nodes, GC-DLBCL and ABC-DLBCL patients' lymph nodes sections stained with HSP110 antibody by immunohistochemistry. Two original magnifications are shown: x2.8 (A, C, scale bar: 425 μ m) and x40 (B, D, scale bar: 30 μ m). Three representative images of HSP110 intensity are shown below from ABC-DLBCL patients' sections (original magnification x40. Scale bar: 30 μ m). (C) Immunoblot analysis of HSP110 and MyD88 in 13 biopsies of ABC-DLBCL patients. HSC70 served as a loading control. (D) HSP110 immunoblot intensity relative to MyD88 from (C).





TRAFE

Loading control

Figure 2









analysis.

TRAFE

Loading control

HSP110, followed by immunoblot using an P-IRAK1, TRAF6. Immunoblot of total cell extract (input) shows HSP110 and TRFA6

Sup Figure 1

Revue premier auteur et articles en collaboration:

www.nature.com/cddis

News and Commentary

Do not stress, just differentiate: role of stress proteins in hematopoiesis

C Boudesco^{1,2}, T Rattier^{1,2}, C Garrido^{1,2,3} and G Jego*,1,2</sup>

Cell Death and Disease (2015) 6, e1628; doi:10.1038/cddis.2014.560; published online 29 January 2015

Hematopoiesis permits the constant regeneration of the blood system and is a permanent example of cell differentiation. Defects in its tight regulation can lead to either cell death or abnormal proliferation and may translate into multiple types of blood disorders, including leukemia. Heat shock proteins (HSPs), the expression of which is controlled by heat shock factors (HSFs, currently four known members),¹ are a set of highly conserved proteins induced in response to a wide variety of physiological and environmental stress. HSP/HSF overexpression or mislocalization has been described in many cancers, particularly in hematology, and other diseases. Therefore, the involvement of HSFs/HSPs in the differentiation of cells from a hematopoietic origin is critical and is at the center of many investigations.^{2,3} Here, we present newly identified mechanisms used by HSFs and HSPs to control the differentiation of several types of hematopoietic-derived cells.

For years, the common dogma has been that HSFs exclusively target heat shock elements (HSEs) present in the promoter of HSP genes to rapidly mount a protective response to heat-induced damage. However, recent genomewide studies of the signaling pathways induced by the most studied HSF, HSF1, have demonstrated that this factor controls different transcriptional programs depending on the cellular stress experienced.⁴ Indeed, when HSF1 promoter binding was analyzed in the absence of heat shock, a very different profile was uncovered and included various sets of genes related to processes such as apoptosis, RNA splicing, and ubiguitination.⁵ Within the more extreme context of highly malignant tumors, HSF1 drives a unique transcriptional program that is distinct from heat shock and includes genes supporting oncogenic progression, cell-cycle regulation, and metabolism.⁶ Mendillo et al. demonstrated that HSF1 rewires the transcriptome during tumorigenesis, and we and others have similarly hypothesized that HSF1-dependent rewiring occurs during the course of another endogenous stress-like situation, namely, cellular differentiation.

To provide insight into a general view of HSF1 involvement in cell differentiation, we used an *in vivo* Hsf1^{-/-} mouse model and observed a significantly reduced percentage of myeloid cells in the bone marrow of *Hsf1^{-/-}* mice compared with wildtype mice.⁷ In addition, monocytes exhibited a reduced ability to differentiate *in vitro* into macrophages. We observed that the *SPI1/PU.1* gene that codes for the master myeloid transcription factor, contains several HSE-like sequences, including one particularly well-conserved sequence located in the second intron to which HSF1 binds during differentiation. Furthermore, HSF1 inhibition prevented an increase in *SPI1/PU.1* mRNA accumulation and thereby the differentiation of monocytes into macrophages.

Although an HSF1 binding site in the first intron of HSP27 and HSP90 beta was similarly described during hemininduced erythroid differentiation of the myeloid K562 cell line, the functional repercussion on the differentiation process was not demonstrated.⁸ Furthermore, the putative binding of other HSF family members to nonpromoter regions has been previously described; >50% of HSF4 binding sites map to introns or exons in the genome, whereas only 5% map to promoter proximal regions.⁹ As described for HSF1 when binding to the IL-6 gene promoter,¹⁰ it is likely that HSF1 can facilitate the opening of the chromatin structure of the SPI1/ PU.1 promoter through this intron-located HSE.

A recent study by Price and colleagues confirmed the role of HSF1 in other hematopoietic-derived cells, osteoclasts,¹¹ which are multinucleated cells specialized in bone catabolism that originate from the myeloid lineage. Under appropriate in vitro culture conditions, osteoclasts can be derived from monocytes. Chai et al. were intrigued by the bone loss and increased osteoclast formation observed in mouse models treated with the geldanamycin-derived HSP90 inhibitor and anticancer drug 17-AAG¹² and demonstrated an HSF-1dependent increase in differentiation upon 17-AAG treatment.¹¹ In contrast to monocyte-derived macrophage differentiation, no increase in HSF1 expression was observed upon 17-AAG treatment, suggesting the activation of HSF1 under stress. Although the exact mechanism governing this stress-induced osteoclast differentiation has not yet been identified, a very similar model to the one uncovered by Jego et al. has been proposed. Indeed, microphthalmia-associated transcription factor (MITF), a critical transcription factor for osteoclast formation and function, was strongly induced in an HSF1dependent manner.¹¹ MITF induction is hypothesized to be driven by the direct transcriptional action of HSF1 (either at the promoter level or at an intron-located regulatory site) or by the

¹INSERM UMR 866, « Equipe labellisée Ligue contre le Cancer » and Laboratoire d'Excellence LipSTIC, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France; ²University of Burgundy, Faculty of Medicine and Pharmacy, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France and ³CGFL, Centre de lutte contre le cancer GF Leclerc, Dijon, France *Corresponding author: G Jego, INSERM UMR 866, « Equipe labellisée Ligue contre le Cancer » and Laboratoire d'Excellence LipSTIC, 7 Boulevard Jeanne D'Arc, 21079 Dijon, France. Tel: +33 3 80 39 33 45; Fax: +33 3 80 39 34 34; E-mail: gaetanjego@u-bourgogne.fr

posttranslational stabilization of MITF via HSP70, which is strongly induced by 17-AAG.

It is somehow evident that HSF1 participates in the cell differentiation process not only by regulating the mRNA level of nonrelated HSP genes, but also by its well-known role in inducing the expression of HSP family members. The concept that cell differentiation needs a specific pattern of HSPs was first proposed in the early 1990s by Twomey et al.,13 who demonstrated that the pattern of HSP induction during myeloid differentiation of U937 cells differed from that observed when cells were subjected to heat shock, suggesting a unique program of HSP exploitation. Similarly, during hemin-induced erythropoiesis, some HSPs are more strongly expressed than after a heat shock, suggesting a specific role for HSPs in red blood cell formation.⁸ Under stress conditions, HSPs promote either the stability of selected proteins or their proteasomal degradation, thus contributing to cell survival. A similar role has been identified for HSPs within the context of cell differentiations.

For example, the HSP90 beta isoform binds to and protects cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP-1) from proteasomal degradation, thereby allowing macrophage formation.¹⁴ At the late stage of erythropoiesis, the master transcription factor GATA-1 must be degraded. HSP27, an ATPindependent chaperone that binds ubiguitin and orchestrates the degradation of proteins such as IkBa, is phosphorylated and binds to GATA-1 to induce its ubiquitination and proteasomal degradation.¹⁵ Conversely, HSP70, the welldescribed role of which is to assist the folding of newly synthesized/misfolded polypeptides and to transport proteins across cellular membranes, protects critical transcription factors, such as SPI1/PU.1, from proteasomal degradation during macrophage differentiation. Given the early and transient nature of HSF1 activation during monocyte differentiation. HSF1 may first act directly like a sensor to initiate the differentiation process by inducing the transcription of SPI1/ PU.1; HSF1 can then indirectly maintain the macrophage



Figure 1 Mechanisms of action of HSF and HSPs in the control of expression and stability of hematopoïetic transcription factors. (a) Upon differentiation signals, HSF1 gets activated, trimerized, and binds HSE elements found in either the promoter or intronic regions of HSPs and non-HSPs genes. Critical transcription factors are then protected from caspase-3 cleavage (Casp 3), from proteasomal degradation, or conversely oriented towards proteolysis depending on the stage of differentiation and the needs of the cell. (b) In contrast to normal erythropoïesis, HSP70 cannot be translocated into the nucleus of erythroïd progenitors from MDS and from beta-thalassemia major (β-Thal) patients. GATA-1 is no more protected and subsequently cleaved by caspase-3



differentiation transcriptional program though the expression of HSP70, which stabilizes SPI1/PU.1.7

Partial caspase activation is required in several hematopoietic differentiation processes.^{16,17} Protection of critical differentiation factors from caspase cleavage during this process is therefore necessary, and HSPs have a central role within this context. Ribeil et al.18 revealed that during erythropoiesis, HSP70 translocates into the nucleus and directly associates with the erythropoiesis master transcription factor GATA-1, thereby protecting it from caspase-3 cleavage. Given the previously described role of HSP27 in the proteasomal processing of GATA-1, HSP70, and HSP27 thus cooperate in the fine-tuning of terminal erythropoiesis through the regulation of GATA-1 content and activity.¹⁵ Confirming the essential role of HSPs in erythropoiesis, defaults in HSP post-translational modifications and/or in their subcellular localization lead to red blood cell pathologies, as evidenced in myelodysplastic syndromes (MDSs)¹⁹ and in beta-thalassemia major (β-TM).²⁰

Erythroid cell dysplasia observed in MDS is due to a lack of terminal erythropoiesis and increased apoptosis. Frissan et al.¹⁹ demonstrated that a lack of cytosolic-nuclear HSP70 shuttling in MDS erythroblasts leads to GATA-1 cleavage and the subsequent inhibition of differentiation. Targeting this trafficking could serve as a new therapeutic approach in MDS anemia. Similarly, a defect in HSP70 nuclear localization was recently shown to be involved in the ineffective ervthropoiesis observed in β -TM.²⁰ The authors indicated that HSP70 accumulates in the cytoplasm of β -TM erythroblasts to chaperone excess free a-globin chains of hemoglobin, which are characteristic of the disease, and to limit the formation of its toxic aggregates. Thus, GATA-1 is no longer protected and erythroblasts die via apoptosis.

In conclusion, a body of strong evidence supports a role for HSFs and HSPs in hematopoietic cell differentiation (Figure 1). HSF and HSP actions occur at various levels, including (i) the transcription of HSPs and non-HSPs genes, (ii) the protection against proteolysis, and (iii) the regulation of cytosolic/nuclear shuttling of proteins.

However, as we gain insight into the regulation of cell differentiation, new questions arise. First, what is the interplay between the four HSF family members? Second, what is the role of HSPs other than the well-known HSP27. HSP70. and HSP90 proteins? Third, is the expression of other specific transcription factors finely tuned by HSFs either at promoter sites or at newly described intron-located cis-acting elements? The identification of these factors deserves considerable attention, as they are key inducers of cell differentiation.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

- 1. Akerfelt M et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2010; 11: 545-555.
- 2 Lanneau D et al. Prion 2007: 1: 53-60
- 3. Miahed H et al. Exp Cell Res 2012: 318: 1946-1958.
- 4. Vihervaara A, Sistonen L. J Cell Sci 2014; 127: 261-266.
- 5. Page TJ et al. Mol Biosyst 2006; 2: 627-639.
- Mendillo ML et al. Cell 2012; 150: 549-562. 6 Jego G et al. Leukemia 2014; 28: 1676-1686 7
- Trinklein ND et al. Cell Stress Chaperones 2004; 9: 21-28. 8
- 9
- Fujimoto M et al. J Biol Chem 2008; 283: 29961-29970. 10. Inouye S et al. J Biol Chem 2007; 282: 33210-33217.
- 11. Chai RC et al. J Biol Chem 2014; 289: 13602-13614.
- 12 Price JT et al Cancer Bes 2005: 65: 4929-4938
- 13 Twomev BM et al. Clin Exp Immunol 1993; 93: 178-183.
- 14. Didelot C et al. Cell Death Differ 2008; 15: 859-866.
- 15. de Thonel A et al. Blood 2010; 116: 85-96.
- 16. Zermati Y et al. J Exp Med 2001; 193: 247-254.
- 17. Droin N et al. Front Biosci (Landmark Ed) 2009; 14: 2358-2371.
- 18. Ribeil JA et al. Nature 2007: 445: 102-105.
- 19. Frisan E et al. Blood 2012; 119: 1532-1542.
- 20. Arlet JB et al. Nature 2014; 514: 242-246.

Cell Death and Disease is an open-access journal Ð (∞) published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International Licence. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons licence, users will need to obtain permission from the licence holder to reproduce the material. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0



Oncolmmunology



ISSN: (Print) 2162-402X (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/koni20

Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer

Kevin Berthenet, Christophe Boudesco, Ada Collura, Magali Svrcek, Sarah Richaud, Arlette Hammann, Sebastien Causse, Nadhir Yousfi, Kristell Wandherwrick, Laurence Duplomb, Alex Duval, Carmen Garrido & Gaetan Jego

To cite this article: Kevin Berthenet, Christophe Boudesco, Ada Collura, Magali Svrcek, Sarah Richaud, Arlette Hammann, Sebastien Causse, Nadhir Yousfi, Kristell Wandherwrick, Laurence Duplomb, Alex Duval, Carmen Garrido & Gaetan Jego (2016): Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer, Oncolmmunology, DOI: 10.1080/2162402X.2016.1170264

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1170264



View supplementary material C

Accepted author version posted online: 22 Apr 2016.



🖉 Submit your article to this journal 🕑

Article views: 3



View related articles 🖸



View Crossmark data 🗹

Full Terms & Conditions of access and use can be found at http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=koni20

Original Research

Extracellular HSP110 effect on macrophages

Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer

Kevin Berthenet^{1,2}, Christophe Boudesco^{1,2}, Ada Collura ^{3,4}, Magali Svrcek ^{3,4}, Sarah Richaud¹, Arlette Hammann¹, Sebastien Causse^{1,2}, Nadhir Yousfi^{5,6}, Kristell Wandherwrick^{3,4}, Laurence Duplomb ^{7,8}, Alex Duval^{3,4,*}, Carmen Garrido^{1,2,9,*,\$} and Gaetan Jego^{1,2,*,\$}

¹INSERM, LNC UMR866, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer and Laboratoire d'Excellence LipSTIC,, 21000 Dijon, France; ² Univ. Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR866, F-21000 Dijon, France; ³ INSERM, UMR 938, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France; ⁴ Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France; ⁵ EPHE, Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, F-75014, Paris, France ; ⁶ Univ. Bourgogne Franche-Comté, LIIC EA7269, F-21000 Dijon, France ; ⁷Génétique et anomalies du développement, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France; ⁸ Département de Génétique, Hôpital d'enfants, CHU Dijon, F-21000 Dijon, France, ⁹ CGFL, service, F-21000 Dijon, France. ^{*} These authors contributed equally to this work.

^{\$}Correspondence to: Gaëtan Jego or Carmen Garrido, INSERM, UMR866, Université de Bourgogne Franche-Comté, Faculté des Sciences de Santé, 7 boulevard Jeanne D'Arc, 21079 Dijon, France., Tel : (33) 3 80 39 33 45. Fax (33) 3 80 39 34 34. E-mail: <u>gaetan.jego@ubourgogne.fr</u>, E-mail: <u>cgarrido@u-bourgogne.fr</u>

Supplemental Material

[Supplementary Icon] Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

Abstract

HSP110 is induced by different stresses and, through its anti-apoptotic and chaperoning properties, helps the cells to survive these adverse situations. In colon cancers, HSP110 is abnormally abundant. We have recently showed that colorectal cancer patients with microsatellite instability (MSI) had an improved response to chemotherapy because they harbor an HSP110 inactivating mutation (HSP110DE9). In this work, we have used patients' biopsies and human colorectal cancer cells grown in vitro and in vivo (xenografts) to demonstrate that 1) HSP110 is secreted by colorectal cancer cells and that the amount of this extracellular HSP110 is strongly decreased by the expression of the mutant HSP110DE9. 2) Supernatants from colorectal cancer cells overexpressing HSP110 or purified recombinant human HSP110 (LPS-free) affect macrophage differentiation/polarization by favoring a pro-tumor, anti-inflammatory profile. 3) Conversely, inhibition of HSP110 (expression of siRNA, HSP110DE9 or immunodepletion) induced the formation of macrophages with a cytotoxic, pro-inflammatory profile. 4) Finally, this effect of extracellular HSP110 on macrophages seems to implicate TLR4. These results, together with the fact that colorectal tumor biopsies with HSP110 high were infiltrated with macrophages with a pro-tumoral profile while those with HSP110 low were infiltrated with macrophages with a cytotoxic profile, suggest that the effect of extracellular HSP110 function on macrophages may also contribute to the poor outcomes associated with HSP110 expression.

Keywords
heat-shock protein, cancer, macrophage, polarization, toll-like receptors

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a molecularly heterogeneous disease that can be subdivided into several molecular subtypes ¹. Approximately 15 to 20% of CRC harbor widespread microsatellite instability at DNA repeats (MSI) due to mismatch repair deficiency, in contrast to the majority of CRC tumors, which show microsatellite stability (MSS)^{2, 3}. MSI CRCs display particular morphologic features, including greater predilection for the right colon, mucinous histology, low metastatic power and poorer differentiation. They have been consistently reported to show an improved prognosis and a different response to chemotherapeutic agents. The molecular mechanisms of the peculiar MSI CRC pathophysiology have started to be uncovered recently. Notably, we have recently highlighted the important role of heat shock protein-110 (HSP110) ⁴⁻⁶. HSPs are a set of highly conserved proteins whose expression is induced in response to a wide variety of physiological and environmental stresses ^{7, 8}. They are often overexpressed in cancer cells and contribute to cancer resistance and apoptosis ^{9, 10}.

HSP110 is a high molecular weight chaperone that accumulates abnormally in CRC cells and whose expression correlates with metastasis and a poor prognosis ¹¹. We have previously shown that a T_{17} mononucleotide repeat located in intron 8 of HSP110 was systematically mutated in MSI CRC cell lines and primary tumors ⁶. The shortening of this repeat in tumor DNA correlated with the increased synthesis of an aberrant HSP110 transcript due to exon 9 skipping (HSP110DE9) to the detriment of wild-type HSP110 mRNA. MSI patients with large T17 deletions (low HSP110/high HSP110DE9) have significantly longer relapse-free survival (RFS) than those with small T17 deletions (high HSP110/low HSP110DE9) ⁴. Furthermore, RFS in MSI

CRC patients with small T17 deletions (high HSP110 expression/low HSP110DE9) does not seem to differ significantly from that in MSS CRC patients, suggesting a strong dependence of CRC cells on HSP110. In accordance with these clinical data, our in vitro studies have demonstrated that HSP110DE9 acts as a dominant negative mutant that binds to HSP110 wild type, thus impairing its cellular localization and its ability to interact with other chaperones ^{4, 6}. HSP110DE9 completely abrogates HSP110 chaperone activity and its cytoprotective function. In vitro, HSP110DE9 expression sensitized colon cancer cells, in a dose-dependent manner, to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-fluorouracil.

Immune control of tumors is a well-established mechanism involved in the progression of various cancers, including CRC, where tumor-infiltrating lymphocytes correlate inversely with tumor stage ^{12, 13}. Infiltration of activated CD8+ lymphocytes within and around the tumor stroma contributes to a better prognosis. In particular, the number of tumor-infiltrating lymphocytes is higher in MSI CRC than in MSS CRC and, besides HSP110, this may also explain the better prognosis in MSI CRC patients than in MSS CRC patients ¹⁴. Tumor-associated macrophages are also abundant tumor-infiltrating cells. In general, tumor-associated macrophages can be found within or surrounding various tumors, where they either promote tumor progression, angiogenesis, migration of tumor cells and T helper 2 responses (so-called M2 or alternative macrophages), or, conversely, they promote resistance to tumors, inflammatory responses and T helper 1 responses (so-called M1 or classical macrophages) ^{15, 16}. Although macrophages have been found in colorectal tumor sections ^{17, 18}, the correlation of their abundance with the prognosis of MSI neoplasms is not yet clear.

Extracellular HSPs are described as damage-associated molecular pattern proteins (DAMPs) with immunogenic properties. Extracellular HSPs such as HSP27 or HSP70 have been reported to influence immune control of tumors, sometimes through immunosuppressive cells ¹⁹⁻²¹. HSP110 has been described as being able to inhibit immune activation of dendritic cells through scavenger receptor binding ²². However, hardly anything is known about the immune function of HSP110 in cancer. Here, we have addressed the impact of extracellular HSP110 on macrophage profiles in colorectal cancer.

Results

In vivo, in patients and mice, expression of HSP110 in colorectal tumors influences the profile of infiltrating macrophages.

We first determined the presence of macrophages within tumor biopsies from 10 MSI CRC patients, which were selected based on HSP110 expression and divided into two groups: HSP110-low (large T17 deletions, good prognosis patients group, n=5) and HSP110-high (small T17 deletions, poor prognosis group, n=5)⁴ (Figure 1A). We observed a strong invasion of CD68+ macrophages in all tumor samples regardless of the expression of HSP110 at the invasive front (supp Figure 1A) and in the tumor stroma (Figure 1B and sup Figure 1B, p=0.55 (ns), n=5 per group). However, in HSP110 high tumors, compared to HSP110 low tumors, there was a marked increase in macrophages that expressed CD163 (p=0.0025, n=5 per group), a well-described pro-tumoral (M2) macrophage marker (Figure 1B and 1C show the tumor stroma, sup Figure 1A shows the invasive front).

Since a low expression level of HSP110 in MSI CRC cells inversely correlates with the length of the T_{17} mononucleotide repeat located in intron 8 of HSP110, we next used an HCT116 subclone displaying a large HSP110 T17 deletion (HCT116-C22)⁴ to determine the effect of HSP110 on macrophage phenotypes. We first confirmed the very low expression of HSP110 in this HCT116-C22 clone compared with parental HCT116 (Figure 1D). The expression of no other HSPs other than HSP110 seemed altered in HCT116-C22 (Figure 1D). Furthermore, the low expression of HSP110 in the HCT116-C22 clone did not affect HCT116 spontaneous cell death observed when cultured in vitro (sup figure 1C). Tumor xenografts with high or low expression of HSP110 were established by subcutaneously inoculating nude mice with HCT116 or HCT116-C22 cells, respectively. Three weeks after inoculation, xenografts were excised, and the infiltrating macrophages were examined. Immunostaining revealed the presence of F4/80^{pos} macrophages in all tumor slides (figure 1E). Interestingly, whereas the macrophages from parental HCT116 xenografts expressed the M2 marker Arginase-1 (Arg-1), only the low HSP110-expressing HCT116-C22 xenograft strongly expressed inducible NO synthase (iNOS), which is a marker associated with an M1 cytotoxic phenotype (Figure 1E and F). Accordingly, mice xenografted with HCT116-C22 expressed more TNFa mRNA (Figure 1G). These data, both in humans and in mice, suggest that levels of HSP110 in MSI tumors may influence the profile of tumor infiltrating macrophages in vivo.

HSP110 is secreted by colorectal cancer cells and influences macrophage differentiation.

To decipher the mechanism of macrophage polarization observed in the presence or absence of HSP110, we studied the secretome of HCT116 and HCT116-C22. Among the 36 cytokines

analyzed, none were significantly modified (data not shown). In contrast, we observed the presence of a soluble HSP110 in the supernatant of HCT116 but not in the HCT166-C22 supernatant (Figure 2A). The presence of extracellular HSP110 in the supernatant was confirmed by ELISA, where the amount of HSP110 secreted by different colorectal cancer cells was quantified (sup Figure 1D). We thus hypothesized that extracellular HSP110 could be involved in the macrophage infiltration and polarization observed herein. To test this, we studied the effect of supernatants of HCT116 and HCT116-C22 cells on primary human monocytes induced to differentiate into macrophages by M-CSF. As shown in Figure 2B and supp Table 1, supernatants from HCT116-C22, compared to those of HCT116, contributed to the generation of macrophages with stronger expression of HLA-DR, but lower expression of the M2 markers CD163 and CD206. Upon stimulation with LPS, HCT116-C22 supernatants, compared with parental HCT116 supernatants, generated macrophages with higher levels of TNFa mRNA (supp Figure 1E), secreted higher levels of the pro-inflammatory cytokines TNFa and IL1b, and produced higher level of NO (Figure 2C and supp Table 2). Conversely, CCL24, a chemokine associated with the M2 phenotype, was significantly lower. As the ability to stimulate T cell proliferation is a hallmark of pro-inflammatory M1 macrophages, we performed a mixed lymphocyte reaction and observed that more proliferating T cells were generated in the presence of HCT116-C22 supernatant than in the presence of HCT116 supernatant (Figure 2D).

To confirm that this effect on macrophage polarization was HSP110-dependent, we next downexpressed HSP110 using siRNA (supp Figure 2A). Of note, in our experimental conditions, HSP110 knockdown had no effect on cell viability (supp Figure 2B). Lower expression of the M2 markers CD163 and CD206 was observed when supernatants from both HSP110-depleted HCT116 (Figure 2E and supp Table 3) and SW480 cells were used (supp Figure 2C and supp Table 9), compared to the corresponding controls. Accordingly, upon LPS stimulation, higher levels of TNFa (HCT116, Figure 2F and supp Table 4; SW480, supp Figure 2D and supp Table 10) and IL1b (HCT116, Figure 2F) were observed with supernatants of the HSP110-depleted cells.

HSP110DE9 mutant inhibits HSP110 release into the extracellular medium.

HSP110DE9 is an HSP110 deletion mutant, which contains only the 1-381 amino acid ATPdomain of HSP110. It is found in all MSI CRC patients with a good prognosis ⁴. We have previously demonstrated that HSP110DE9 overexpression in CRC cell lines blocks intracellular HSP110 anti-aggregation and anti-apoptotic functions⁶. To study whether HSP110DE9 may also affect extracellular HSP110, we analyzed the supernatants from CRC cells overexpressing HSP110DE9 (GFP-tagged). In parallel, supernatants from the same cells overexpressing HSP110 (GFP tagged) were also tested. Interestingly, while as expected HSP110 overexpression led to an increase in its concentration in the supernatant (Figure 3A), HSP110DE9 expression induced a strong decrease in the amount of HSP110 secreted, without altering the intracellular level of HSP110 (Figure 3B and C), or altering the secretome profile (supp Figure 2E).

In accordance with these variations in secreted HSP110, stronger HLA-DR expression and a decrease in CD206 expression were observed when HSP110DE9 was expressed (Figure 3D and supp Table 5). Conversely, CD163 and CD206 were both significantly increased when HSP110 was overexpressed (Fig 3D). Accordingly, macrophages generated with supernatants from CRC cells that overexpressed HSP110DE9 secreted higher levels of TNFa and had higher levels of

NO than those generated with supernatants from control-GFP or from CRC cells overexpressing HSP110 (Figure 3E and supp Table 6). Finally, more T cells were induced in the presence of the supernatant of cells expressing HSP110DE9 compared to control (Figure 3F).

Altogether, our results suggest that low secretion of HSP110 (either through siRNA-mediated depletion or by expressing the HSP110DE9 mutant) may favor the generation of macrophages with increased pro-inflammatory and cytotoxic functions.

Immunodepletion of HSP110 modulates the pro-inflammatory phenotype of macrophages.

We next studied whether immunodepletion of extracellular HSP110 in the supernatants was enough to switch from the induction of anti-inflammatory macrophages to the induction of macrophages with pro-inflammatory functions. The reduction in extracellular HSP110 (but not other HSPs) after immunodepletion of HSP110 from both HCT116 and SW480 cell supernatants is shown in Figures 4A-B and supp Fig 3A. Macrophages induced to differentiate with the HSP110-immuno-depleted supernatants showed reduced expression of CD163 and CD206, and increased secretion of TNFa and IL1b (Figures 4C and 4D for HCT116, data in suppl tables 7-8, and supp Figures 3B-C for SW480 with data in suppl table 11 and 12). Interestingly, addition of human recombinant HSP110 produced by eukaryotic cells (i.e. LPS free) allows at least a partial recovery of the macrophage phenotypes and TNF α secretion (supp Figure 3D-E). We conclude that HSP110 is an essential component in the extracellular medium for the effect observed on macrophage profiles.

Extracellular HSP110 binds to TLR4 in human monocytes

We previously showed that HSP70 binds to and activates TLR2 on the surface of myeloidderived suppressive cells ¹⁹. To investigate whether the action of extracellular HSP110 on macrophages could also implicate a TLR pathway, we first determined whether its ability to induce the expression of the CD206 macrophage marker was modified in the presence of neutralizing antibodies against TLR2, TLR4 or the scavenger receptor SRA. We found that only neutralizing antibodies against TLR4 significantly reduced the ability of supernatants containing HSP110 to induce CD206 (Figure 5A). Accordingly, when human LPS-free recombinant HSP110 (produced by eukaryotic cells) was added to the cells, co-localization of this extracellular HSP110 with TLR4 was observed (Figure 5B). To confirm the implication of TLR4 in the effect of HSP110 on macrophages, we used TLR4 luciferase reporter cells. We incubated the TLR4-reporter or control cells with either the supernatant of SW480 cells overexpressing HSP110 (where HSP110 was measured by ELISA) or a similar amount of purified HSP110 (600 ng/mL). We found that both sources of HSP110 had a similar effect on TLR4 activation (Figure 5C). Taken together, these results suggest that the effect of extracellular HSP110 in altering the inflammatory profile of macrophages involves TLR4.

Discussion

HSPs are chaperones that are frequently overexpressed in cancer cells. A large body of literature describes how their intracellular function is involved in the increased resistance of tumor cells to cell death notably induced by anti-cancer drugs or hypoxia ^{9, 10}. We recently demonstrated that HSP110 was the main HSP involved in colorectal tumorigenesis. We demonstrated that its expression was directly associated with poor outcomes and that the presence of an HSP110

inactivating mutation was directly associated with a good prognosis of CRC MSI patients ⁶. Interestingly, in these good-outcome patients, there was also an increase in the immune cells infiltrating the tumor ^{14, 23-26}. In this work, we demonstrated that these two events associated with a good CRC prognosis (i.e. HSP110 expression and tumor immunosurveillance) may be linked. Indeed, we showed that HSP110 is secreted by CRC cells and skews the macrophage inflammatory profile. Depletion of extracellular HSP110 by using an antibody or by overexpressing the HSP110DE9 mutant induces macrophages with pro-inflammatory/cytotoxic potential. In contrast, overexpression of HSP110 or the addition of HSP110 recombinant protein (produced in eukaryotes to avoid LPS contamination) favors the formation of macrophages with anti-inflammatory profile. The fact that the recombinant protein did not completely recapitulate the effect observed with colon cancer supernatant suggests that the extracellular HSP110 might act together with unidentified secreted molecules, and/or that the recombinant protein lacks some specific features of the native protein (e.g. percentage of the molecule containing ADP versus ATP and therefore with an open versus closed conformation). We are at present performing structural and proteomic approaches to study in deep this question and determine HSP110 extracellular partners.

Although the way through which HSPs are released into the extracellular medium is still a matter of debate (active versus passive secretion), it is well known that some HSPs are abundant extracellular proteins notably in the tumor microenvironment ²⁷. They are believed to act as DAMPs and to have immunogenic properties ²⁸ and the term chaperokines has been suggested ²⁹. Our results indicating that HSP110 is released by colorectal cancer cells is in agreement with Colgan et al, who reported that soluble HSP110 is a luminal component of the non-malignant human and mouse gastrointestinal tract. Immunohistochemistry showed expression of HSP110 in epithelium from the small and large intestine ³⁰. As in vitro measurements showed low extracellular HSP110 concentrations in MSI-type CRC cell lines, it would be interesting to monitor variations in extracellular HSP110 amounts within body fluids as a new biomarker of disease characterization, or progression.

The anti-inflammatory role of the secreted form of HSP110 in CRC reported here is in agreement with the overall literature about other extracellular HSPs. Indeed, several studies using the immunization of animals with mammalian or mycobacterial HSPs in a context of autoimmune or inflammatory diseases (Arthritis, diabetes...) have shown improvements in animal health, suggesting that HSPs play an immunosuppressive role ³¹. This effect is probably mediated by the direct modulation/inhibition of antigen-presenting cell activation. In this way, recombinant HSP27 has been shown to directly inhibit dendritic cell differentiation and skew towards a macrophage phenotype²¹. Furthermore, these macrophages acquire tolerogenic properties in vitro and in breast cancer patients ²⁰. Similar immunosuppression was observed in higher molecular weight HSPs, like recombinant HSP70, as Ferat-Osio et al showed that highly purified HSP70 inhibits TNFa production by monocytes 32 . It is worth noting that the absence of minute amounts of contaminating endotoxin is mandatory to reveal the inherent suppressive functions of these HSPs, as nicely demonstrated by Stocki 33, 34. This very low level of contamination could account for the maturation effect of recombinant HSP110 on dendritic cells observed by Manjili et al.³⁵. In our setting, we eliminated this caveat as we used an HSP110 naturally present in the supernatant of CRC cell lines, and when we used purified HSP110, it was produced in a eukaryotic setting with no traces of LPS.

In the absence of LPS, extracellular HSPs have been shown to bind to and activate different TLRs. In particular, we have previously shown that HSP70, expressed at the surface of tumorderived exosomes, activated myeloid-derived suppressive cells through its binding to TLR2¹⁹. Concerning circulating HSP27, we and others have shown that it inhibits macrophage and dendritic cell differentiation through TLR4²¹ and it favors angiogenesis through TLR3³⁶. We show here that the anti-inflammatory effect of soluble HSP110 on macrophages involves TLR4. Kuang et al. have shown that TLR4 signaling on monocytes could be deleterious for their adequate activation and differentiation ³⁷. They demonstrated that hyaluronan secreted from tumors binds TLR4 on monocytes, which then become refractory to subsequent stimulation. In addition, depending on the context, NFkB signaling induced upon exposure to TLR2/4 ligand can transmit an anti-inflammatory message in macrophages ³⁸⁻⁴⁰. Finally, IRAK-M, a negative regulator of TLR signaling that can be upregulated in tumor-infiltrating macrophages in a TLR4dependent manner, could interfere with adequate polarization ⁴¹. Taken together, these mechanisms may provide a rationale for the effect observed with HSP110. It is therefore possible that the early presence of HSP110 during the monocyte differentiation process could hamper the subsequent pro-inflammatory function of macrophages, as a signal of a refractory state.

Other HSP-binding receptors have been described over the last few years. Among them, scavenger receptor SRA/CD204 has been described as a receptor for high molecular weight HSPs such as HSP110^{22,42}. Although in our experimental setting this receptor was not involved, other authors have shown that it mediates an inhibitory signal in dendritic cells upon HSP110 stimulation, thus supporting our hypothesis that extracellular HSP110 is deleterious to optimal immune responses. Thus, as suggested by W. Van Eden for other HSP family members, HSP110

should therefore not be considered a DAMP (accordingly to the concept of "danger" introduced by P. Matzinger) but rather as a "DAMPer" of the immune system ⁴³.

Several groups have investigated the nature of the immune infiltrate within tumors of CRC patients. Though all groups agree on the higher Th1 cell colonization, they provide puzzling observations regarding myeloid cells. The presence of CD163+ macrophages in the tumor microenvironment has been described in MSS and MSI CRC biopsies^{18, 44}. Surprisingly, concomitant increases in M1 and M2 subsets were associated with a better prognosis ¹⁷. However, a high expression of PD-L1 (B7-H1), an immune-inhibitory ligand, at the surface of myeloid cells was found at the invasive front and in the stroma of MSI CRC biopsies, suggesting that these cells provide a negative signal to T cells, thus dampening the immune response ^{44, 45}. This paradoxal high expression of PD-L1 could be explained by a negative feedback induced by a strong Th1 cell response and mediated by IFN γ^{46} . This mechanism is intended to avoid tissue and organ damages in non-tumoral conditions, but could be a "double-edge sword" in tumor immunity. Macrophages, therefore, become a cellular target through PD-1/PD-L1 blockage. Such a strategy is currently being investigated in various tumors with mismatch-repair deficiency, including CRC, with encouraging results ⁴⁵. Several other immune inhibitory checkpoints (B7-H4, PD-1, CTLA-4, IDO and LAG-3) have been described in MSI CRC biopsies and all together play a major role in inhibiting tumor immune-surveillance^{44, 47}. Given that HSP110 low expression level favors a pro-inflammatory environment through macrophage polarization, the existence of a negative feedback involving these immune inhibitory checkpoints expression is worth investigating. We have just started a multicenter study including more than 3000 colorectal cancer biopsies already characterized for HSP110 expression⁴ to answer this question.

Studies on the tumor immune microenvironment have distinguished between CRC patients only on the basis of microsatellite stability (i.e. MSS versus MSI). However, we have recently shown that HSP110 expression is a strong and reliable marker to distinguish between MSI CRC patients with good and poor prognosis. In terms of outcomes, MSI CRC patients expressing high levels of HSP110 are probably no different from MSS CRC patients. Here, we showed that these patients with high HSP110 have a greater invasion of CD163+ macrophages than is the case in MSI patients with low HSP110 expression. Based on these results, we have started a clinical study to determine whether a correlation exists between CD163+ macrophages, HSP110 and survival. It also remains to be established whether an association exists between CD163+ cells and lymphocyte infiltration, as this is a well-established predictor of overall survival and relapse in CRC ¹².

In recent years, HSP110 has become a new point of interest in the field of HSP and cancer, mainly thanks to its excellent chaperoning capacity of peptide antigens, which makes it a powerful tool for vaccine development ^{48, 49}. Until our recently published works demonstrating the essential role of HSP110 in CRC, its role in tumor development remained almost unexplored. This study brings new information to the emerging role of extracellular HSP110 in the inhibition of the immune system in the context of tumor microenvironment. It confirms the necessity to target extracellular as well as intracellular HSP110 in CRC and should foster the development of specific inhibitors, which are urgently needed for this HSP.

Materials and methods

Cell culture and macrophage differentiation

CRC cell lines (HCT116 and SW480) were purchased from ATCC (Molsheim, France). The C22 subclone derived from the HCT116 cell line has previously been described (reference 4). All cell lines were cultivated in DMEM supplemented with 10% FBS (Lonza, Amboise, France). Monocytes from human peripheral blood were obtained from healthy donors with informed consent and purified using CD14 microbeads labeling and magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec, Paris, France) following the manufacturer's instructions. 0.5x10⁶ monocytes were incubated with 500 µL of CRC cell line supernatant for 72h in a 24-well plate in the presence of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, 100 ng/mL, Miltenyi Biotec) and then characterized. To analyze secreted cytokines, macrophages were incubated for an additional 24h in the presence of LPS (10ng/mL). In some experiments, recombinant HSP110 produced in HEK293 cells (OriGene Technologies, Rockville, MD) was added to the culture at 600 ng/mL. For receptor blocking experiments, isolated CD14+ monocytes (5.10⁵) were preincubated for 30 min with antibodies directed against TLR2 (5µg; MAB2616, R&D systems, Minneapolis, USA), TLR4 (10µg; AF1478, R&D systems) or SR-A (10µg; AF2708, R&D systems).

CRC Supernatant preparation

 2.5×10^5 HCT116 or HCT116-C22 were cultured in a 12-well plate for 72h in DMEM supplemented with 10% FBS. The supernatant was then harvested and centrifuged at 450 g for 5 minutes. For immunoblot experiments, the culture medium was replaced after 72 h of culture by DMEM w/o serum for an additional 8h and then concentrated using Amicon Ultra centrifugal

filters (UFC501096, Merck Millipore, Molsheim, France) according to the manufacturer's instructions.

siRNA and Cell transfection

For plasmid transfection, 1.2×10^5 SW480 or 2.5×10^5 HCT116 were implanted and cultured in a 12-well plate for 24h. Cells were then transfected with 1µg of plasmid encoding GFP, GFP-HSP110 or GFP-HSP110DE9 using HP Xtreme gene DNA transfection reagent (Roche, Boulogne-Billancourt, France) according to the manufacturer's instructions. 48h hours later, the supernatant was collected and centrifuged at 450g for 5 minutes. For immunoblotting, the culture media were replaced after 48h of transfection with DMEM w/o serum for an additional 8h and then concentrated using Amicon Ultra centrifugal filters (UFC501096, Merck Millipore) according to the manufacturer's instructions.

For siRNA transfection, 2.5x10⁵ SW480 or 0.5x10⁶ HCT116 cells were seeded into a 6-well plate and cultivated for 24h in DMEM 10% SVF. Cells were then transfected with 50 pmol of control siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, D-001810-10-05) or HSP110 siRNA (ON-TARGETplus HSPH1 siRNA, L-004972-00-0005) from Dharmacon (GE Heathcare, Velizy, France), with Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. The media were replaced after 6h of incubation with transfection reagent and 24h after transfection. Media were then collected 72h after transfection and centrifuged at 450g for 5 minutes.

Xenograft model

Nude mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, USA) and housed in specific pathogen-free conditions. 10x10⁶ HCT116 or HCT116-C22 were injected s.c. into the right flank of each mouse. Tumor growth was then followed every other day for 3 weeks. Mice were sacrificed when tumors reached 800mm³. The tumors were collected and included in Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA). The mice were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie, France.

Flow cytometry analysis

Macrophages were harvested, washed once in PBS and incubated for 20 min with antibody directed against HLA-DR (561224, BD Horizon), CD163 (556018, BD Bioscience) and CD206 (550889, BD Biosciences) at 4°C. Cells were then washed twice in PBS and analyzed using a LSRII flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). For apoptosis determination, adherent and non-adherent cells were harvested and stained with Annexin V-FITC and 7-AAD (BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Immunodepletion

 1.2×10^5 SW480 or 2.5×10^5 HCT116 were seeded and cultivated for 24h in a 12-well plate. Cells were washed, and 400µL of media without serum was then added for 8 hours. Supernatants were then harvested and centrifuged at 450g for 5 minutes. One ml of supernatant was then incubated overnight at 4°C under rotation with 2µg of control antibody (sc-2027, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) or directed against HSP110 (sc-6241, Santa Cruz Biotechnology). 25µL of Protein A-agarose beads (Millipore, Billerica, MA) were added for 1h30 under rotation at 4°C. Supernatants were collected and stored at -20°C. Prior to incubation with monocytes, the immunodepleted supernatant was supplemented with FBS (to a final concentration of 10%). For immunoblot experiments, beads bound to HSP110 were washed 3 times with PBS and heated for 5 minutes at 95°C in laemmli buffer.

T lymphocyte proliferation assay

T Lymphocytes from peripheral blood of healthy donors were purified using the pan T-Cells isolation kit (Miltenyi Biotec). T lymphocytes were then stained by using Cell Trace Violet (Invitrogen), according to the manufacturer's procedure. 10^5 T cells were then incubated for 3 days with $10x10^3$ or $20x10^3$ macrophages. T-cell division was detected by flow cytometry with an LSRII cytometer (BD Biosciences) and analyzed using ModFit software.

Cytokine and NO quantification

Cytokine secretion by macrophages upon LPS stimulation was determined using the MILLIPLEX MAP Kit "Human high sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel (HSTCMAG-28SK, Millipore, Billerica, MA) according to the manufacturer's instructions. Cytokines secreted by CRC cell lines were analyzed using the Human Cytokine Array Panel A according to the manufacturer's instructions (ARY005, R&D Systems). NO production was evaluated through nitrite measurement using The Griess Reagent System (Promega, Madison, WI).

Cell lysis and Immunoblotting

Cells were harvested, washed in PBS and then lysed on ice in lysis buffer (150mM NaCl, 50 mM Tris pH 6,8, 10 mM NaF, 1mM DTT, 1% Triton X-100) in the presence of protease inhibitors (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Cell lysates or concentrated culture media were mixed

with laemmli buffer. Proteins were separated and transferred following standard protocols before analysis with a chemiluminescence detection kit (Santa Cruz Biotechnology). Primary antibodies used for immunoblotting were from Santa Cruz biotechnologies directed against HSP110 (sc-6241), HSC70 (sc-7298), from Sigma (Lyon, France) for anti-actin (A1978-200UL), from abcam (Paris, France) for anti-HSP90α (ab59459) and from Enzo Life Sciences (Lyon, France) for anti-HSP70 (ADI-SPA-810) and anti-HSP27 (ADI-SPA-803).

Immunofluorescence

Tumor sections from the xenograft were fixed for 10 min in cold acetone. Slides were dried and rehydrated in PBS for 5 min twice. Slides were then saturated for 20 min in 3% BSA and 2% goat serum in PBS. Slides were incubated overnight at 4°C with (1:100) primary antibody directed against Arginase-1 (sc-20150, Santa Cruz Biotechnology) or NOS2 (sc-651, Santa Cruz Biotechnology), and F4/80 (MCA4971, AbD Serotec, Colmar, France). Slides were washed three times for 5 min in PBS and incubated for 10 min with a blocking reagent (R37107, molecular probes, Saint Aubin, France). (1:1000) Secondary antibodies (Invitrogen) were added for 45 min at room temperature. Slides were washed 3 times in PBS for 5 min and mounted with ProLong (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Isolated CD14+ monocytes were incubated for 30 min in 10% RPMI with HSP110-Flag recombinant protein (500 ng / 5.10⁵ monocytes). Cells were washed once and incubated for 30 min at room temperature with (1:100) primary antibodies directed against TLR4 (sc-30002, Santa Cruz Biotechnology) and Flag (F1804-1MG, Sigma). Cells were washed once in PBS and fixed for 10 min in 4% PFA PBS. Cells were washed and (1:1000) secondary antibodies

(invitrogen) were added for 30 min at room temperature. Monocytes were deposited on polylysine coated coverslips for 20 min at RT. Coverslips were washed twice in PBS and mounted with ProLong (Sigma).

The TLR4 luciferase reporter gene assay was performed by InvivoGen (Toulouse, France).

Immunohistochemistry

MSI CRC patients were selected as previously described ⁴. Tumor sections from patients were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded series of alcohol solutions. Antigens were then unmasked in pH 6.0 citrate buffer (30 min, 95°C), cooled for 30 min, washed twice in PBS for 3 min and treated with 3% H₂0₂-PBS for 15 min in order to inhibit endogenous peroxidases. After washes in PBS, the slides were saturated for 25 min in 3% BSA PBS. Sections were then incubated with CD68 (1/100, M0814, Dako, Les Ulis, France), CD163 (1/100, NCL-CD163; Leica, Nanterre, France) or HSP110 (1/1200, clone 5812, Leica Biosystems) primary antibody overnight at 4°C (CD68, and CD163) or 1 h at room temperature. After washing in PBS, secondary antibody was added for one hour at room temperature. Slides were washed twice for 5 min in PBS and revealed using Novared kit (Vector, Burlingame, USA). Slides were washed twice in water for 5 minutes and counterstained with 10% Meyer's hematoxylin. After one wash in water, slides were dehydrated in 100% ethanol and in xylene for 30 sec each. The slides were then observed using the Cell Observer station (Zeiss, Germany). Positive cells were counted in three distinct stroma areas of 645µM by 482µM for each tumor in a blinded manner.

Quantitative real-time PCR.

Total RNA was isolated with Trizol (Invitrogen), reverse transcribed by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) with random hexamers (Promega). Primers for real-time PCR were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA): Human TNFa (qHsaCED0037461), murine TNFa (qMmuCED0004141), murine Arginase-1 (qMmuCID0022400) and murine iNOS (qMmuCID0023087). HPRT was used as the invariant control (qMmuCED0045738 or qHsaCID0016375).

ELISA

HSP110 concentration was determined by an ELISA. Briefly, a 96-well plate (MaxiSorp Plate; Nunc, Sigma Aldrich, Australia) was coated with 0.2 M sodium carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.4, overnight at 4°C with 3 µg/mL of rabbit anti-HSP110 Ab (sc-6241, Santa Cruz Biotechnology). The plates were washed and then blocked with 2% BSA in PBS for 1h at room temperature. Supernatants were diluted and added to the plates along with recombinant HSP110 produced in HEK293 cells (OriGene Technologies, Rockville, MD) to establish a standard concentration curve. The plates were then incubated 2h at room temperature, washed 3 times in PBS 0.5% Tween 20, and incubated for 2h with a mouse anti-HSP110 Ab (1:200)(NCL-HSP105, Leica Biosystems). After 3 washes as before, the plates were incubated for 1h with a Goat antimouse IgG conjugated to alkaline phosphatase (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama). After 3 final washes, The ELISA was developed by adding a TMB substrate reagent (OptEIA, BD Biosciences, San Jose, CA). The reaction was stopped after 30 min by adding 2M sulfuric acid. ODs were measured at 450 nm. HSP27 secreted by CRC cell lines was detected using the Immunoset HSP27 high sensitivity (Human) ELISA according to the manufacturer's instructions (ADI-960-076, Enzo life sciences, Farmingdale, NY).

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Statistics

Analyses were performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, Calif). The Student paired *t* test was used where appropriate and a 2-tailed *P* value of .05 or greater was considered significant.

Abbreviations

CRC, Colorectal Cancer; MSS, Microsatellite Stability; MSI, Microsatellite Instability; HSP, Heat Shock Protein; M-CSF, Macrophage Colony-Stimulating Factor; IL-1β, Interleukin-1β; TNF-α, Tumor Necrosis Factor-α; NO,Nitric Oxide; CCL24, Chemokine (C-C motif) Ligand 24; DAMPs, Damage Associated Molecular Patterns; SR-A, Scavenger Receptor-A; TLR, Toll Like Receptor.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Institut National du Cancer, Agence Nationale de la Recherche, Ligue Nationale Contre le Cancer ('Labeled teams' to CG and AD), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Conseil Regional de Bourgogne. The work was also supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx. We thank the FEDER for their financial support. K.B. and S.C. have a doctoral fellowship from La Ligue Nationale Contre le Cancer and K.B. from La Foundation pour la Recherche Médicale.

References

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science 1993; 260:812-6.

2. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 1993; 363:558-61.

3. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 1993; 260:816-9.

4. Collura A, Lagrange A, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Guilloux A, et al. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. Gastroenterology 2014; 146:401-11 e1.

5. Duval A, Collura A, Berthenet K, Lagrange A, Garrido C. Microsatellite instability in colorectal cancer: time to stop hiding! Oncotarget 2011; 2:826-7.

6. Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. Nat Med 2011; 17:1283-9.

 Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. Nat Rev Mol Cell Biol 2013; 14:630-42.

8. Doyle SM, Genest O, Wickner S. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. Nat Rev Mol Cell Biol 2013; 14:617-29.

9. Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. Cancer Lett 2013; 332:275-85.

10. Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. Arch Toxicol 2013; 87:19-48.

 Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, Garajova I, Fabian P, Hrstka R, et al. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. Oncol Rep 2009; 21:1235-41.

12. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 2006; 313:1960-4.

13. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. Cancer Res 2011; 71:1263-71.

14. Boissiere-Michot F, Lazennec G, Frugier H, Jarlier M, Roca L, Duffour J, et al. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-instable colorectal cancer. Oncoimmunology 2014; 3:e29256.

15. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity 2014; 41:14-20.

16. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. Immunity 2014; 41:49-61. 17. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegard J, Oberg A, Oldenborg PA, et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. PLoS One 2012; 7:e47045.

18. Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. Clin Cancer Res 2007; 13:1472-9.

19. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. J Clin Invest 2010; 120:457-71.

20. Banerjee S, Lin CF, Skinner KA, Schiffhauer LM, Peacock J, Hicks DG, et al. Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. Cancer Res 2011; 71:318-27.

21. Laudanski K, De A, Miller-Graziano C. Exogenous heat shock protein 27 uniquely blocks differentiation of monocytes to dendritic cells. Eur J Immunol 2007; 37:2812-24.

22. Qian J, Yi H, Guo C, Yu X, Zuo D, Chen X, et al. CD204 suppresses large heat shock protein-facilitated priming of tumor antigen gp100-specific T cells and chaperone vaccine activity against mouse melanoma. J Immunol 2011; 187:2905-14.

23. Deschoolmeester V, Baay M, Van Marck E, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F, et al. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. BMC Immunol 2010; 11:19.

24. Banerjea A, Ahmed S, Hands RE, Huang F, Han X, Shaw PM, et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. Mol Cancer 2004; 3:21.

25. Phillips SM, Banerjea A, Feakins R, Li SR, Bustin SA, Dorudi S. Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. Br J Surg 2004; 91:469-75.

26. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, Bindea G, et al. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. Cancer Res 2015; 75:3446-55.

27. Sherman M, Multhoff G. Heat shock proteins in cancer. Ann N Y Acad Sci 2007; 1113:192-201.

28. Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. J Innate Immun 2010; 2:238-47.

29. Asea A. Chaperokine-induced signal transduction pathways. Exerc Immunol Rev 2003; 9:25-33.

30. Colgan SP, Pitman RS, Nagaishi T, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mayer LF, et al. Intestinal heat shock protein 110 regulates expression of CD1d on intestinal epithelial cells. J Clin Invest 2003; 112:745-54.

31. van Eden W, van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. Nat Rev Immunol 2005; 5:318-30.

32. Ferat-Osorio E, Sanchez-Anaya A, Gutierrez-Mendoza M, Bosco-Garate I, Wong-Baeza I, Pastelin-Palacios R, et al. Heat shock protein 70 down-regulates the production of toll-like receptor-induced pro-inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element-binding factor-dependent mechanism. J Inflamm (Lond) 2014; 11:19.

33. Stocki P, Dickinson AM. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. Autoimmune Dis 2012; 2012:617213.

34. Stocki P, Wang XN, Dickinson AM. Inducible heat shock protein 70 reduces T cell responses and stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells. J Biol Chem 2012; 287:12387-94.

35. Manjili MH, Park J, Facciponte JG, Subjeck JR. HSP110 induces "danger signals" upon interaction with antigen presenting cells and mouse mammary carcinoma. Immunobiology 2005; 210:295-303.

36. Thuringer D, Jego G, Wettstein G, Terrier O, Cronier L, Yousfi N, et al. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. Faseb J 2013; 27:4169-83.

37. Kuang DM, Wu Y, Chen N, Cheng J, Zhuang SM, Zheng L. Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. Blood 2007; 110:587-95.

38. Mancino A, Lawrence T. Nuclear factor-kappaB and tumor-associated macrophages. Clin Cancer Res 2010; 16:784-9.

39. Fong CH, Bebien M, Didierlaurent A, Nebauer R, Hussell T, Broide D, et al. An antiinflammatory role for IKKbeta through the inhibition of "classical" macrophage activation. J Exp Med 2008; 205:1269-76.

40. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, et al. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. Cell 2007; 130:918-31.

41. del Fresno C, Otero K, Gomez-Garcia L, Gonzalez-Leon MC, Soler-Ranger L, Fuentes-Prior P, et al. Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. J Immunol 2005; 174:3032-40.

42. Facciponte JG, Wang XY, Subjeck JR. Hsp110 and Grp170, members of the Hsp70 superfamily, bind to scavenger receptor-A and scavenger receptor expressed by endothelial cells-I. Eur J Immunol 2007; 37:2268-79.

43. Broere F, van der Zee R, van Eden W. Heat shock proteins are no DAMPs, rather 'DAMPERs'. Nat Rev Immunol 2011; 11:565; author reply

44. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. Cancer Discov 2015; 5:43-51.

45. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N Engl J Med 2015; 372:2509-20.

46. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol 2008; 8:467-77. 47. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, et al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. J Exp Med 2006; 203:871-81.

48. Wang XY, Subjeck JR. High molecular weight stress proteins: Identification, cloning and utilisation in cancer immunotherapy. Int J Hyperthermia 2013; 29:364-75.

49. Mattoo RU, Sharma SK, Priya S, Finka A, Goloubinoff P. Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates. J Biol Chem 2013; 288:21399-411.



Figure 1: Pro-tumoral macrophages invade tumor bed in CRC expressing high levels of HSP110 (HSP110 ^{high}) **A**, **B** Expression of HSP110 (A), CD68 and CD163 (B) by IHC in stroma of tumor samples from MSI CRC patients belonging to the HSP110 ^{high} and HSP110 ^{low} groups described by Collura et al (reference 4). One representative image is shown (n=5) Brown color indicates positive staining (200x magnification for A, scale bars, 50 μ m. 100x magnification for B, scale bars, 100 μ m). C) Number of CD163 macrophages in tumors biopsy stroma was determined (p=0.0025, n=5)(value for each patient was determined as the average number of stained cells in 3 distinct sections. D) Indicated HSPs were analyzed by Immunoblot in HCT116 and HCT116-C22 cells. HSC70 was used as a loading control. E) Expression of F4/80, iNOS and Arginase by IHC from tumor sections of mice xenografted with HCT116 or HCT116-C22 (One image

representative of 6 mice in each group, 20x magnification, scale bars 40 μ m). (F, G) qPCR analysis of Arginase, iNOS mRNA (F) and TNFa (G) from tumor sections of mice xenografted with HCT116 or HCT116-C22. **, p<0.01, ***, p<0.005



Figure 2. HSP110 is secreted by CRC cell lines and influences macrophage differentiation profile. A) Immunoblot analysis of HSP110 in the supernatant of HCT116 and HCT1166-C22 cells. Extracellular HSP90 is used here as a loading control. B) Differentiating macrophages in the presence of HCT116 or HCT116-C22 supernatants were assessed for the expression of HLA-DR (n=7), CD163 (n=5), and CD206 (n=5) by flow cytometry. Results are expressed as mean fluorescence ratio *, p<0.05 ; ***, p<0.005 ; Left, data of all experiments; Right, representative data. C) Monocytes induced to differentiate in the presence of HCT116 or HCT116-C22 supernatants were stimulated for 24h with LPS. TNFa (n=3), IL1b (n=3), CCL24 (n=4) and NO (n=4) secreted by macrophages were determined by Milliplex assay *, p<0.05 ; ***, p<0.01 . D) Percentage of proliferating allogeneic T cells after 3 days of culture with macrophages derived

from monocytes in the presence of control DMEN medium or supernatants from HCT116 or HCT116-C22 cells (n=3), *, p<0.05. E, F) Monocytes were induced to differentiate into macrophages in the presence of supernatant from HCT116 cells either transfected with a HSP110 siRNA or a scrambled control. Expression of CD163 (n=5), and CD206 (n=5) was determined by flow cytometry (E). F, TNFa and IL1b from macrophages derived from monocytes in the presence of supernatants as in E, and stimulated for 24h with LPS. (n=3) *, p<0.05; **, p<0.01



Figure 3. HSP110DE9 hampers HSP110 release A) Concentration of extracellular HSP110 in the supernatant of Lovo, HCT116 and SW480 transfected with a control GFP plasmid or a plasmid coding HSP110-GFP and measured by ELISA (n=3) *, p<0.05; **, p<0.01. B) ELISA quantification of HSP110 in the extracellular medium of SW480 transfected with a control GFP or HSP110DE9-GFP plasmid. (n=3) *, p<0.05. C) Immunoblot analysis of HSP110 in the supernatant of HCT116, transfected with a HSP110-GFP plasmid with or without a plasmid coding HSP110DE9-GFP. D) Flow cytometry analysis of HLA-DR (n=6), CD163 (n=6), and CD206 (n=6) expression on macrophages derived from monocytes in the presence of supernatant

from SW480 cells transfected with a control GFP, HSP110-GFP or a HSP110DE9-GFP plasmid. Left, data of all experiments; Right, representative data *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. E), TNFa, and NO (nitrite) secreted by macrophages derived from monocytes in the presence of SW480 transfected as in C, and stimulated for 24h with LPS (n=4, *, p<0.05). F) Percentage of proliferating allogeneic T cells after 3 days of culture with 10⁴ macrophages derived from monocytes in the presence of supernatant from SW480 transfected with a control GFP or a HSP110DE9-GFP (n=3). *, p<0.05.




Figure 4. Depletion of HSP110 from the supernatants skews the pro-inflammatory phenotype of macrophages. A) Immunoblot analysis of HSP110 from the immunoprecipitated (IP) fraction of HCT116 supernatant (one image representative of three). B) ELISA determination of HSP110 amount in the supernatant of SW480 or HCT116 before (black columns) and after (white columns) HSP110 immunoprecipitation. C), Expresssion of HLA-DR (n=5), CD163 (n=5), and CD206 (n=4) by flow cytometry on macrophages derived from monocytes in the presence of HSP110-depleted HCT116 supernatant. Left, data of all experiments; Right, representative data *, p<0.05; **, p<0.01. D, TNFa, and IL1b secreted by macrophages derived from monocytes in the presence of HSP110-depleted HCT116-depleted HCT116 supernatant, and stimulated for 24h with LPS (n=4) *, p<0.05.



Figure 5. Extracellular effect of HSP110 on macrophage profile involves TLR4. A) The percentage of HSP110-induced CD206-expressing differentiated macrophages in the presence or absence of SRA, TLR2 and/or TLR4 neutralizing antibodies was determined by flow cytometry. Data are expressed as a percentage of the control (no neutralizing Ab added)(n=6, *, p<0.05.). B) Fluorescence microscopy analysis of TLR4 and DDK(FLAG)-tagged HSP110 purified from eukaryotic cells (LPS free) on monocytes after 30 min of incubation with HSP110. One representative image is shown. Scale bars 10 μ m. C) TLR4 gene reporter assay (luciferase) using control HSP110-depleted supernatant, supernatant from HSP110-overexpressing HCT116 cells or a similar amount (600 ng/ml) of purified recombinant LPS-free HSP110 (n=2). *, p<0.05.

www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation

K Berthenet^{1,2,9}, A'dem Bokhari^{3,4,9}, A Lagrange^{3,4}, G Marcion^{1,2}, C Boudesco^{1,2}, S Causse^{1,2}, A De Thonel⁵, M Svrcek^{3,4}, AR Goloudina^{1,2}, S Dumont⁶, A Hammann^{1,2}, DS Biard⁷, ON Demidov^{1,2}, R Seigneuric^{1,2}, A Duval^{3,4}, A Collura^{3,4,9}, G Jego^{1,2,9} and C Garrido^{1,2,8,9}

Heat shock protein 110 (HSP110) is induced by different stresses and, through its anti-apoptotic and chaperoning properties, helps cells survive these adverse situations. In colon cancers, HSP110 is abnormally abundant. We have recently shown that colorectal cancer patients with microsatellite instability (MSI) had an improved response to chemotherapy because they harbor an HSP110-inactivating mutation (HSP110DE9). In this work, we used patient biopsies, human colorectal cancer cells grown *in vitro* and *in vivo* (xenografts), and intestinal crypts to demonstrate that HSP110 is also involved in colon cancer growth. We showed that HSP110 induces colon cancer cell proliferation and that this effect is associated with STAT3 activation, specifically an increase in STAT3 phosphorylation, nuclear translocation and transcription factor activity. STAT3 inhibition blocks the proliferative effect of HSP110. From a molecular standpoint, we demonstrated that HSP110 directly binds to STAT3, thereby facilitating its phosphorylation by JAK2. Finally, we showed a correlation between HSP110 expression and STAT3 phosphorylation in colon cancer patient samples. Thus, the expression of HSP110 in colon cancer contributes to STAT3-dependent tumor growth and the frequent inactivating mutation of this chaperone is probably an important event underlying the improved prognosis in colon cancer displaying MSI.

Oncogene advance online publication, 7 November 2016; doi:10.1038/onc.2016.403

INTRODUCTION

Cancer cells have a strong need for chaperones such as heat shock protein-110 (HSP110, also called HSP105 or HSPH1) because they have to rewire cell metabolism.^{1,2} HSP110 is a molecular chaperone with anti-aggregation properties and, through its interaction with HSP70, participates in the correct folding of newly synthesized or misfolded proteins.^{3–6} HSP110 can be induced by different stresses and helps the cell to survive these stressful situations, notably though its anti-apoptotic properties.

We have recently demonstrated that colorectal cancers displaying microsatellite instability (MSI) due to mismatch repair deficiency harbor a loss-of-function mutation in the HSP110 gene.^{4,7,8} As a result, and to the detriment of the wild-type HSP110 protein, they express a truncated form of HSP110 called HSP110DE9, which acts as an endogenous HSP110 inhibitor. HSP110DE9 acts as a dominant-negative mutant that binds to HSP110 (1:1), thereby inhibiting the chaperone effect in cancer cells. We have demonstrated in a multicenter study that the expression of this dominant-negative mutant is associated with an excellent response to chemotherapy (i.e., survival).⁷

The tumorigenic function of intracellular HSP110 can be explained not only by its cytoprotective properties (e.g. antiapoptotic) but also through its function as a molecular chaperone for other proteins or RNAs.^{9,10} HSP110 has also been shown to affect the Wnt/ β -catenin pathway. It has recently been shown that HSP110 is needed for Wnt-induced target gene transcription.¹¹

HSP110 has also been shown to be secreted into the extracellular medium and has immune properties. In inflammatory bowel diseases, HSP110 has been shown to be an abundant soluble luminal component of the gastrointestinal tract.¹² More recently, we have demonstrated that cancer cells secrete HSP110 to promote macrophage polarization towards a procancer (inflammatory) phenotype.¹³ In contrast, inhibition of HSP110 promotes macrophage polarization towards a cytotoxic phenotype. This could explain why MSI colon cancers that express high amounts of HSP110DE9 and have a good prognosis are also associated with an abundance of cytotoxic immune cells.¹⁴

Given the recently reported physiological role of HSP110 in colonic mucosa,^{12,15} an important question that needs to be addressed is whether HSP110 also plays a role during colon cancer development. In this work, we explored the effects of the loss of HSP110 or the expression of the HSP110 inhibitor HSP110DE9 in colon cancer cell growth *in vitro*, *ex-vivo* in intestinal crypts and *in vivo*. We demonstrated that HSP110 promotes cell growth and that this effect involves the ability of HSP110 to induce the activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). We have also validated in microsatellite-unstable colorectal cancer patients expressing different amounts of the HSP110 inhibitor HSP110DE9 that HSP110 and P-STAT3 could act as a combined marker for a poor prognosis in these patients.

¹INSERM, UMR866, Université de Bourgogne Franche-Comté, Faculté des Sciences de Santé, Dijon, France; ²INSERM, LNC UMR866, Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Dijon, France; ³INSERM, UMR 938, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France; ⁴Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France; ⁵CNRS, UMR7216 Epigenetics and Cell Fate, Paris, France; ⁶AP-HP, Hôpital St Antoine; Service d'Anatomie Pathologique, Paris, France; ⁷Centre d'Etude Atomique, Paris, France and ⁸CGFL, Dijon, France. Correspondence: Dr G Jego or Dr C Garrido, INSERM, UMR866, Université de Bourgogne Franche-Comté, Faculté des Sciences de Santé, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon 21079, France.

E-mail: gaetan.jego@u-bourgogne.fr or cgarrido@u-bourgogne.fr

⁹These authors contributed equally to this work.

Received 24 March 2016; revised 9 September 2016; accepted 23 September 2016

silencing did not alter cell viability (Supplementary Figure 1B) and *in vivo* HSP110 depletion was observed throughout the xenograft experiment (Supplementary Figure 1C). We observed a marked decrease in tumor growth in the xenografts derived from both HCT116 and SW480 cells when HSP110 was depleted compared

RESULTS

HSP110 induces colon cancer cell proliferation *in vivo* and *in vitro* Human SW480 (MSS) and HCT116 (MSI) colon cancer cell lines were depleted of HSP110 with specific shRNAs and injected into nude mice (Figure 1a and Supplementary Figure 1A). HSP110



with controls (scrambled shRNA) (Figures 1a and b). Similar results were obtained when we inactivated HSP110 through the expression of the dominant-negative mutant HSP110DE9. The over-expression of HSP110DE9 induced a decrease in the size of the xenografts comparable to that obtained with HSP110 shRNA (Figure 1c). Whereas tumor cell viability determined by active caspase 3 staining was similar in the xenografts inactivated or not for HSP110 (i.e. less than 5% caspase 3-positive cells; Figure 5d), a difference in the number of cells expressing the proliferation marker KI67 was observed. Indeed, while in control or HSP110 expressing xenografts (at day 16) almost all cells were positive for Ki67 (94% \pm 4, n = 3), in the xenografts expressing the HSP110 inhibitor HSP110DE9 no more than 60% of Ki67-positive cells $(54 \pm 6, n = 3)$ were found (Figure 1d). This result prompted us to explore the effect of HSP110 on tumor cell proliferation. In vitro, expression of HSP110 increased the total number of cells (Figure 1e). This increase was a consequence of a higher cell cycle rate as shown by cell trace dilution (Figures 1f and g) and by the higher number of cells in the S-phase (Figures 1h and i). Accordingly, proliferation increase was limited by the expression of HSP1190DE9 (Figures 1f-i).

The proliferative effect of HSP110 involves STAT3 activation

STAT3 is a well-described pathway involved in colon cancer cell proliferation.^{16,17} We determined the expression of 34 known target genes of the STAT3 pathway within a transcriptome analysis of SW480 cells overexpressing HSP110 compared with controltransfected cells (Supplementary Figure 2A). In this panel of 34 genes, we observed an increase in the expression of 26, suggesting the involvement of the STAT3 pathway. To study the implication of STAT3 in the proliferative effect of HSP110, we first used the specific STAT3 inhibitor AG490. As shown in Figure 2a, AG490, at doses that did not induce cell death (Supplementary Figure 2B), induced a dose-dependent reduction in the proportion of S-phase cells induced by HSP110 and in the ability of HSP110 to increase the expression of STAT3 downstream genes such as c-Myc and Cyclin D1 (Figure 2a). Furthermore, as shown in Figure 2b, HSP110 was able to induce STAT3 phosphorylation in a dose-dependent manner, though the amount of total STAT3 remained unchanged. This HSP110-induced activation of STAT3 was further demonstrated by showing its ability to induce both an increase in the amount of P-STAT3 in the nucleus (Figure 2c) and in the transcription of STAT3 target genes such as MYC or MCL1 (Figure 2d).

To confirm the implication of HSP110 in STAT3 activation, in these HSP110-overexpressing cells where we observed STAT3 activation, we inhibited HSP110 by using increasing amounts of the dominant-negative mutant HSP110DE9. As shown in Figure 3a, HSP110DE9 inhibited HSP110-induced phosphorylation of STAT3. Similarly, HSP110DE9 inhibited HSP110-induced STAT3 transcriptional activity as demonstrated by inhibition of the

3

expression of the P-STAT3 target genes c-Myc, Mcl1 and $\mathrm{Bcl}_{\mathrm{XL}}$ (Figure 3b).

Endogenous HSP110 levels determine a cell's proliferative and P-STAT3 status *in vivo* and *in vitro*

To study the proliferative effect of HSP110 and its relationship with STAT3 phosphorylation *in vivo* in a more physiological model, we selected two sub-clones of the MSI colon cancer cell line HCT116, which express either high or low levels of endogenous HSP110 (because they bear either a small or a large deletion in the T17 satellite sequence of HSP110⁷). These two clones have similar cell viability in the absence of an external insult.¹³ HSP110 levels in these clones correlated with the levels of P-STAT3 (Figure 4a) and with cell proliferation *in vitro* (Figure 4b). In addition, we also observed significantly lower cell growth in the xenografts derived from the HCT116 sub-clone with low HSP110 expression than in the sub-clone with high HSP110 expression (Figure 4c). We also found an association between STAT3 phosphorylation and endogenous HSP110 levels in these tumors (Figure 4d).

HSP110 affects STAT3 activation induced by IL-6 *in vitro* and *ex vivo* in intestinal crypts

IL-6 is the main inducer of the STAT3 pathway in colon cancer and promotes tumor growth.¹⁸ Although our enzyme-linked immunosorbent assay tests demonstrated that HSP110 did not affect the secretion of IL-6 (data not shown), HSP110 promoted STAT3 phosphorylation induced by IL-6, and, conversely, HSP110 inhibition by HSP110DE9 blocked STAT3 phosphorylation dosedependently induced by IL-6 (Figure 4e and Supplementary Figure 2C). To further prove this effect, we isolated intestinal crypts from HSP110 knockout animals and induced *ex vivo* STAT3 phosphorylation by adding IL-6 to the explant cultures. While STAT3 phosphorylation was induced in the crypts isolated from the wild-type animals, no P-STAT3 was observed in those isolated from the HSP110 knockout animals (Figure 4f).

HSP110 directly binds to STAT3 and promotes its phosphorylation Next, we determined whether HSP110 interacted with STAT3 in colon cancer cells. Both proteins co-localized *in vivo* (Supplementary Figure 3A) and associated with one another, as demonstrated by duolink assays (Figures 5a and b). This *in vivo* interaction was confirmed by co-immunoprecipitation experiments (Figure 5c). We further showed that both proteins directly interacted *in vitro* using purified proteins and a biolayer interferometry (BLI) approach (OctetRed96, Figure 5d). HSP110 interacted with STAT3 with a K_D of 17.2 ± 0.17 nM, which is very close to that of HSP110 interacting with HSP70 ($K_D = 18.8 \pm 0.37$ nM), used here as a positive control (Figure 5d and Supplementary Figure 3B). Interestingly, the binding between HSP110 and STAT3 was slightly favored by the presence of ATP

[•]

Figure 1. HSP110 induces colon cancer cell proliferation *in vivo* and *in vitro*. (a) Comparative analysis of tumor growth (mean tumor volumes) in xenografts derived from human colorectal cancer HCT116 and SW480 cells transfected either with an HSP110 shRNA or a scrambled shRNA. Upper panels, western blot showing shRNA-induced depletion of HSP110. Ten mice per group. A representative experiment is shown (n = 2). *P < 0.05. (b) Images of representative excised tumor xenografts from mice shown in (A), scale = 10 mm. (c) Xenografts (mean tumor volumes) of HCT116 and SW480 cells either control transfected (empty vector) or transfected with HSP110 or HSP110DE9. Upper panels, western blot showing HSP110 and HSP110DE9 expression. HSC70 is used as a loading control. Ten mice per group, n = 2. *P < 0.05; ***P < 0.001. (d) Hematoxylin/eosin stain, and expression of caspase 3 and KI67 by IHC in SW480 tumor xenografts at day 16 (a representative cell number of SW480 cells determined 72 h after transfection with plasmids coding for control-GFP or HSP110-GFP (n = 3), *P < 0.05. (f) Percentage of SW480 in each cell division 72 h after transfection with control-GFP, HSP110-GFP or HSP110DE9. Collieration was assessed as dilution of CellTrace fluorescent dye by flow cytometry. (g) Representative cell proliferation histograms. (h) The percentage of SW480 cells in each phase of the cell cycle was determined 48 h after transfection with plasmids coding for control-GFP, HSP110-GFP or HSP110-GF

HSP110 promotes colorectal cancer growth K Berthenet *et al*

4



Figure 2. HSP110 effect on tumor growth involves STAT3 activation. (a) Percentage of GFP-positive SW480 cells in the S phase assessed by BrdU incorporation and 7-AAD staining, 48 h after transfection with plasmids coding for control-GFP or HSP110-GFP and treated for the preceding 24 h with or without increasing doses of AG490 (40, 80, 120 μ m). **P < 0.01 (n = 3). Lower panel, immunoblot analysis of c-Myc, cyclin D1, P-STAT3, STAT3 and HSP110. One representative experiment is shown. Actin, loading control. (b) Expression of STAT3 and P-STAT3 in SW480 cells transfected with increasing concentrations of HSP110 was analyzed by immunoblot. Actin was used as a loading control (n = 3). (c) Immunoblot analysis of P-STAT3 content in the nucleus and cytosol of SW480 and HCT116 cells transfected with an empty vector (GFP) or GFP-HSP110. PARP1 (nuclear protein) and HSP60 (cytosolic protein) were used as controls for extract purity. (d) The expression of c-Myc and McI1 mRNA in HSP110-transfected cells was determined by qRT-PCR. Expression values were calculated relative to RPLP0 and GAPDH RNA. *P < 0.05 (n = 4).

(adenosine triphosphate), but not ADP (adenosine diphosphate) (Figure 5d, lower panel).

A plausible hypothesis for a chaperone like HSP110 is that, through its association, it renders STAT3 phosphorylation sites more accessible to JAK2. We performed these STAT3 phosphorylation experiments *in vitro* with purified proteins. Our results clearly show that HSP110 facilitates STAT3 phosphorylation (Figure 5e).

Modulation of STAT3 activity is dependent on HSP110 in MSI primary colon cancers

We also assessed P-STAT3 expression in patients' biopsies of primary MSI colorectal tumors previously selected for their low or abundant expression of mutant HSP110DE9, which correlates inversely with the expression of HSP110.⁷ HSP110-low tumors were those with abundant HSP11DE9 (i.e. large deletions in the



Figure 3. HSP110DE9 blocked HSP110-induced STAT3 phosphorylation. **(a)** Immunoblot analysis of P-STAT3, STAT3, HSP110 and HSP110DE9 in SW480 (left panel) and HCT116 (right panel) cells, 48 h after transfection with plasmids coding for HSP110-GFP and increasing concentrations of HSP110DE9-GFP. HSC70 served as a loading control. **(b)** Immunoblot analysis of cyclin D1, c-Myc, Mcl1, Bcl-xL, P-STAT3 and STAT3 in SW480 (left panel) and HCT116 (right panel) cells, 48 h after transfection by plasmids coding for control-GFP, HSP110-GFP or HSP110DE9-GFP. HSC70 served as a loading control. One experiment of the three performed is shown.

satellite T17 sequence of the HSP110 gene, which favors the alternative splicing process that results in HSP110DE9 expression); HSP110-high tumors were those with low expression of HSP110DE9 (i.e. small deletions in the T17 sequence of HSP110). We analyzed tumors from a cohort of 37 patients; 25 expressing HSP110 and 12 not or barely expressing HSP110. As shown in Figure 6a, most of the tumors positive for HSP110 were also positive for P-STAT3, whereas the majority of tumors negative for HSP110 were also negative for P-STAT3. The difference between these two groups of patients was significant (P=0.03, Fisher's exact test). Representative images of primary colon tumors displaying double-positive or double-negative immunostaining are shown in Figure 6b (×100 magnification).

DISCUSSION

Heat shock proteins are induced by different stresses including anti-cancer drugs. They help cells to survive such adverse situations through their cell-protective properties (anti-apoptotic, chaperone, etc.).¹⁹ Because cancer cells have a heightened need for chaperones for their survival compared with normal cells; there is a strong rationale for using HSP inhibitors as chemo-sensitizing agents in cancer therapy.¹

HSP110 is the only HSP for which a loss-of-function mutation has been found in cancer,⁴ and expression of this inactivating mutation has been associated with an excellent response to chemotherapy.⁷ The association of HSP110 with a poor prognosis has been confirmed in other types of cancer, such as lymphomas.^{10,20} For example, in B-cell non-Hodgkin lymphomas, HSP110 depletion has been associated with the downregulation of the oncogenes *BCL6* and *c-MYC*.¹⁰ However, the role of HSP110 in colon cancer seems particularly relevant.³ Indeed, HSP110 may also be implicated in colon cancer development as it is abundantly expressed in intestinal epithelial cells and plays a functional role in regulating mucosal homeostasis. Furthermore, HSP110 knockout animals are prone to the development of inflammatory bowel disorders.¹⁵

In this work, we have demonstrated that HSP110 plays a functional role in colon cancer cell proliferation in vitro and in vivo through IL-6-STAT3 pathway activation. STAT3 must be tightly regulated and different chaperones contribute to this. In the case of HSP90 and the HSP70 super-chaperone complex, the effect is through the regulation of STAT3 stability by controlling its proteasomal degradation.^{21,22} This does not seem to be the case for HSP110 since, as we showed here, STAT3 levels do not change with HSP110 expression (only the phosphorylation status of the transcription factor). Indeed, HSP110 binds to STAT3, thus facilitating its phosphorylation by JAK2 and its translocation to the nucleus, and thereby promoting STAT3 transcription factor activity. Because STAT3 has numerous target genes that play crucial roles in cell proliferation and survival, metastasis and/or angiogenesis, the question remains as to whether HSP110 could also play a role in facilitating transcription factor binding to particular genes.

In Hela cells, transfection-induced overexpression of HSP110 increases the amount of phosphorylated STAT3.²³ This suggests that modulation of STAT3 activity by HSP110 is not just restricted to intestinal cells.

HSP110 has also been reported to play a role in the Wnt/ β catenin pathway by inhibiting the hyper-phosphorylation and degradation of β -catenin.¹¹ Although we did not find that β catenin was affected by either the expression or the depletion of HSP110 in our colon cancer cells (data not shown), this effect may contribute to the overall tumorigenic effect of HSP110.

Interestingly, it has recently been reported that STAT3 is able to induce the transcription of HSP110 in intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. In this context, HSP110 expression is seen as a protective mechanism induced by epithelial cells in CD1d-mediated inflammation (CD1d presents self and microbial antigens to NK T-cells).¹⁵ Therefore, a feedback amplification loop might exist in cancer cells where HSP110 induces STAT3 activation, which in turn promotes HSP110 expression by inducing its transcription.

STAT3 is a transcription factor that is constitutively activated in a variety of human cancers including colorectal cancer, where it was associated with adverse clinical outcomes.^{16–18} Because accumulating evidence implicates STAT3 as a promising target for cancer therapy, a better understanding of its activation mechanism in human cancer is needed.

HSP110 is also a cancer target. We and others have previously demonstrated that HSP110 was abundantly expressed in colon rectal cancer and associated with a poor prognosis (response to Folfox⁷). Here we showed that HSP110 not only increased resistance to apoptosis induced by the chemotherapy⁴ but was also able to promote the proliferation of cancer cells by facilitating the activation (phosphorylation) of STAT3, which it is known to induce the upregulation of cell proliferation and pro-survival genes. In summary, STAT3 may be implicated in the overall tumorigenic role of HSP110. The association of these two markers of a poor prognosis (HSP110/P-STAT3) in colon cancer deserves to be evaluated. To this end, we have just started a multicenter study including more than 3000 colorectal cancer biopsies.

© 2016 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature.

HSP110 promotes colorectal cancer growth K Berthenet *et al*



Figure 4. Endogenous HSP110 levels determine the cells' proliferative and P- STAT3 status, *in vivo, in vitro* and *ex vivo* in intestinal crypts. **(a)** Immunoblot of P-STAT3 and STAT3 expression in two HCT116 sub-clones selected by their either high or low expression of HSP110 (because they bear either a small or a large T17 deletion as previously described⁷). **(b)** *In vitro* cell growth of the HCT116 sub-clones. *P < 0.05. **(c)** Comparative analysis of tumor growth (mean tumor volumes) in xenografts derived from the HCT116 HSP110-high and HSP110-low sub-clones. **P < 0.01. **(d)** Representative images of HCT116 sub-clone xenograft sections stained with P-STAT3 antibody by immunohistochemistry (n = 5). P-STAT3 expression was positive in the clone with high HSP110 whereas no expression of P-STAT3 was observed in the clone with low HSP110. Magnification x100. **(e)** Immunoblot analysis of P-STAT3 and STAT3 in SW480 cells transfected with plasmids coding for control-GFP, HSP110-GFP or HSP110ΔE9-GFP (as in Figure 1c) and treated for 30 min with or without IL-6 (10 or 100 ng/ml). **(f)** Immunoblot analysis of P-STAT3 in mouse colon crypt biopsies isolated from wild-type or HSP110KO mice, and treated *ex vivo* for 30 min with or without two concentrations of IL-6 (10 or 100 ng/ml). STAT3 served here as a loading control. One representative experiment is shown (4 mice per group).

MATERIALS AND METHODS

6

Primary colon tumor samples and CRC cell lines

CRC cell lines were purchased from the American Type Culture Collection. All of the cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium as described. All cell lines were mycoplasma free. Primary tumors and normal colon tissues were obtained from patients undergoing surgery in Hôpital Saint-Antoine after informed consent and approval by the institutional review boards/ethics committees of Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. MSI status was determined as described previously.⁷

Transfection with shRNAs and xenografts

pEBVsiRNA vectors were cloned and silenced cells were established as described previously.²³ We used the DSIR program to design shRNA sequences to target the *HSP110* gene. RNAi sequences targeting the HSP110 (NM_006644) mRNA stretched across nucleotides 179–197 (pBD3226), 292-310 (pBD3227) and 406-424 (pBD3228). We used cells carrying the pBD650 plasmid that expressed an inefficient shRNA sequence as a control.

We introduced the specific shHSP110 sequences into hygromicinresistant pEBV plasmids. Cells were plated 24 h before transfection with JetPrime (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) according to the manufacturer's recommendations. Twenty-four hours later, the cells were trypsinized and seeded in culture medium supplemented with hygromycin (125 µg/ml for HCT116 cell line or 250 µg/ml for SW480). After several days, 10⁷ HCT116 and SW480 cells transfected with shRNA were injected subcutaneously into the flank of female nude mice (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) at 8 weeks of age. Tumor size was measured with a caliper every 2 days over 29 (SW480 cell line), 38 (HCT116 cell line) or 21 days (HCT116 sub-clone xenografts). Mice were killed when the tumors reached 800 mm³. The mice were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie, France. Statistical methods to predetermine sample size in mice experiments were not used and the experiments were not randomized. During experiments and outcome analysis, the animal group allocations were not blinded.

Transient cell transfection and treatments

Either 1.2×10^5 SW480 cells or 2.5×10^5 HCT116 cells were cultured in a 12-well plate for 24 h. Then, the cells were transfected with 1 µg of plasmid coding for GFP, GFP-HSP110 or GFP-HSP110DE9 using the HP Xtreme gene DNA transfection reagent (Roche, Boulogne-Billancourt, France) according to the manufacturer's instructions. In some experiments, cells were treated with the Janus kinase 2 protein inhibitor AG490 (Millipore, Molsheim, France) 24 h after transfection for 24 h. To induce STAT3 activation, human cell lines or mouse colon crypts were treated with human (Life Technologies, Saint-Aubin, France) or mouse (Miltenyi, Paris, France) IL-6 (10 or 100 ng/ml⁻¹), respectively.

Analysis of cell survival, cell cycle and cell proliferation

For apoptosis experiments, cells were harvested and stained with Annexin V-FITC and 7-AAD (BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA) according to the manufacturer's recommendations. The cell cycle was analyzed using the APC-BrdU Flow kit from BD Pharmingen. Briefly, cells were incubated with BrdU (10 µM for 60 min), washed in phosphate-buffered saline, fixed with BD cytofix/cytoperm solution (15 min, RT) and permeabilized with Cytoperm/Permeabilization (10 min). After washing and 5 min of incubation with BD Cytofix/Cytoperm, cells were incubated for 1 h at 37 °C with DNase $(300 \,\mu g/ml^{-1})$. Cells were then washed and incubated with APClabeled anti-BrdU antibody (20 min; RT). 7-AAD was used to stain total DNA and the cell cycle was analyzed using an LSRII flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Proliferation was determined by staining 10⁵ SW480 cells with the Cell Trace Violet (Invitrogen, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's procedure. Divisions were detected over 3 days by flow cytometry with an LSRII cytometer and each generation of cells was analyzed using ModFit software.

HSP110 promotes colorectal cancer growth K Berthenet *et al*



Figure 5. HSP110 interacts with STAT3 and favors its phosphorylation. (a) *In vivo* interaction of HSP110 with STAT3 was determined in SW480 by Duolink technology. HSP70 was used here as a positive control of HSP110 interaction, whereas Hikeshi and GFP were used as negative controls. HSP90 was used here as a positive control of STAT3 interaction whereas SMAD4 was used as a negative control. Scale bars: 20 μ M. (b) Quantitation of HSP110-Hikeshi, HSP110-HSP70, HSP110-STAT3, HSP90-STAT3, SMAD4-STAT3 spots per cells determined by Duolink technology as in (b). ****P* < 0.001. (c) Immunoprecipitation (IP) of STAT3 in SW480 cells followed by western blot using an anti-STAT3 (IP STAT3) or a non-relevant (IP control) antibody. (d) Analysis of the interaction between purified HSP110 and STAT3 byBLI: (upper panel) STAT3 immobilized on the biosensor was dipped into wells containing increasing HSP110 concentrations (from 98.8 to 500 nM). A *K*_D value of 17.2 nM ± 0.17 nM (*X*²: 0.365 and *R*²: 0.991) was obtained with a 1:1 model; (lower panel) when indicated ATP (2 mM) or ADP (2 mM) was added. (e) Immunoblot analysis of P-STAT3, STAT3, P-JAK2, JAK2 and HSP110 after *in vitro* kinase assay performed in the presence of recombinant STAT3 as a substrate (100 ng) with or without recombinant JAK2 (50 ng), ATP (250 μ M), or recombinant HSP110 (100 ng) (*n* = 3).

7

HSP110 promotes colorectal cancer growth K Berthenet *et al*



Figure 6. HSP110 associates with P-STAT3 in human biopsies of MSI colorectal cancer patients. (a) Schematic representation of HSP110 and P-STAT3 immunostaining in the cohort of patients analyzed. Significant associations were observed for the expression of HSP110 and P-STAT3 (*P = 0.03, Fisher's exact test). (b) Representative images of primary colon tumors displaying double positive or double negative immunostaining are shown (\times 100 magnification). The inserts correspond to a detail of the immunostaining (\times 200 magnification).

Immunoblot analysis and immunoprecipitation

Cells were washed in PBS and lysed on ice in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 6.8, 10 mM NaF, 1 mM DTT, and 1% Triton X-100) in the presence of protease (Roche, Boulogne-Billancourt, France) and phosphatase (Sigma-Aldrich, Lyon, France) inhibitors. Proteins were separated by PAGE and transferred following standard protocols before analysis with a chemiluminescence detection kit (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Concerning the primary antibodies used, Bcl-xL (2764S), c-Myc (9605S), Cyclin D1 (2926S), P-STAT3 (9145S) and STAT3 (9139S) were from Cell Signaling (Danvers, USA); Mcl-1 (sc-819), HSC70 (sc-7298), HSP110 (ab109624) from Abcam (Cambridge, UK); and actin (A1978-200UL) from Sigma (Lyon, France). Cytoplasmic and nuclear extracts were obtained using the 'NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction was completed as previously described²⁴ using an anti-STAT3 (9139S) antibody (Cell Signaling, Danvers, USA).

Immunohistochemistry

8

Human and mouse xenograft sections of 4 µm from paraffin-embedded tissue samples were cut onto silane-treated Super Frost slides (CML, Nemours, France) and left to dry at 37 °C overnight. Tumor sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in ethanol. Before immunostaining, antigen retrieval was performed by immersing sections in citrate buffer (pH 6.0) (HSP110), pH 9.0 (caspase 3) or in pH 8.0 EDTA buffer (P-STAT3) (15 min 95 °C), washed twice in PBS for 3 min and treated with 3% H₂0₂-PBS for 15 min in order to inhibit endogenous peroxidases. After being washed in PBS, slides were saturated for 25 min in 3% BSA PBS. Sections were then incubated for 1 h at room temperature with active caspase 3 (dilution 1/150, clone ab52293, Abcam) or KI67 antibodies (dilution 1/300, clone A21-Y, ThermoFisher) or P-STAT3 antibody (dilution 1/70, clone D3A7, Ozyme). After washing in PBS, secondary antibody (8114 P, Cell signaling, Danvers, USA)) was added for 30 min at room temperature. Slides were washed twice for 5 min in PBS and revealed using the Novared kit (Vector, Burlingame, USA). Slides were washed twice in water for 5 min and counterstained with 10% Meyer's hematoxylin. After one wash in water, slides were dehydrated in 100% ethanol and xylene and observed in a blinded manner using the Cell Observer station (Zeiss, Germany).

Immunofluorescence staining

Staining was performed as previously described.²⁵ After fixation and permeabilization, cells were incubated overnight at 4 °C with anti-HSP110 (sc-6241) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and anti-STAT3

(9139S) (Cell Signaling, Danvers, USA) primary antibodies before incubation with secondary antibodies (488 or Alexa 568, Life Technologies, Saint-Aubin, France).

Duolink assay

Slides were stained with the antibodies: HSP110 (ab109624, Abcam), STAT3 (9139S, Cell Signaling), Hikeshi (14808-1-AP, Proteintech Rosemont, IL, USA), HSP70 (ADI-SPA-810, Enzo Life Sciences), HSP90 (PA3-013, Thermo Fisher), SMAD4 (SC-7154, SC-9996, Santa Cruz Biotechnology) or GFP (Ab1218, Abcam) and then incubated with proximity ligation assay probes (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 1 h at 37 °C. After the washes and incubation with the ligase solution for 30 min at 37 °C, the slides were washed again and incubated with the amplification polymerase solution for 100 min at 37 °C. Nuclei were labeled with DAPI (Sigma-Aldrich). Images were acquired using the Cell Observer station (Zeiss). proximity ligation assay images were analyzed using ICY software. Cells were segmented by the user and proximity ligation assay spots were counted using the spot detector plugin. Statistical analysis was then carried out on R software. A Wilcoxon signed rank test with continuity was used to determine whether samples had a number of spots greater than 0.

Biolayer interferometry

Protein-protein interactions were characterized by BLI on an OctetRED instrument. STAT3 was biotinylated (1:3 ratio) according to the manufacturer's instructions (biotin-PEG4-NHS from Pierce EZ kit). The streptavidin-coated biosensor was dipped into wells containing biotinylated STAT3. For the HSP110/STAT3 interaction: after washing, the functionalized biosensor was dipped into wells containing different concentrations of HSP110 (association phase) in the presence or absence of 2 mm ATP or ADP. For the dissociation phase, the biosensor was dipped into wells containing Tris-buffered saline with or without either 2 mm ATP or ADP. Each KD was determined with a 1:1 stoichiometry model using a global fit with Rmax unlinked by sensor (FortéBio, Data Analysis Software Version 7.1.0.38).

In vitro kinase assay

Recombinant HSP110 (100 ng, OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) was added to the kinase reaction buffer in the presence or absence of 50 ng of active JAK2 recombinant kinase (Millipore, Molsheim, France), of 100 ng of recombinant STAT3 (Sigma Aldrich), with or without 250 μ M of ATP (Cell Signaling). After incubation for 30 min at 30 °C, Laemmli's buffer was added to stop the reaction. The STAT3 phosphorylation was then determined by immunoblot analysis as described previously.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated with Trizol (Invitrogen) and reverse transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and random hexamers (Promega). C-Myc (qHsaClD0012921) and Mcl1 (qHsaCED0036603) primers for real-time PCR were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). The HSP110 primers used were described earlier.⁷ Expression values of transcripts were calculated relative to RPLP0 and GAPDH RNA.

Statistical analysis

Quantitative results are expressed as means \pm s.d. from at least three independent experiments. *In vivo* tumor growth was assessed in 10 mice per group, and reproduced twice. Quantitative data were compared using Student's *t* test. Differences between groups of patients were determined by Fisher's exact test. Graphics were analyzed using the GraphPad Prism program.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Institut National du Cancer, Agence Nationale de la Recherche, Ligue Nationale Contre le Cancer ('Labeled teams' to CG and AD), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Conseil Regional de Bourgogne, the program 'Investissements d'Avenir' ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx. We thank the FEDER for their support. KB and SC have a doctoral fellowship from La Ligue Nationale Contre le Cancer and KB from La Foundation pour la Recherche Médicale. We thank Prof. Dr Ibrahim M. Adham, Institut für Humangenetik, University of Göttingen for kindly providing the HSP110 KO mice and P Bastable (CHU, Dijon) for the English correction of the manuscript.

REFERENCES

- 1 Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2013; **332**: 275–285.
- 2 Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 630–642.
- 3 Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, Garajova I, Fabian P, Hrstka R et al. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. Oncol Rep 2009; 21: 1235–1241.
- 4 Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A *et al.* Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011; **17**: 1283–1289.
- 5 Mattoo RU, Sharma SK, Priya S, Finka A, Goloubinoff P. Hsp110 is a bonafide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates. J Biol Chem 2013; 288: 21399–21411.
- 6 Shaner L, Morano KA. All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. *Cell Stress Chaperones* 2007; **12**: 1–8.
- 7 Collura A, Lagrange A, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Guilloux A *et al.* Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17

have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. Gastroenterology 2014; 146: 401-411 e401.

- 8 Duval A, Collura A, Berthenet K, Lagrange A, Garrido C. Microsatellite instability in colorectal cancer: time to stop hiding!. *Oncotarget* 2011; **2**: 826–827.
- 9 Henics T, Nagy E, Oh HJ, Csermely P, von Gabain A, Subjeck JR. Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability. *J Biol Chem* 1999; **274**: 17318–17324.
- 10 Zappasodi R, Ruggiero G, Guarnotta C, Tortoreto M, Tringali C, Cavane A et al. HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. Blood 2015; 125: 1768–1771.
- 11 Yu N, Kakunda M, Pham V, Lill JR, Du P, Wongchenko M et al. HSP105 recruits protein phosphatase 2 A to dephosphorylate beta-catenin. *Mol Cell Biol* 2015; 35: 1390–1400.
- 12 Colgan SP, Pitman RS, Nagaishi T, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mayer LF *et al.* Intestinal heat shock protein 110 regulates expression of CD1d on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 2003; **112**: 745–754.
- 13 Berthenet K, Boudesco C, Collura A, Svrcek M, Richaud S, Hammann A Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer. Oncoimmunology (in press).
- 14 Boissiere-Michot F, Lazennec G, Frugier H, Jarlier M, Roca L, Duffour J *et al.* Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-instable colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2014; **3**: e29256.
- 15 Olszak T, Neves JF, Dowds CM, Baker K, Glickman J, Davidson NO *et al.* Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* 2014; **509**: 497–502.
- 16 Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; **15**: 103–113.
- 17 Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cellcycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; 15: 91–102.
- 18 Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6–a key regulator of colorectal cancer development. Int J Biol Sci 2012; 8: 1248–1253.
- 19 Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. J Cell Mol Med 2008; 12: 743–761.
- 20 Zappasodi R, Bongarzone I, Ghedini GC, Castagnoli L, Cabras AD, Messina A et al. Serological identification of HSP105 as a novel non-Hodgkin lymphoma therapeutic target. Blood 2011; **118**: 4421–4430.
- 21 Prinsloo E, Kramer AH, Edkins AL, Blatch GL. STAT3 interacts directly with Hsp90. IUBMB Life 2012; 64: 266–273.
- 22 Sato N, Yamamoto T, Sekine Y, Yumioka T, Junicho A, Fuse H et al. Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. Biochem Biophys Res Commun 2003; 300: 847–852.
- 23 Yamagishi N, Fujii H, Saito Y, Hatayama T. Hsp105beta upregulates hsp70 gene expression through signal transducer and activator of transcription-3. *FEBS J* 2009; 276: 5870–5880.
- 24 Biard DS, Despras E, Sarasin A, Angulo JF. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 519–529.
- 25 Jego G, Lanneau D, De Thonel A, Berthenet K, Hazoume A, Droin N et al. Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. *Leukemia* 2014; 28: 1676–1686.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)