



**HAL**  
open science

# Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique

David Lanneau

► **To cite this version:**

David Lanneau. Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS007 . tel-00560535

**HAL Id: tel-00560535**

**<https://theses.hal.science/tel-00560535>**

Submitted on 28 Jan 2011

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

U.F.R de Médecine

THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Biochimie Cellulaire et Moléculaire

Par David LANNEAU

Le 21 mai 2010

## Rôle des Protéines de Choc Thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique

Directeur de thèse : Dr. Carmen Garrido

Membres du Jury :

Dr. Valérie LALLEMAND-MEZGER

Rapporteur

Dr. Geneviève COURTOIS

Rapporteur

Dr. François MORLE

Examineur

Pr. Eric SOLARY

Examineur

Dr. Carmen GARRIDO

Directeur de Thèse

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

U.F.R de Médecine

THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Biochimie Cellulaire et Moléculaire

Par David LANNEAU

Le 21 mai 2010

## Rôle des Protéines de Choc Thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique

Directeur de thèse : Dr. Carmen Garrido

Membres du Jury :

Dr. Valérie LALLEMAND-MEZGER

Rapporteur

Dr. Geneviève COURTOIS

Rapporteur

Dr. François MORLE

Examineur

Pr. Eric SOLARY

Examineur

Dr. Carmen GARRIDO

Directeur de Thèse



## Résumé

La synthèse des protéines de choc thermique (HSPs) est un moyen de défense développé par la cellule pour faire face aux diverses agressions auxquelles elle peut être soumise. En tant que chaperons, les HSPs participent aux mouvements intracellulaires des protéines, préviennent l'agrégation des protéines altérées, éliminent les protéines anormales et contribuent à la conformation correcte des peptides nouvellement synthétisés. Mon équipe d'accueil s'intéresse aux rôles des HSPs dans des processus cellulaires tels que l'apoptose et la différenciation cellulaire. Le but de mon travail de thèse consiste à étudier le rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 au cours de la différenciation des monocytes en macrophages.

J'ai dans un premier temps étudié l'implication de HSP90 dans la différenciation macrophagique. c-IAP1 est un membre de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose impliqué dans la régulation de l'apoptose, dans le cycle cellulaire et dans la signalisation cellulaire. Nous avons précédemment montré que c-IAP1 migre du noyau vers le cytoplasme au cours de la différenciation cellulaire. Nous démontrons dans ce travail que c-IAP1 est une protéine cliente de la protéine de choc thermique HSP90 $\beta$ . Dans trois différents modèles de différenciation, ces protéines interagissent et migrent ensemble du noyau vers le cytoplasme au cours de la différenciation cellulaire. L'inhibition de HSP90 ou la déplétion spécifique de l'isoforme  $\beta$  par des siRNA conduisent à sa dégradation par le protéasome. La fonction de chaperon moléculaire de HSP90 envers c-IAP1 est spécifique de l'isoforme  $\beta$  car la déplétion de l'isoforme  $\alpha$  n'a pas d'effets sur c-IAP1. De plus l'inhibition de HSP90 ou la déplétion de HSP90 $\beta$  bloquent la différenciation cellulaire tout comme la déplétion de c-IAP1 par siRNA.

La deuxième partie de mon travail a consisté à étudier le rôle de HSP70 dans la différenciation macrophagique. Nous montrons que cette protéine est fortement induite après stimulation des cellules par le facteur de croissance M-CSF et que son inhibition bloque la différenciation des monocytes en macrophage. HSP70 interagit avec la protéine Spi-1/Pu.1, facteur de transcription clé de la différenciation macrophagique. L'expression de Spi-1/Pu.1 augmente également au cours de la différenciation macrophagique et ce de manière similaire à celle de HSP70. Ceci suggère l'implication des facteurs de transcription responsables de l'induction des HSPs, les Heat Shock Factor (HSF). L'étude du promoteur de Spi-1/Pu.1 a révélé la présence d'une séquence ressemblant fortement aux éléments de réponse classiques sur lesquels se fixe HSF1. HSF1 est capable de se fixer sur le promoteur de Spi-1/Pu.1 et l'inhibition de HSF1 bloque l'expression de Spi-1/Pu.1. HSF1 participe donc au contrôle de l'expression de Spi-1/Pu.1 lors de la différenciation macrophagique.

HSP90 et HSP70 sont donc essentielles à la différenciation macrophagique. Comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les voies de différenciation se révèle extrêmement important puisque des altérations des mécanismes de l'hématopoïèse sont retrouvées dans plusieurs types de leucémies (leucémies aiguës myéloblastiques et leucémies myélo-monocytaires chroniques). Connaître le rôle des HSPs dans la différenciation cellulaire permettrait donc de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de ces pathologies.

## Abstract

Heat shock proteins (HSPs) are molecular chaperones whose expression is increased after many different stresses. They have a protective function helping the cell to cope with lethal conditions. These proteins play an essential role as molecular chaperones by assisting the correct folding of nascent and stress-accumulated misfolded proteins and by preventing their aggregation. My team is interested in understanding the roles of HSPs in two physiological related processes: apoptosis and cell differentiation. The aim of my work is to study the functions of HSP90 and HSP70 in macrophagic differentiation.

I first studied the role of HSP90 in macrophagic differentiation. We previously reported that cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (c-IAP1), migrated from the nucleus to the surface of the Golgi apparatus in cells undergoing differentiation. c-IAP1 is a member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family which has demonstrated functions in cell death, cell signaling and mitosis. Here, we show that c-IAP1 is a client protein of the stress protein HSP90 $\beta$ . In three distinct cellular models, the two proteins interact and migrate from the nucleus to the cytoplasm during the differentiation process through a leptomycin B-sensitive pathway. Inhibition of HSP90 proteins by small chemical molecules and specific depletion of HSP90 $\beta$  isoform by siRNA both leads to c-IAP1 degradation by the proteasomal machinery. This chaperone function of HSP90 towards c-IAP1 is specific of its  $\beta$  isoform as specific depletion of HSP90 $\alpha$  isoform does not affect c-IAP1 content. Chemical inhibition of HSP90 or siRNA-mediated depletion of HSP90 $\beta$  both inhibit cell differentiation, which can be reproduced by siRNA-mediated depletion of c-IAP1. Altogether, these results suggest that HSP90 $\beta$  prevents auto-ubiquitination and degradation of its client protein c-IAP1, whose depletion would be sufficient to inhibit cell differentiation.

The second part of my work consisted in the study of the role of HSP70 in macrophagic differentiation. We used two models of differentiation: human peripheral monocytes exposed to M-CSF and THP1 cells induced to differentiate by TPA. We found that in both models, HSP70 expression was induced during differentiation. Interestingly, the expression of Spi-1/Pu.1, a transcription factor essential for monocytes to differentiate, was similarly induced. Upon differentiation, both proteins co-localized in the nucleus and associated. Inhibition or down regulation of HSP70 induced Spi-1/Pu.1 degradation and blocks the differentiation process, indicating that the necessity of Spi-1/Pu.1 to be chaperoned by HSP70 during differentiation. Since Spi-1/Pu.1 promoter has a HSE-like, we studied whether transcription factors responsible for HSPs induction, HSF, could be involved. We show that although HSF2 do not seem involved, HSF1 binds to Spi-1/Pu.1 promoter and its inhibition blocks Spi-1/Pu.1 expression and monocytes differentiation.

So HSP90 and HSP70 are essentials for macrophagic differentiation. Understanding monocyte differentiation regulation is important since defects of the differentiation process can lead to the development of leukemias (acute myeloid leukemia, chronic myelomonocytic leukemia). A better understanding of the roles of HSPs may provide new therapeutic strategies for the treatment of these pathologies.

*En science, la phrase la plus excitante que l'on peut entendre, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas « Eurêka » mais « c'est drôle ».*

*Isaac Asimov*

## *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail :

Je remercie le Dr. **Valérie Lallemand Mezger** et le Dr. **Geneviève Courtois** pour avoir accepté d'analyser mon travail en tant que rapporteurs et le Dr. **François Morlé** en tant qu'examineur.

Je souhaite remercier le Pr. **Eric Solary** pour m'avoir offert la possibilité de réaliser ma thèse au sein de l'unité Inserm U517 devenue par la suite une composante du Centre de Recherche Inserm 866. Je vous remercie pour l'excellent environnement de travail que vous avez apporté dans l'unité et pour tous vos bons conseils.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse le Dr. **Carmen Garrido** pour m'avoir accepté dans son équipe pendant ces 5 années (DEA + thèse ensemble quand même). Je tiens notamment à te remercier pour m'avoir offert la possibilité de participer à la réalisation d'articles et de review scientifique et pour le congrès à Boston. Je retiendrai toujours ton enthousiasme et ton dynamisme très communicatifs.

Je remercie également le Dr. **Michaëla Fontenay** et le Dr. **Stéphane Savary** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse.

Je souhaite remercier chaleureusement toutes les personnes du département « Mort cellulaire et cancer » du Centre de Recherche Inserm U866. Ce fut un véritable plaisir de travailler avec vous tous.

Merci beaucoup **Alexandrine** pour ton aide précieuse et indispensable dans la gestion de notre quotidien. Je ne sais vraiment pas comment tu fais pour t'occuper de ce travail monumental et garder tout le temps ton sourire et ta gentillesse (même lorsque l'on vient t'embêter pour passer une commande urgente de produits western...). Merci encore pour ta disponibilité et pour ton aide, notamment pour les aspects « pratiques » de ma soutenance de thèse. Je pense également à **Marie- France** pour ton aide pendant la période U517.

Je remercie plus particulièrement les membres de l'équipe n°2 « Protéines de stress et cancer ». Merci à **Anne Laure R.** Ma nanala, qu'aurais-je fait sans toi ? Merci d'avoir été là pendant ces années, notamment quand ça n'allait pas très bien (période NN ...). Tu es la meilleure des collègues et des amis et tu vas beaucoup me manquer (en fait c'est déjà le cas). Je te souhaite plein de bonheur pour la suite et j'espère qu'on se reverra de temps en temps. Et merci à ton **Dom** et son don pour la cuisine. Merci à **Guillaume**. On se connaît depuis la licence et te voir dans notre équipe a été une super bonne surprise. Merci pour tout, difficile de citer un truc en particulier, on a fait pas mal de choses de vraiment sympa ensemble. Tu es un vrai pote. Je te souhaite plein de bonheur avec **Lucie** et si jamais un jour tu atteins un bon poste dans une entreprise (ce que je n'en doute pas) et que tu dois embaucher quelqu'un .... pense à moi ! **Anne Laure J** dite « Jojolle » pour les intimes (ou pas

...ben oui c'est sùuuuuur hein ??). Merci pour tout, pour les discussions débiles à midi au RU (post-it ou parafilm sur une île déserte ?), pour ta façon vraiment bizarre de manger (manger un pain au chocolat de manière sélective faut le faire) et pour ta «passion» des pots (de thèse, de départ ...). Merci à **Sébastien** (dit Sébastien ou Sébounet ou Radio Déjante Man), autre compagnon du RU, pour ton attitude et tes paroles complètement décalées parfois. Merci à **Arlette** (Arloutte) pour nos discussions, ta bonne humeur, ta disponibilité (pour des CD11b imprévus à faire ...) et ton dévouement dans l'organisation des soirées. Merci à **Aurélié DT**, même si ce n'était pas facile de travailler avec toi (comment fais-tu pour mener 10 projets en même temps ???), je te remercie pour toutes nos discussions scientifiques très constructives et pour le fait que tu es toujours prête à rendre service. Merci à **Gaétan** pour m'avoir aidé pendant cette fin de thèse. Je te souhaite plein de bonheur à toi et à ta famille à Dijon. Je remercie aussi **Philippe** (je rêve d'avoir un chef comme toi), **Pierre** (bonne chance pour la suite), **Adonis**, **Eric F**, **Elise** et **Dominique**. Je remercie également **Céline** pour m'avoir encadré les premiers temps puis pour avoir été là quand j'en avais besoin. Ça n'a pas été facile au début mais quand on commence à te connaître on se rend compte que tu es une personne formidable. Merci pour tout et plein de bonheur pour toi et ta famille.

Je remercie également **Olivier Micheau**, mon tout premier « chef ». Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, pour nos discussions (tu m'as presque convaincu d'acheter un mac !). Merci à **Delphine** pour m'avoir appris à manipuler (eh oui !) et pour tous ces bons moments passés ensemble. Je pense également à **Nij** (de Dij euh non d'Australie !!), mon Odile Deray à moi (^^). Merci pour tous ces fous rires, tes blagues à 2 \$ australiens, tes chansons pourries (obsession avec le fameux interlude musical...). Bonne chance pour la suite et surtout n'oublie pas : on ne peut pas tromper une fois une personne ... euh non c'est pas ça... Merci à **Alex** pour ton aide, pour nos discussions limite philosophiques (on a presque faillit arrêter après le DEA quand même !). Je pense également à **Virginie** (Coquillette) : merci pour ces supers soirées passées chez toi, pour ton accent que j'adore, pour ton Gurou Jooooosh (y a que toi qui connaît ce type !!!), pour ta bonne humeur ... Merci aussi à **Guigui**, pareil pour tous ces bons moments (merci pour l'aide pour ma guitare) et à **Aurélié B** devenue ... **B**.

Je souhaite également remercier la team epche, plus particulièrement **Marion** pour nos discussions, pour toutes ces super soirées, pour m'avoir « forcé » à courir et à me bousiller un genou. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite. **Nath** (Nathalo ... non je ne l'écrirais pas t'inquiètes), une ex de la Garrido Team, pour tous ces bons moments (on a failli se marier quand même ...), pour le Vaudioux, pour tes conseils ... merci. Ma **Cat**, je pense notamment à notre super voyage à Boston et au « trou du bois » (Woods Hole). Plein de bonheur à toi, à Thomas et à la p'tite puce (qui restera XY pour moi). **Amandine** pour nos soirées poker, pour les souvenirs de la crémaillère de Jérôme P ... bises à Benj et à ton lapin mouton géant. **Kumar**, my Indian friend, the "Indian Gentleman", my « French Poulet ». You can have my bench now if you want. Je pense également à **Cindy** (merci pour ton sourire et ta bonne humeur), à **Ali** (merci pour les gâteaux tunisiens), **Jérôme L**, **Marine**, **Cédric**, **Myriam**, **Rahamata**, **Lisbeth** et aussi à **Lolo Prévotat** (pour l'asso Edifice).

Merci aux membres de la DCHNP-R GHB (ou RGHL je sais plus). Merci **Romain** pour ces excellentes soirées. Quand est ce qu'on se fait une soirée p'tit Greg ? et un pot au feu à Saint Christophe en Bourgogne du Suuud ? Pigeon, oiseau à la grise robe ...

Merci à **Jerôme** (s)Paggetti pour nous avoir bien fait marrer, à **Brice** (ton genou c'en est où ?? roller ou course à pied ?), à **Anne**, la seule et unique fan de Grégoire (si le vent pousse les nuages, on apercevra le soleil ... magnifique). Je m'en fous, JJG, il est plus fort ! Merci à **Laurent** pour nos discussions et pour tes blagues que j'adore. On dirait les miennes... mais en plus subtiles ! Je pense aussi à **Anne Laure** et à **Jean Noel**.

Merci aux BB Brunnes (les brunes de Bernard Bonnotte). **Jennifer Fraszczak** (c'est bien écrit ?), notre Chiquette à nous, pour ta bonne humeur, ta gentillesse, pour tous ces bons moments, et pour ton intérêt dans le monde merveilleux et magique des policiers de l'organisme (Fraszczak, et al., J Immunol. 2010 Feb 15;184(4):1876-84). On a fait le grand saut ensemble (heureusement on avait un parachute). Une personne exceptionnelle !!! **Malika**, alias Malikouette, ma reine préférée. Tu m'as plusieurs fois rejeté au profit d'autres (le prof Alain P ...), tu as jeté toutes les bagues que j'avais faites pour toi ..., tu m'as insulté ... mais saches que je ne t'en veux pas. Merci pour ton super sourire, pour ces moments de bonheur sur le télésiège (et de rire aussi). Je pense aussi à **Nicolas L**, la toute première personne qui m'a parlé ici, à **Dom, Alexandra, Daniela, Annie et Bernard** (dont le bureau était juste à côté du nôtre ... désolé pour tous les cris qui survenaient de temps en temps ...) ainsi qu'à **PEP** (président !!!) et **Fanny**.

Merci à **Leslie** alias « Lezlie » pour les anglais (ou que pour Anne Magnet en fait ...) pour ton sourire, tes monocytes (...), pour Scrubs. Merci également à **Arnaud**, je te souhaite plein de bonheur et du soleil (fallait pas venir à Dijon pour ça !!) à **Jessy** (je n'oublierai pas que j'ai eu la bourse ministérielle grâce à toi qui a explosé le classement du DEA). Je me souviendrai toujours de toi dans une grotte, toute sale et épuisée qui gémissait : « où est la sortie ? Je veux sortir ! j'en ai marre » ainsi que de ta passion pour les gnocchis. Merci à **Alban**, à **Arthur** et ses petites protéines (elles sont où les protéines Minimoys ?). Je remercie également **Ben** alias Jacqueline, **Sandrine, Séverine, Nathalie Droin** (« mais vous êtes fous ! »), **Eric** notre québécois (merci pour tes superbes expressions : « pas d'chicane dans ma cabane et pas d'cochon dans mon salon »), **Naïma, Marion C, Laurence, Emmanuelle Logette, Stéphanie Solier** et **Nelly Buron**.

Je remercie également **André** alias Dédé pour ces moments en salle microscopie à essayer de voir du Pu.1 sur des THP1 ... que de belles manips de l'extrême !!, notre voisine **Annabelle** que j'apprécie beaucoup, **Jean Claude**, Mac Gyver dans l'âme (en moins calme quand même ... pauvres étagères !), **Jean François**, notre Richard Virenque, champion des boites de pointes, **Lydie** et **Franck** (on se voit samedi midi dans le bus ! ou à Carrefour sinon !).

Je remercie avec beaucoup d'amour toute ma famille pour être là pour moi tout simplement.

## *Table des Matières*

<i>Liste des abréviations</i> .....	13
<i>Introduction bibliographique</i> .....	17
<b>I. Les protéines de choc thermique</b> .....	18
<b>A) La réponse au choc thermique</b> .....	18
<b>B) Les Heat Shock Factors</b> .....	19
1) Structure des HSF .....	21
2) Activation de HSF1.....	23
3) Inhibition de HSF1 .....	26
<b>C) Les HSPs</b> .....	27
1) La famille des petites HSPs .....	29
2) HSP70.....	31
a) Les principales protéines constitutives de la famille HSP70 .....	32
b) Les protéines inductibles de la famille HSP70 : la protéine HSP70 (HSPA1) .....	33
c) HSP70 : un chaperon moléculaire .....	35
d) Inhibition de HSP70 .....	37
3) HSP90.....	39
a) GP96 et TRAP1.....	39
b) HSP90 : structure.....	40
c) HSP90 : fonction .....	41
d) Différences entre HSP90 $\alpha$ et HSP90 $\beta$ .....	43
e) Inhibition de HSP90 .....	44
<b>II. L'apoptose</b> .....	46
<b>A) Généralités</b> .....	46
<b>B) Les voies de l'apoptose</b> .....	47
<b>C) Régulation de l'apoptose par les HSPs</b> .....	49
<b>III. La différenciation macrophagique</b> .....	51
<b>A) L'hématopoïèse</b> .....	52
<b>B) Les monocytes</b> .....	55
<b>C) Les macrophages</b> .....	56
<b>D) La différenciation macrophagique : rôle du M-CSF</b> .....	57
<b>E) La différenciation macrophagique : le facteur de transcription Spi-1/Pu.1</b> .....	60
1) Les facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation macrophagique .....	60

2) Spi-1/Pu.1 : structure .....	63
3) Spi-1/Pu.1 : expression.....	64
4) Spi1/Pu. : fonction.....	67
a) Rôle dans l'hématopoïèse .....	67
b) Spi-1/Pu.1 : régulateur de la transcription.....	68
<b>F) La différenciation macrophagique : la protéine inhibitrice de l'apoptose c-IAP1.....</b>	<b>70</b>
1) c-IAP1 : structure.....	70
2) c-IAP1 : fonctions.....	72
a) Régulation de l'apoptose.....	72
b) Régulation de la voie des TNF-R et de NF-kB .....	72
3) c-IAP1 et la différenciation des monocytes en macrophages .....	75
4) Inhibition de c-IAP1 .....	76
<b>G) Les HSPs.....</b>	<b>77</b>
1) HSF1 au cours du développement et de la différenciation cellulaire .....	78
2) HSP27.....	78
3) HSP70.....	79
4) HSP90.....	79
<i>Résultats : première partie .....</i>	<i>80</i>
<i>Résultats : deuxième partie .....</i>	<i>96</i>
<i>Discussion générale : .....</i>	<i>124</i>
<i>Bibliographie .....</i>	<i>127</i>
<i>Liste des publications.....</i>	<i>150</i>
<i>Annexe I : .....</i>	<i>153</i>
<i>Annexe II : .....</i>	<i>155</i>
<i>Annexe III : .....</i>	<i>174</i>
<i>Annexe IV : .....</i>	<i>182</i>

## Liste des abréviations

**17-AAG:** 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycine

**17-DMAG:** 17-Dimethylamino-ethylamino-17-demethoxygeldanamycine

**ABD:** ATP Binding Domain

**ADD70:** AIF Derived Decoy for HSP70

**AIF:** Apoptosis Inducing Factor

**AML1:** Acute Myeloid Leukemia 1 protein

**ASK:** Apoptotic Signal regulating Kinase1

**ATP:** Adénosine triphosphate

**AVPI:** Ala–Val–Pro–Ile

**BAG:** Bcl-2-associated athanogene

**BFU:** Burst Forming Unit

**BIR:** Baculovirus IAP Repeat

**BIRC:** Baculoviral IAP repeat-containing

**CARD:** Caspase Activation and Recruitment Domain

**Caspase:** CysteinyI Aspartate Cleaving Protease

**CBF:** Core Binding Family

**CD:** Cluster of Differentiation

**CDK:** Cyclin-Dependent Kinases

**C/EBP:** CCAAT Enhancer Binding Proteins

**CFU:** Colony Forming Unit

**CHIP:** C-terminus of Hsc70/HSP70 interacting protein

**C-IAP:** Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein

**CMH:** Complexe Majeur d’Histocompatibilité

**CSF-1:** Colony Stimulating Factor 1

**DA:** Domaine d’Activation

**DBD:** DNA Binding Domain

**DIABLO:** Direct IAP Binding protein with low pI.

**DIF:** Differentiation-Induced Factor

**DISC:** Death Inducing Signaling Complex

**DR:** Domaine de Régulation

**EGR:** Early Growth Response

**eIF4G:** elongation Initiator Factor 4G

**ERK:** Extracellular signal-Regulated Kinase

**Ets:** E twenty six

**FADD:** FAS-Associated Death Domain

**FAS-L:** FAS- Ligand

**Fragments Fc :** Fragment Cristallisable

**GHKL :** gyrase bactérienne, HSP90, histidine kinase, MutL

**GP:** GlycoProtéine

**GRP:** Glucose-Regulated Protein

**HDAC:** histone deacetylase

**HIP:** HSC70 Interacting Protein

**HLA:** Human Leukocyte Antigen

**Hop:** HSP70-HSP90 Organizing Protein

**HSC:** Heat Shock Cognate

**HSE:** Heat Shock Element

**HSF:** Heat Shock Factor

**HSP:** Heat Shock Proteins

**IAP:** Inhibitor of Apoptosis Protein

**IKK:** I $\kappa$ B Kinase

**IL:** interleukine

**IRF1:** Interferon Regulatory Factor 1

**JNK:** c-Jun N-terminal Kinase

**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase

**MAPKKK:** Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase

**M-CSF:** Macrophage-Colony Stimulating Factor

**NEF:** Facteurs d'Echange Nucléotidique

**NF-Y:** Nuclear Factor Y

**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor-kappa B

**NF-IL6:** Nuclear Factor for IL-6 expression

**NK:** Natural Killer

**NO:** Oxyde Nitrique

**PBD:** Peptide Binding Domain

**PEST :** Proline (P), acide glutamique (E), serine (S), thréonine (T).

**PKB:** Protéine Kinase B

**PKC:** Protéine Kinase C

**RING:** Really Interesting New Gene

**RIP1:** Receptor Interacting Protein 1

**SH2:** SRC Homology 2

**SIRT1:** sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1

**SMAC:** Second Mitochondrial Activator of Caspases

**Spi-1/Pu.1:** Spleen focus forming virus proviral integration 1 / Purine Rich Box 1

**Src:** Sarcoma

**STAT:** Signal Transducers and Activators of Transcription

**TBP:** TATA box Binding Protein).

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**TNFR** : récepteur du Tumor Necrosis Factor

**TPA**: 12-O-TétradécanoylPhorbol-13-Acétate

**TPR**: Tetratricopeptide Repeat

**TRADD**: Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Death Domain Protein

**TRAF**: TNF Receptor-Associated Factor

**TRAIL**: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

**TRAP1**: Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1

**TSA**: Trichostatine A

**UBA**: ubiquitin-associated

**URE**: Upstream Regulatory Element

## *Introduction bibliographique*

## I. Les protéines de choc thermique

### A) La réponse au choc thermique

Les cellules de tout organisme vivent dans des conditions physiologiquement stables. Elles peuvent cependant être soumises à des agressions diverses ce qui impose une faculté d'adaptation indispensable à leur survie. Les organismes ont ainsi développé la capacité de résister à une augmentation de quelques degrés au-dessus du niveau physiologique en induisant la synthèse d'un ensemble de protéines appelées protéines de choc thermique ou HSPs (Heat Shock Proteins).

La réponse cellulaire à des situations de stress a été décrite initialement chez la drosophile. Une augmentation de la température de quelques degrés induit chez cet organisme un renflement au niveau de certains chromosomes géants des glandes salivaires, les chromosomes polytènes (Ritossa, 1962). Ces renflements apparaissent suite à plusieurs stress environnementaux (Ashburner, 1970), sont associés à une synthèse d'ARN messager et sont retrouvés dans de nombreux autres tissus et espèces de drosophiles (Berendes, 1965). Le stress cellulaire active non seulement l'expression de gènes mais aussi la production de protéines spécifiques appelées protéines de choc thermique, ou Heat Shock Proteins HSPs (Tissieres *et al.*, 1974). Ces protéines ont ensuite été détectées chez la levure (Miller *et al.*, 1979) puis dans de nombreux autres organismes allant des archéobactéries à l'homme. Les HSPs représentent l'un des systèmes génétiques les plus hautement conservés entre les organismes. Par exemple le gène HSP70 présente un pourcentage d'identité de 72 % entre l'homme et la drosophile et de 50% entre l'homme et *Escherichia coli* (Hunt and Morimoto, 1985).

Le rôle protecteur des HSPs suite à une augmentation de la température, la thermotolérance, a été mis en évidence en 1982 dans des fibroblastes de hamster. Une augmentation brève et non létale de la température induit en effet une résistance transitoire à une deuxième élévation de température normalement létale. La cinétique

d'acquisition de la thermotolérance correspond à la cinétique de synthèse des protéines de choc thermique et suggère donc l'implication des HSPs dans ce phénomène (Li and Werb, 1982).

Les protéines de choc thermique sont des « chaperons moléculaires ». La plupart des inducteurs de stress ont en commun d'altérer les structures des protéines cellulaires perturbant ainsi le métabolisme cellulaire et entraînant une toxicité. Les HSPs sont alors capables de s'associer avec ces protéines et d'empêcher leur agrégation. Elles peuvent également redonner aux protéines nouvellement formées ou anormales une conformation tridimensionnelle adéquate (Burel *et al.*, 1992). Cette fonction de chaperon moléculaire confère aux HSPs un rôle essentiel dans la protection lors d'un stress mais aussi dans le métabolisme cellulaire en dehors de tout stress.

L'exposition d'une cellule à un choc thermique induit trois étapes successives. La première étape, dite d'altération, conduit à la dénaturation des protéines ayant pour conséquence la perte de leur fonction et la formation d'agrégats protéiques insolubles (Nguyen *et al.*, 1989). La seconde étape, la *réponse au choc thermique*, se caractérise par l'activation transcriptionnelle des gènes *hsp* aboutissant à la synthèse des HSPs. Enfin la phase de récupération durant laquelle les altérations morphologiques sont corrigées. Les protéines retrouvent alors des activités similaires à leurs valeurs initiales. L'activation des gènes *hsp* est alors interrompue et les HSPs retrouvent leur niveau basal d'expression.

## **B) Les Heat Shock Factors**

La réponse au choc thermique correspond à l'activation de facteurs de transcription appelés Heat Shock Factors (HSFs). Ces protéines se lient à l'ADN au niveau de séquences spécifiques situées dans le promoteur des gènes *hsp* : les HSE (Heat Shock Elements) et induisent l'expression des différentes HSPs. Cette réponse a été décrite à l'origine comme survenant après un choc thermique mais de nombreux autres stimuli sont également capables d'induire l'activation de ces facteurs de transcription (Figure 1).

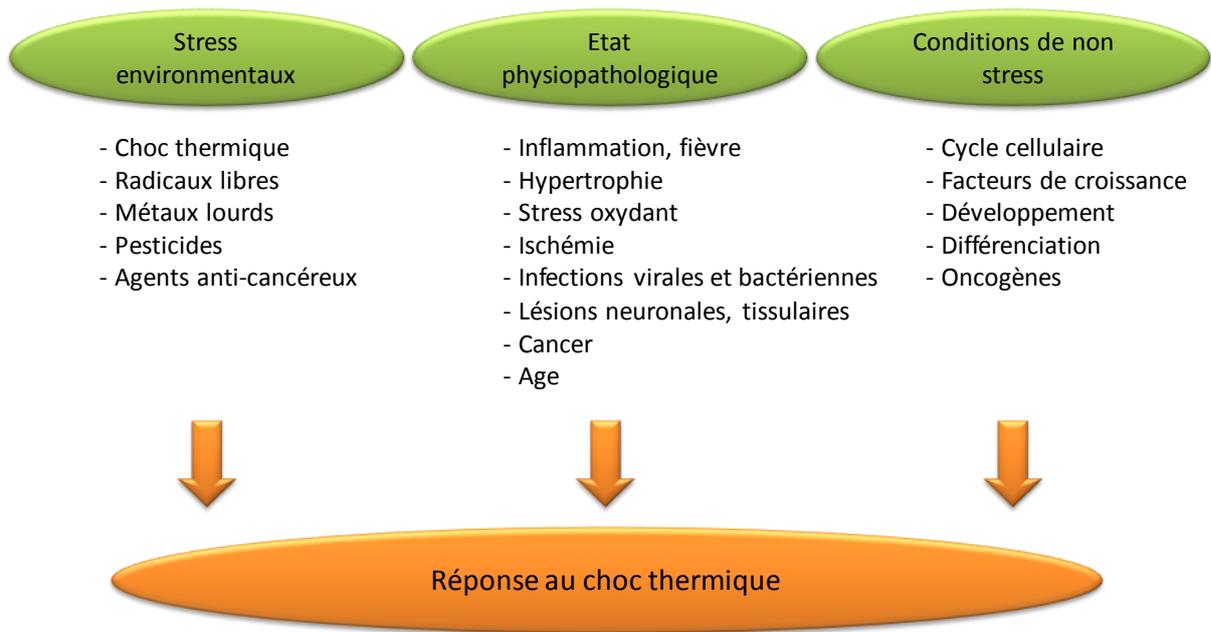


Figure 1. Les différents inducteurs de la réponse au choc thermique.

Les HSFs ont été isolés tout d'abord chez *Saccharomyces cerevisiae* (Sorger and Pelham, 1988; Wiederrecht *et al.*, 1988). Il s'est avéré par la suite qu'il existait plusieurs HSFs différents chez les vertébrés et les plantes (Nakai, 1999; Nover *et al.*, 1996; Wu, 1995). Trois HSFs ont été jusqu'à présent identifiés chez l'homme : HSF1, HSF2 et HSF4, chaque HSF présentant différentes isoformes issues de l'épissage alternatif (Fiorenza *et al.*, 1995). HSF3 n'est quand à lui présent que chez la souris et les oiseaux (Fujimoto *et al.*, 2009; Nakai and Morimoto, 1993).

HSF1 a été identifié à l'origine comme le principal facteur de transcription de la réponse au choc thermique et son action dans ce phénomène a été profondément étudiée. L'inactivation du gène *hsf1* chez la souris entraîne en effet une perte de la thermotolérance (McMillan *et al.*, 1998). HSF2 semble être quant à lui plus particulièrement impliqué dans le développement et la différenciation cellulaire (Kallio *et al.*, 2002; Ostling *et al.*, 2007; Sistonen *et al.*, 1992). Aucune fonction relative au stress n'a été montrée pour HSF4 mais ce facteur est fortement impliqué dans la formation de la lentille ou dans la maintenance de l'épithélium olfactif (Fujimoto *et al.*, 2004; Takaki *et al.*, 2006).

La compréhension du rôle des HSFs est encore incomplète. Leur ressemblance de structure suggère une certaine redondance entre eux dans la réponse au stress mais la diversité de ces facteurs indique également une spécialisation de cette réponse et un contrôle assez fin de la transcription des différentes HSPs, d'autant plus qu'un grand nombre de stimuli différents sont capables d'induire la réponse au choc thermique.

### 1) Structure des HSFs

Les HSFs sont relativement bien conservés au cours de l'évolution (Pirkkala *et al.*, 2001) et possèdent plusieurs domaines principaux (Figure 2) :

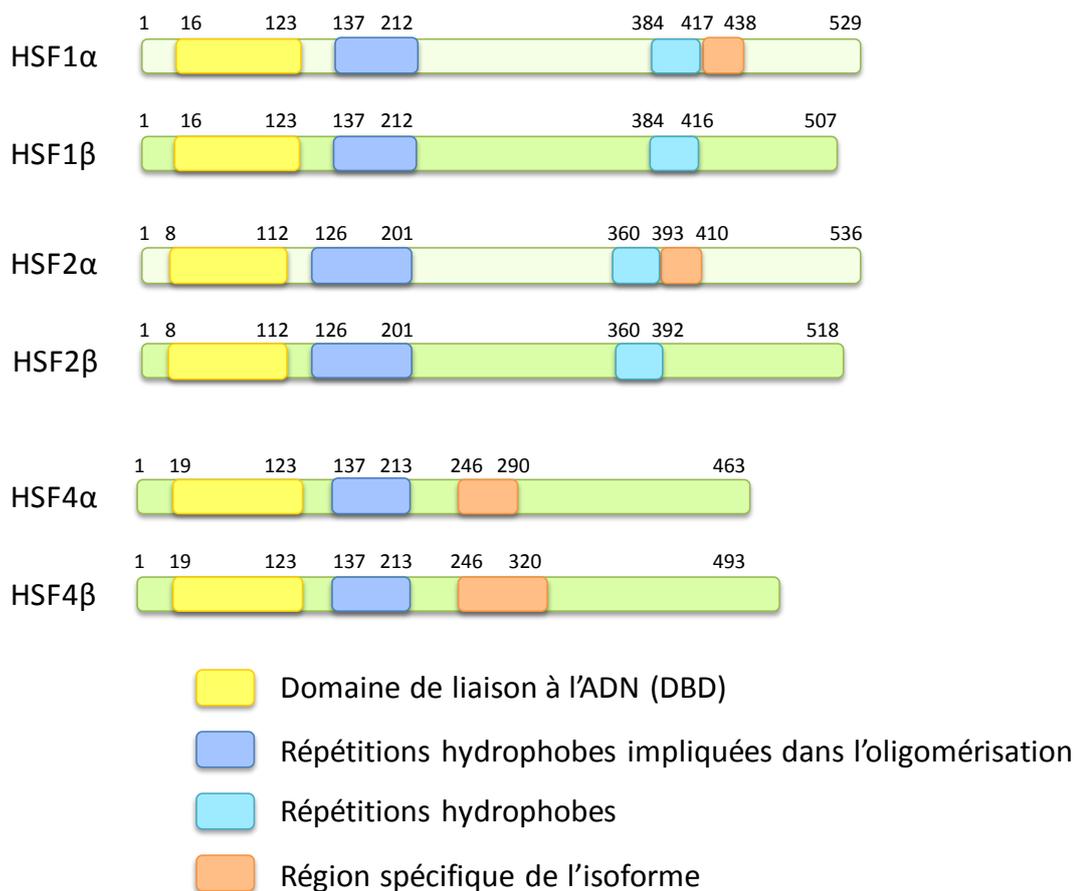


Figure 2. Structure des différents HSFs humains. Adapté de (Pirkkala *et al.*, 2001).

- le domaine de liaison à l'ADN (DBD) situé en N terminal constitué d'une structure hélice-boucle-hélice (Harrison *et al.*, 1994; Vuister *et al.*, 1994). Ce domaine est responsable de la fixation du facteur à l'ADN mais également de l'oligomérisation (Lu *et al.*, 2009; Takemori *et al.*, 2009) et de l'activité transcriptionnelle (Yamamoto *et al.*, 2009).

- un domaine adjacent composé de 80 résidus formant 3 répétitions hydrophobes (HR-A/B) responsable de la trimérisation (Sorger and Nelson, 1989).

- une autre région de répétitions (HR-C), absente de HSF4 et des HSFs de levure. Ce domaine serait impliqué dans l'inhibition de la trimérisation en interagissant avec les autres répétitions H-RA/B (Green *et al.*, 1995; Hoj and Jakobsen, 1994; Nieto-Sotelo *et al.*, 1990).

HSF1 possède également un domaine de régulation contrôlant le domaine d'activation de la transcription situé en c-terminal. HSF2 contient un domaine d'activation de la transcription contrôlé par plusieurs domaines régulateurs (Figure 3).

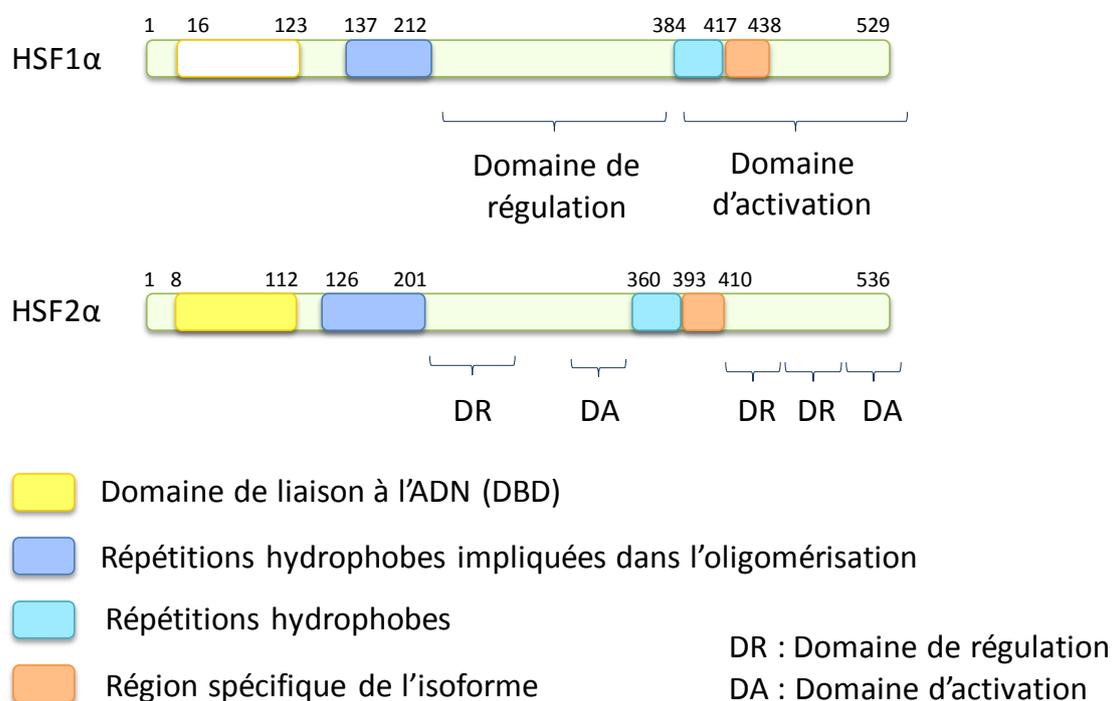


Figure 3. Structure de HSF1α et de HSF2α

## 2) Activation de HSF1

L'activation de HSF1 est un processus qui comprend trois grandes étapes : la trimérisation du facteur, la translocation dans le noyau et la liaison à l'ADN (Figure 4). Plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou la sumoylation régulent l'activité transcriptionnelle de HSF1.

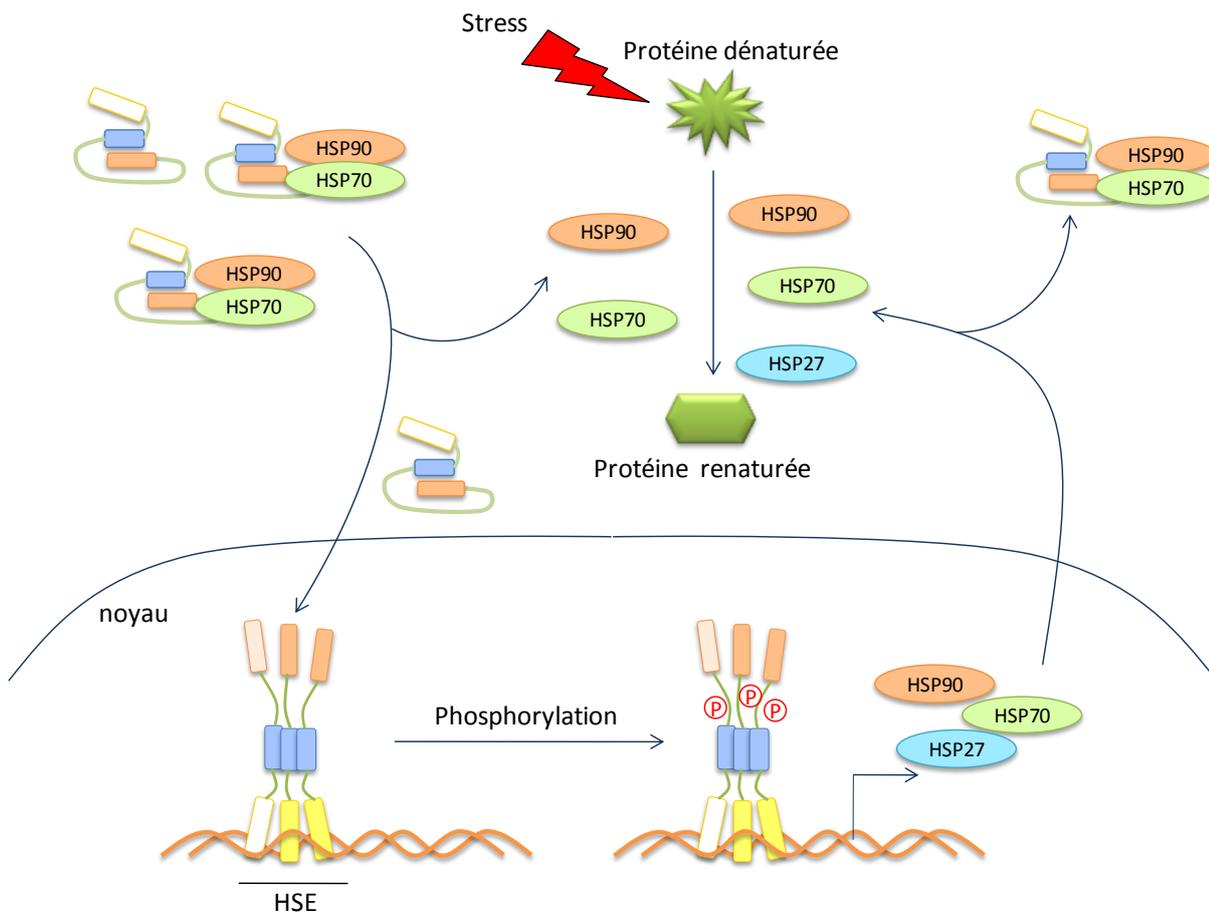


Figure 4. L'activation de HSF1. En l'absence de stress, HSF1 est retenu sous forme inactive par les protéines HSP70 et HSP90. Lors d'un stress, HSP70 et HSP90 vont se détacher de HSF1 afin de renaturer les protéines dénaturées. HSF1 ainsi libéré est transloqué dans le noyau où il se trimérise et se lie à l'ADN au niveau des éléments de réponses spécifiques, les HSE, situés dans le promoteur des gènes *hsp70*, *hsp90* et *hsp27*. Après phosphorylation, HSF1 induit l'expression des différentes HSPs favorisant ainsi la renaturation des protéines. Une fois les protéines renaturées, les HSPs retournent dans le noyau et détachent HSF1 des HSE permettant ainsi le retour à une situation normale.

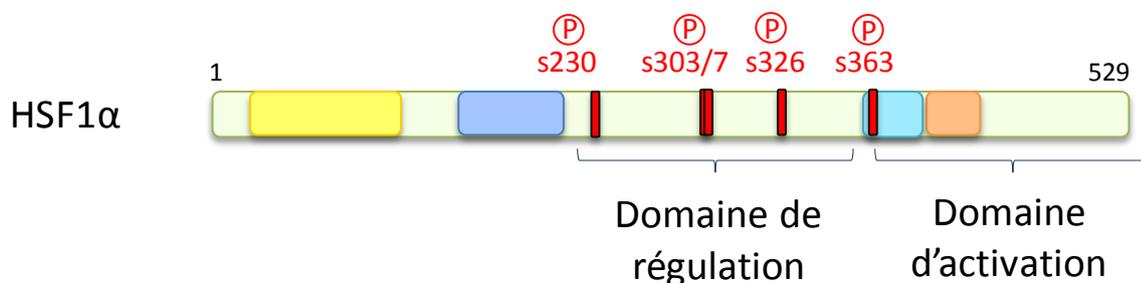
En absence de stress, HSF1 est localisé principalement dans le cytoplasme sous forme de monomères inactifs. Le domaine HR-C situé en c-terminal inhibe en effet la trimérisation par des interactions intramoléculaires (Rabindran *et al.*, 1993; Zuo *et al.*, 1994). HSF1 est également maintenu sous forme monomérique par plusieurs protéines. Les protéines de choc thermique HSP70 et HSP90, avec l'aide de plusieurs autres co-chaperon, « séquestrent » ainsi HSF1 sous sa forme inactive (Conde *et al.*, 2009; Voellmy, 2006; Voellmy and Boellmann, 2007). Les HSPs pourraient ainsi jouer un rôle de senseur en étant capable de détecter les protéines en voie de dénaturation ou d'agrégation lors d'un stress. Elles se détacheraient alors de HSF1 permettant ainsi sa trimérisation (Figure 4). L'environnement biochimique de HSF1 (la température, le pH) peut également jouer un rôle sur sa conformation (Mosser *et al.*, 1990; Zhong *et al.*, 1998). Lorsque le niveau des HSPs devient suffisamment élevé, une partie de ces HSPs retourne dans le noyau, interagit avec HSF1 et provoque le démantèlement des trimères de HSF1 (Voellmy, 2006).

L'activation et le rôle de HSF2 dans la réponse au choc thermique restent encore mal connus. HSF2 existe sous forme de dimères inactifs à l'état basal et se trimérise lors de la différenciation des cellules K562 par l'hémime (Sistonen *et al.*, 1994; Trinklein *et al.*, 2004). Des études d'inactivation de gènes ont révélé que lors d'un choc thermique HSF2 interagit avec HSF1 au niveau du promoteur de HSP70 pour former des hétérotrimères (Ostling *et al.*, 2007). L'interaction entre HSF1 et HSF2 semble également jouer sur l'activité transcriptionnelle de ces deux facteurs de transcription (Sandqvist *et al.*, 2009; Wilkerson *et al.*, 2008).

Une fois trimérisé, HSF1 se lie à l'ADN par son domaine de liaison à l'ADN au niveau de séquences définies appelées Heat Shock Elements ou HSE. Ces séquences correspondent à des répétitions inversées de la séquence nGAAn (Amin *et al.*, 1988). L'architecture de ces séquences ainsi que leur nombre au sein du promoteur pourraient jouer un rôle sur le recrutement spécifique des HSFs et sur leur activité (Sakurai and Takemori, 2007; Yamamoto *et al.*, 2009). La liaison des HSFs sur l'ADN provoque également des changements dans l'organisation de la structure chromatinienne (Fritah *et al.*, 2009; Inouye *et al.*, 2007; Tsukiyama *et al.*, 1994; Wu, 1980; Xu *et al.*, 2008).

La fixation des HSFs sur les HSE est indépendante de l'activité transcriptionnelle de HSF1. En effet, dans la levure, HSF1 est lié à l'ADN de manière constitutive mais n'a pas d'activité transcriptionnelle en absence de stimuli (Jakobsen and Pelham, 1988; Sorger and Pelham, 1988). Par ailleurs, dans les cellules de mammifères, un traitement par l'acétyle de sodium ou par des anti-inflammatoires non stéroïdiens entraîne la formation des trimères et la liaison à l'ADN de HSF1 sans induire son activité transcriptionnelle (Jurivich *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1995). Un évènement supplémentaire serait donc nécessaire pour induire l'activité transcriptionnelle de HSF1.

Les modifications post-traductionnelles de HSF1 sont ainsi essentielles à l'activité transcriptionnelle de HSF1. HSF1 peut être phosphorylé sur plusieurs résidus par différentes kinases (Figure 5). Les phosphorylations sur les résidus serine s303 et s307 situées dans le domaine régulateur de HSF1 semblent être impliquées dans la régulation négative de l'activité transcriptionnelle de HSF1 en absence de stress. Lors d'un stress, HSF1 devient hyperphosphorylé et l'augmentation de la phosphorylation au niveau de la serine 230 augmente l'activité transcriptionnelle de HSF1 (Voellmy, 2006).



Serine	Kinase	Fonction
s230	CaMk II	+ transactivation
s303/7	GSK3, ERK1/2, p38 MAPK, PKC	- transactivation
s326	n.d	+ transactivation
s363	JNK	- transactivation

Figure 5. Liste des différents résidus serine pouvant être phosphorylés ainsi que les kinases responsables de leur phosphorylation. n.d : non déterminé.

D'autres modifications post-traductionnelles ont été décrites comme jouant un rôle sur l'activité de HSF1 ou sa liaison à l'ADN. Ainsi l'activation de la déacétylase SIRT1 (sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1) prolonge la liaison de HSF1 sur le promoteur de HSP70 en maintenant HSF1 dans un état déacétylé capable de lier l'ADN. De plus la sous-expression de SIRT1 accélère la phase d'atténuation de la réponse au choc thermique et le relargage de HSF1 de son HSE (Westerheide *et al.*, 2009). La sumoylation de HSF1 diminue également l'activité transcriptionnelle de HSF1 (Brunet Simioni *et al.*, 2009). Ainsi plusieurs voies de signalisation cellulaire issues de stimuli différents peuvent contrôler l'expression des HSPs *via* l'activation de protéines régulant l'activité transcriptionnelle de HSF1.

### 3) Inhibition de HSF1

Il n'existe jusqu'à présent aucun inhibiteur de la réponse au choc thermique ciblant spécifiquement HSF1. Un certain nombre de composés limitent en revanche l'induction de l'expression des HSPs en jouant sur l'activité transcriptionnelle de HSF1 :

- Les bioflavonoïdes tels que la quercétine. La quercétine est un flavonoïde de type flavonol présents chez les plantes qui inhibe la synthèse des HSPs suite à un choc thermique. Son mécanisme d'action n'est pas très bien défini et semble dépendre du type cellulaire ainsi que de la nature du stress (Hansen *et al.*, 1997). La quercétine n'empêche pas la formation des trimères de HSF1 (Nagai *et al.*, 1995) et ne semble pas interférer avec la liaison à l'ADN. Elle modifie cependant la phosphorylation de HSF1 (Hansen *et al.*, 1997). Mais à la concentration utilisée dans ces études, la quercétine inhibe aussi plusieurs autres protéines et notamment des kinases. Une hypothèse serait que cette molécule inhiberait certaines protéines kinases responsables de la phosphorylation et de l'activation de HSF1 (Whitesell and Lindquist, 2009).

- Le KNK437, un composé synthétique de la famille des lactames. Il inhibe l'acquisition de la thermotolérance ainsi que l'expression des HSPs sans diminuer leur niveau basal (Yokota *et al.*, 2000). Son mécanisme d'action n'est également pas connu et

contrairement à la quercétine, ce composé n'interviendrait pas au niveau de la phosphorylation de HSF1 (Whitesell and Lindquist, 2009). C'est un inhibiteur plus puissant que la quercétine, un peu plus spécifique et moins toxique.

- Le triptolide, un diterpène tri-époxyde issu de la plante chinoise *Tripterygium wilfordii*. C'est à l'heure actuelle l'inhibiteur le plus efficace. Son mécanisme d'action est inconnu : il interfèrerait avec l'activité transcriptionnelle de HSF1 sans empêcher la formation des trimères, la phosphorylation ou la liaison à l'ADN de cette protéine (Westerheide *et al.*, 2006). Il est actuellement testé *in vivo* dans le traitement des cancers pancréatiques et des neuroblastomes (Antonoff *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2007).

### C) Les HSPs

L'activation de HSF1 permet l'expression des protéines de choc thermique. Chez les mammifères, les HSPs sont regroupées en six grandes familles en fonction de leur poids moléculaire : une de faible poids moléculaire (small HSPs ou sHSPs), la famille HSP47, HSP60, HSP70, HSP90 et HSP110. Bien que les HSPs partagent des propriétés communes, chaque famille présente des particularités concernant par exemple leur localisation intracellulaire, leur dépendance vis à vis de l'ATP (Adénosine triphosphate), leur expression basale ou leur induction par un stress. Dans les cellules de mammifères, HSP60 et HSC70 (Heat Shock Cognate 70) sont exprimées de façon constitutive alors que HSP27 et HSP70 sont fortement induites lors de nombreux stress cellulaires.

Nous n'aborderons ici que les trois principales familles de protéines de choc thermique les plus étudiées : HSP27, HSP70 et HSP90 (HSPB, HSPA et HSPC avec la nouvelle nomenclature: [Tableau 1](#)).

La famille des petites protéines de choc thermique : HSPB

Nom du gène	Nom de la protéine	Anciens noms	ID du gène humain
<i>hsp1</i>	HSPB1	HSP27, HSP25	3315
<i>hsp2</i>	HSPB2	MKBP, HSP27	3316
<i>hsp3</i>	HSPB3	HSPL27	8988
<i>hsp4*</i>	HSPB4	$\alpha$ -A cristalline , CRYAA, CRYA1	1409
<i>hsp5*</i>	HSPB5	$\alpha$ -B cristalline , CRYAB, CRYA2	1410
<i>hsp6</i>	HSPB6	HSP20	126393
<i>hsp7</i>	HSPB7	cvHSP	27129
<i>hsp8</i>	HSPB8	H11, HMN2, HSP22	26353
<i>hsp9</i>	HSPB9	FLJ27437	94086
<i>hsp10*</i>	HSPB10	ODF, ODF1, RT7, ODF2, SODF	4956
<i>hsp11</i>	HSPB11	HSP16.2	51668

La famille HSP70 : HSPA

Nom du gène	Nom de la protéine	Anciens noms	ID du gène humain
<i>hspa1a</i>	HSPA1A	HSP70-1, HSP72, HSPA1, HSP70	3303
<i>hspa1b</i>	HSPA1B	HSP70-2	3304
<i>hspa1l</i>	HSPA1L	HSC70t, hum70t, HSP-hom	3305
<i>hspa2</i>	HSPA2	HSP70.2	3306
<i>hspa5</i>	HSPA5	BIP, GRP78, MIF2	3309
<i>hspa6</i>	HSPA6	Heat-shock protein-6	3310
<i>hspa7</i>	HSPA7	Heat-shock protein-7	3311
<i>hspa8</i>	HSPA8	HSC70, HSP71, HSP73	3312
<i>hspa9</i>	HSPA9	GRP75, mortaline	3313
<i>hspa12a</i>	HSPA12A	FLJ13874	259217
<i>hspa12b</i>	HSPA12B	RP23-32L15.1	116835
<i>hspa13*</i>	HSPA13	Stch	6782
<i>hspa14</i>	HSPA14	HSP70-4, HSP70L1	51182

La famille HSP90 : HSPC

Nom du gène	Nom de la protéine	Anciens noms	ID du gène humain
<i>hspc1*</i>	HSPC1	HSP90AA1, HSP90 $\alpha$ , HSPN, HSP86, HSP90, HSP90A, HSP90N	3320
<i>hspc2*</i>	HSPC2	HSP90AA2, HSP90 $\alpha$	3324
<i>hspc3*</i>	HSPC3	HSP90AB1, HSPC2, HSP90B, HSP90 $\beta$	3326
<i>hspc4*</i>	HSPC4	HSP90B1, GP96, GP94, endoplasmine	7184
<i>hspc5*</i>	HSPC5	TRAP1, HSP75, HSP90L	101310

Tableau 1. Nomenclature des différentes HSPs. Adapté de (Kampinga *et al.*, 2009) \* : pas encore de consensus au sein de la communauté scientifique.

## 1) La famille des petites HSPs

Les protéines de choc thermique de faible poids moléculaire (entre 15 et 30 kDa) ou sHSP forment une famille ubiquitaire et abondante. Elles partagent des homologies de séquence et des propriétés biochimiques telles que la phosphorylation et l'oligomérisation. Ces chaperons moléculaires ont une activité indépendante de l'ATP et protègent les cellules de l'agrégation des protéines (Ehrnsperger *et al.*, 1997). Il existe une dizaine de sHSP chez l'homme, les plus étudiées étant HSP27 (HSPB1), l' $\alpha$ -A-cristalline et l' $\alpha$ -B-cristalline. Contrairement aux protéines de choc thermique de poids moléculaire plus élevé, les sHSPs ne sont pas très conservées entre les espèces. Elles partagent cependant un domaine récurrent, le domaine  $\alpha$ -cristallin, qui présente un fort pourcentage d'identité avec les protéines  $\alpha$ -cristallines, composantes abondantes du cristallin (Ingolia and Craig, 1982).

HSP27 est le membre le plus étudié de cette famille. HSP27 comporte un motif WDPF en amino-terminal, permettant la formation de grands oligomères, et un domaine carboxy-terminal nécessaire à la stabilisation de ces structures oligomériques (Figure 6). HSP27 peut en effet s'oligomériser et former des structures de haut poids moléculaire pouvant aller jusqu'à 800 kDa. Le dimère de HSP27 est l'élément de base pour l'assemblage des complexes multimériques. L'oligomérisation est un processus dynamique qui dépend du statut de phosphorylation de la protéine (Bruey *et al.*, 2000) (Figure 6). HSP27 peut être phosphorylée au niveau des résidus serines en position 15, 78 et 82 par la MK2 (MAPKAP kinase 2) elle-même activée par la p38 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Stokoe *et al.*, 1992; Theriault *et al.*, 2004). La phosphorylation de HSP27 entraîne la formation de petits oligomères.

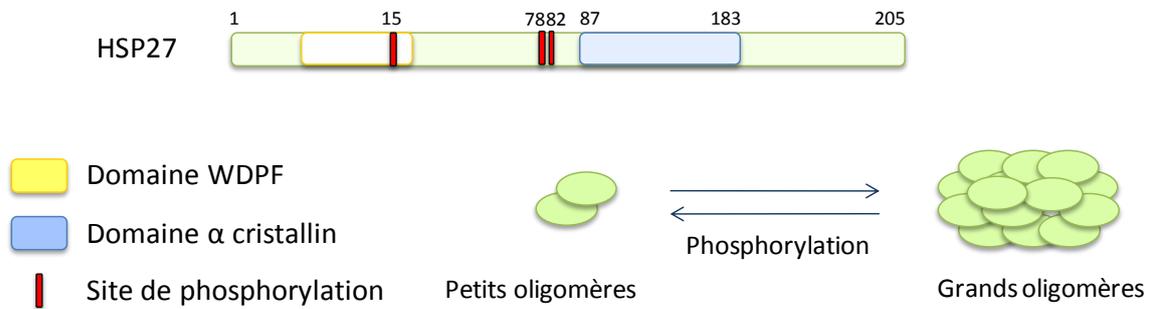


Figure 6. HSP27 : structure et équilibre entre petits et grands oligomères.

HSP27 est une protéine très ubiquitaire. Elle peut être exprimée dans de nombreux types cellulaires, à des stades spécifiques du développement et de la différenciation (Garrido *et al.*, 1998). Son expression basale est faible et augmente fortement en cas de stress.

L'activité chaperon de HSP27 est liée à son statut d'oligomérisation. Sous la forme de grands oligomères, HSP27 se lie aux protéines dénaturées, permet à ces protéines de retrouver leur structure tridimensionnelle correcte et empêche l'agrégation des protéines (Ehrnsperger *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Rogalla *et al.*, 1999; Shashidharamurthy *et al.*, 2005). HSP27 est aussi capable d'inhiber la synthèse protéique lors d'un choc thermique en interagissant avec le facteur eIF4G (elongation Initiator Factor 4G) essentiel à la traduction de nombreux ARN messagers (Cuesta *et al.*, 2000). Ce phénomène permet à la cellule d'éviter l'accumulation de protéines anormalement conformées et d'agrégats toxiques en condition de stress.

Mon équipe a également montré que HSP27, sous forme de petits oligomères, peut se lier à l'ubiquitine et favoriser lors d'un stress la dégradation par le protéasome de certaines protéines telles que I $\kappa$ B $\alpha$ , inhibiteur du facteur de survie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) ou p27<sup>Kip1</sup>, inhibiteur des CDK (Cyclin-Dependent Kinases) (Parcellier *et al.*, 2006; Parcellier *et al.*, 2003). D'autre part, en condition de stress, les petits oligomères de HSP27 entrent dans le noyau, forment de grands oligomères et induisent la sumoylation de HSF1. HSP27 peut également se lier aux protéines du cytosquelette : elle interagit avec les molécules de F-actine afin d'empêcher la perturbation du cytosquelette lors d'un stress (Paul *et al.*, 2010). Elle est également fortement impliquée dans la protection de la cellule après un stress oxydant en réduisant le taux des espèces réactive oxygénées (Arrigo *et al.*, 2005; Rogalla *et al.*, 1999).

## 2) HSP70

Les membres de la famille HSP70 représentent les HSPs les plus nombreuses et les plus conservées. Cette famille comprend différents membres présentant un fort pourcentage d'identité entre eux et entre les organismes (50 % entre le gène *hsp70* humain et son équivalent chez E-Coli, 70 % avec celui de drosophile) (Hunt and Morimoto, 1985). Certaines protéines de cette famille sont exprimées constitutivement dans la cellule. C'est le cas des protéines HSC70, HSP70.2, GRP75 (Glucose-Regulated Protein 75), GRP78 et HSP70-1t. D'autres, telles que HSP70 (HSP72) ou HSP70-6 sont induites lors de stress cellulaires (Daugaard *et al.*, 2007) (Tableau 2).

### La famille HSP70 : HSPA

Noms	Anciens noms	% d'identité envers HSPA1A	Numéro d'accension	Localisation chromosomique	Localisation cellulaire	Induite par le stress
HSPA1A	HSP70-1, HSP72, HSPA1, HSP70	100	NM_005345	6p21.3	Cytosol, Noyaux, Lysosomes	oui
HSPA1B	HSP70-2	99	NM_005346	6p21.3	Cytosol, Noyaux, Lysosomes	oui
HSPA1L	HSC70t, hum70t, HSP-hom	91	NM_005527	6p21.3	Cytosol, Noyaux	non
HSPA2	HSP70.2	84	NM_021979	14q24.1	Cytosol, Noyaux	non
HSPA5	BIP, GRP78, MIF2	64	NM_005347	9q33-q34.1	Reticulum endoplasmique	non
HSPA6	Heat-shock protein-6	85	NM_002155	1cen-qter	Cytosol, Noyaux	oui
HSPA8	HSC70, HSP71, HSP73	86	NM_006597	11q23.3-q25	Cytosol, Noyaux	non
HSPA9	GRP75, mortaline	52	NM_004134	5q31.1	Mitochondries	non

Tableau 2. Informations sur les membres de la famille HSP70.

a) Les principales protéines constitutives de la famille HSP70

- HSC70t (HSPA1L) et HSP70.2 (HSPA2)

HSC70t ou HSP70-hom chez l'homme est retrouvée principalement dans les testicules dans les spermatides en élongation (Tsunekawa *et al.*, 1999). Cette protéine n'est pas inductible, le promoteur du gène ne contenant pas de HSE. Le rôle de HSC70t dans la spermatogenèse est très peu connu mais le fait que le testicule soit maintenu à une température plus basse que le reste de l'organisme pourrait justifier l'existence de ce chaperon. HSC70t est également retrouvée dans l'épithélium olfactif où elle augmente l'expression de récepteurs olfactifs (Neuhaus *et al.*, 2006).

HSP70.2 (HSPA2) est exprimée faiblement et de manière constitutive dans la plupart des tissus mais elle est plus particulièrement abondante dans les testicules et le cerveau (Bonnycastle *et al.*, 1994; Son *et al.*, 2000). Son expression est fréquemment fortement diminuée chez les hommes dont la spermatogenèse est anormale (Son *et al.*, 2000). De plus, les souris mâles invalidées pour le gène *hspa1b* sont stériles à cause d'une apoptose massive des cellules germinales (Dix *et al.*, 1996). Dans les spermatocytes de souris, elle est impliquée dans le phénomène de méiose (Govin *et al.*, 2006).

- GRP78 (HSPA5)

Cette protéine est localisée dans le réticulum endoplasmique des cellules. Elle permet le transport et le repliement des protéines nouvellement synthétisées dans la lumière du réticulum (Munro and Pelham, 1986). GRP78 contient un signal présumé de localisation dans le réticulum dans sa partie N-terminale et peut être induite par des stress réticulaires (Gething, 1999). GRP78 est exprimée de manière abondante dans toutes les cellules et plus particulièrement dans les cellules sécrétrices telles que les îlots pancréatiques. Les souris invalidées pour le gène meurent au stade embryonnaire soulignant le rôle essentiel de GRP78 dans la cellule (Luo *et al.*, 2006).

- HSC70 (HSPA8)

HSC70 est exprimée dans la plupart des tissus de l'organisme et n'est que très peu induite lors d'un choc thermique. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, notamment dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées, dans le transport des protéines à travers les membranes, dans la prévention de la formation des agrégats protéiques lors d'un stress, dans l'autophagie ou dans la dissociation des cages de clathrine entourant les vésicules d'endocytose et d'exocytose (Daugaard *et al.*, 2007; Eisenberg and Greene, 2007; Lindquist and Craig, 1988). HSC70 est ainsi essentielle au bon fonctionnement des cellules : les souris invalidées pour le gène *hspa8* ne sont pas viables (Florin *et al.*, 2004) et la déplétion de la protéine par interférence à ARN entraîne une mort massive dans de nombreux types cellulaires (Rohde *et al.*, 2005).

La fonction de chaperon de HSC70 n'est pas limitée aux protéines. HSC70 est en effet capable de se lier aux éléments riches en adénine et uracile dans la région 3' non traduite de l'ARN messager de Bim dans les cellules rouges, permettant ainsi la stabilisation de l'ARN messager de cette protéine pro-apoptotique (Matsui *et al.*, 2007).

- GRP75 (HSPA9)

Cette protéine comporte dans sa séquence un signal spécial permettant son transport dans la matrice de la mitochondrie. C'est en effet une protéine mitochondriale qui participe au repliement des protéines après leur passage à travers les membranes (Mizzen *et al.*, 1989; Ostermann *et al.*, 1990).

b) Les protéines inductibles de la famille HSP70 : la protéine HSP70 (HSPA1)

HSP70 est issue de deux gènes, *hsp70.1 (hspa1a)* et *hsp70.3 (hspa1b)*, situés sur le chromosome 6 et dont les loci sont très proches (Gunther and Walter, 1994; Milner and Campbell, 1990). Ils ne comportent pas d'intron et sont fortement inductibles par un stress. Ces deux gènes vont permettre l'expression des protéines HSPA1A et HSPA1B regroupées indifféremment sous le nom de HSP70. Lors d'un stress, le facteur de transcription HSF1 se

lie au niveau du promoteur des gènes *hsp70.1* et *hsp70.3* et induit rapidement une forte expression de HSP70.

HSP70 est la protéine de choc thermique inductible par excellence. Dans des conditions physiologiques, HSP70 est un chaperon moléculaire dépendant de l'ATP. Elle facilite le repliement des polypeptides nouvellement synthétisés, participe à l'assemblage de complexes multiprotéiques et au transport des protéines dans la cellule. Lors d'un stress cellulaire, de nombreuses protéines perdent leur conformation tridimensionnelle adéquates et leurs fonctions. Certaines peuvent également s'accumuler dans la cellule et former des agrégats insolubles nocifs pour la cellule. HSP70 est alors recrutée pour prévenir cette agrégation ou pour diriger ces protéines vers le protéasome en vue de leur dégradation.

HSP70 est principalement cytosolique, mais peut être relocalisée dans le noyau lors d'un stress ou elle participe notamment à l'assemblage et la translocation des ribosomes (Velazquez and Lindquist, 1984; Welch and Suhan, 1986). Dans des conditions normales, HSP70 est exprimée différemment selon le type cellulaire et la phase du cycle cellulaire (Taira *et al.*, 1997).

HSP70 comporte deux domaines principaux (Figure 7) :

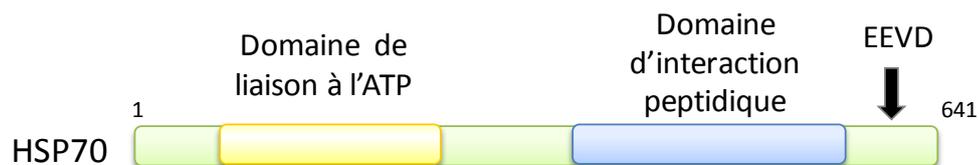


Figure 7. Structure de HSP70.

- Un domaine de liaison à l'ATP (ATP Binding Domain ou ABD)
- Un domaine d'interaction peptidique (Peptide Binding Domain, PBD) en c-terminal riches en glycines et prolines comprenant un motif EEVD permettant la liaison avec d'autres protéines co-chaperons (domaine TPR).

### c) HSP70 : un chaperon moléculaire

La prise en charge des protéines substrats par HSP70 se fait par reconnaissance d'une séquence consensus enrichie en résidus hydrophobes du substrat par le PBD. Le PDB est constitué d'un feuillet  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$  formant une sorte de « couvercle ». Lorsqu'elle est liée à l'ATP, HSP70 adopte une conformation ouverte et permet l'entrée du substrat. L'hydrolyse de l'ATP entraîne alors la fermeture et la stabilisation du substrat. L'arrivée d'une nouvelle molécule d'ATP provoque ensuite l'ouverture de HSP70 et la libération de la protéine (Figure 8) (Hartl and Hayer-Hartl, 2009).

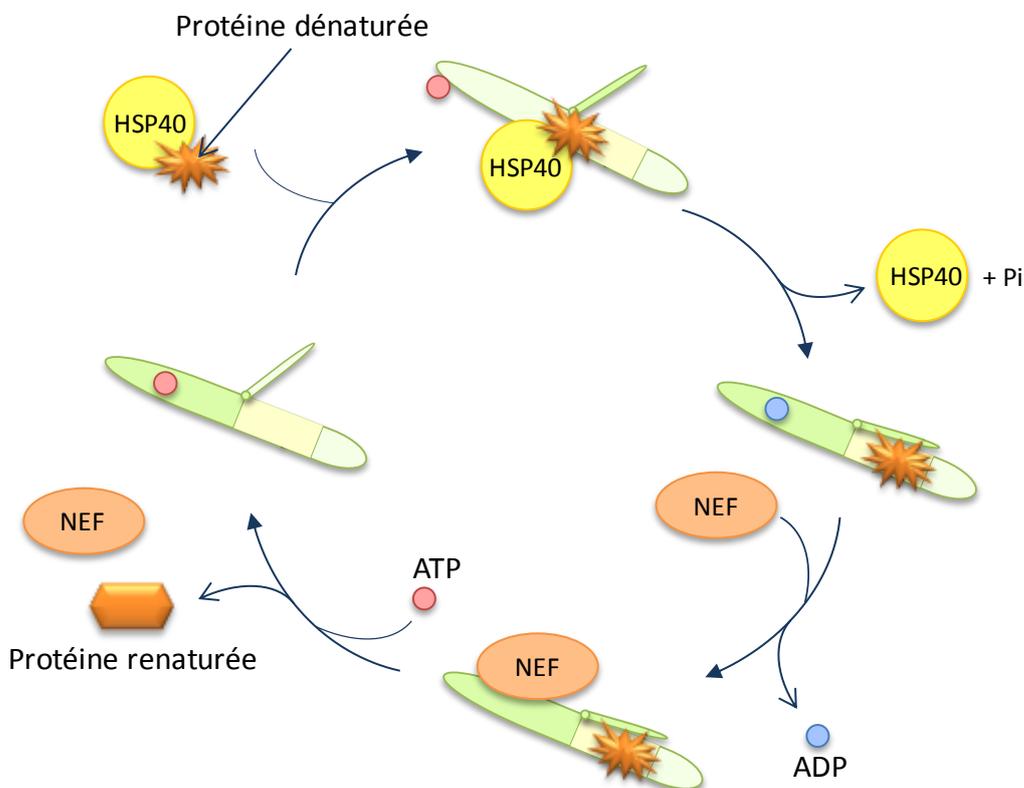


Figure 8. Modèle de l'activité chaperon de HSP70. La protéine substrat est apportée à HSP70 par le co-chaperon HSP40. L'hydrolyse de l'ATP entraîne la « fermeture » de HSP70, la fixation de la protéine substrat sur HSP70 et sa stabilisation. Des facteurs d'échange nucléotidique (NEF) permettent alors la dissociation de l'ADP. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP permet « l'ouverture » de HSP70 et la libération de la protéine substrat. Pi : phosphate inorganique.

Les mécanismes de retour à une conformation tridimensionnelle adéquate restent cependant assez mal connus. Les protéines dénaturées ou nouvellement synthétisées ont tendance à se renaturer naturellement. Les chaperons moléculaires tels que HSP70 pourraient alors favoriser ce retour en accélérant la cinétique de repliement (Hartl and Hayer-Hartl, 2009).

Une fois libérée par HSP70, la protéine substrat peut emprunter différentes voies :

- Elle peut être définitivement libérée et remplir sa fonction de protéine.
- Si sa conformation n'est toujours pas adéquate, elle peut être re-chaperonnée par HSP70 et suivre le cycle vu précédemment
- Si le repliement est plus complexe, elle peut être acheminée vers d'autres systèmes de chaperonnage : les chaperonines (HSP60) ou bien le complexe impliquant HSP90
- Elle peut être dégradée par le protéasome.

La décision dépend donc du degré de complexité du repliement mais également des co-chaperons recrutés par HSP70. HSP70 est assistée d'un co-chaperon, HSP40, constitué entre autre d'un domaine J. HSP40 peut lier directement le polypeptide à prendre en charge et le transférer au domaine PBD de HSP70, puis stimuler l'hydrolyse de l'ATP grâce à son domaine J (Hennessy *et al.*, 2005). Des facteurs d'échange nucléotidique (NEF) tels que BAG-1 (Bcl-2-associated athanogene) ou HSP110 se lient au domaine ATPase de HSP70 et catalysent l'échange ATP – ADP (Alberti *et al.*, 2003; Andreasson *et al.*, 2008) (Figure 8). Classiquement, les co-chaperons possèdent 2 fonctions principales : ils peuvent soit réguler l'activité ATPasique de HSP70 et son affinité pour son substrat, soit recruter d'autres complexes protéiques mais ils peuvent également faire les deux. Par exemple la fixation de la protéine Hop (HSP70/HSP90 Organizing Protein) va permettre le recrutement de HSP90 et le transfert du substrat d'un complexe protéique à un autre. La protéine CHIP (C-terminus of Hsc70/HSP70 interacting protein) va quand elle bloquer l'activité ATPase de HSP70 et va participer à l'ubiquitinylation et à la dégradation par le protéasome de la protéine substrat (Hohfeld *et al.*, 2001). Ainsi la fixation spécifique des co-chaperons va déterminer le devenir de la protéine substrat : le recrutement des co-chaperons Hip (HSC70 Interacting Protein) et

Hsp va par exemple favoriser le repliement de la protéine substrat alors que les protéines BAG-1 et CHIP vont au contraire entrainer sa dégradation par le protéasome (Revue citée en annexe I : *Heat shock proteins: cell protection through protein triage*, Lanneau, 2010) (Figure9).

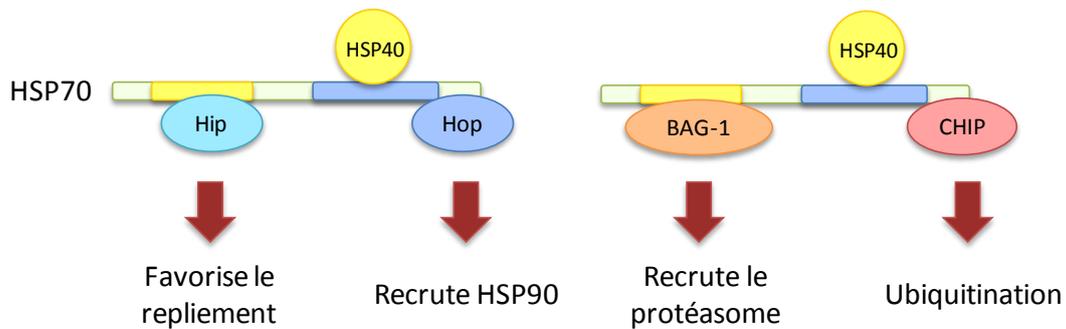


Figure 9. Exemples de différents complexes de HSP70. La fixation du co-chaperon Hip au niveau du domaine ATPase de HSP70 ou celle de Hop sur le domaine TPR favorise le repliement de la protéine substrat en la stabilisant et en recrutant le complexe impliquant HSP90. Le co-chaperon BAG-1 est un facteur d'échange nucléotidique et entre en compétition avec Hip pour se fixer sur HSP70. CHIP est une ubiquitine ligase. BAG-1 et CHIP favorisent la dégradation de la protéine substrat en permettant le recrutement du protéasome et l'ubiquitination de la protéine substrat.

L'activité biologique de nombreuses protéines dépend de HSP70. HSP70, en stabilisant certaines kinases ou certains facteurs de transcription, participe au bon fonctionnement des voies de signalisation cellulaire. Elle est ainsi impliquée dans la transduction du signal, dans la régulation du cycle cellulaire ou dans les phénomènes de mort cellulaire ou de différenciation. HSP70 jouerait donc un rôle essentiel dans plusieurs pathologies telles que les maladies neuro-dégénératives, les maladies auto-immunes ou le cancer (Guzhova and Margulis, 2006).

#### d) Inhibition de HSP70

HSP70 est souvent surexprimée dans les cellules cancéreuses. Elle protège ces dernières de la mort cellulaire induite par différents agents anticancéreux, notamment grâce

à sa capacité à prévenir l'apoptose (Garrido *et al.*, 2006). L'inhibition de HSP70 apparaît alors comme une stratégie très intéressante dans le traitement des cancers.

Contrairement à HSP90, il n'existait pas jusqu'à très récemment des molécules inhibant de manière spécifique HSP70. Des inhibiteurs de la réponse au choc thermique tels que la quercétine ou le triptolide étaient alors utilisés afin de bloquer l'expression de HSP70 *via* l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de HSF1. Plusieurs molécules inhibitrices de HSP70 ont été cependant récemment identifiées (Powers *et al.*, 2010). Le premier inhibiteur, la pifithrine- $\mu$  (PFT $\mu$ , PES ou PAS) a d'abord été caractérisé en tant qu'agent inhibant la fixation de la protéine p53 à la mitochondrie en réduisant son affinité pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-xl et Bcl-2 (Strom *et al.*, 2006). L'analyse approfondie des cibles de la pifithrine- $\mu$  a révélé par la suite que cette molécule interagit avec HSP70, bloque l'interaction entre HSP70, ses co-chaperons et ses substrats et supprime le développement tumoral (Leu *et al.*, 2009). Une autre molécule dérivée de l'adénosine a été identifiée grâce à l'étude de la structure du domaine de fixation de l'ATP de HSP70 par cristallographie aux rayons X et par bioinformatique (Williamson *et al.*, 2009). Ce composé, le VER-155008 induit l'apoptose dans des cellules du cancer du sein et potentialise l'action apoptotique d'un inhibiteur de HSP90, le 17-AAG (17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycine) (Massey *et al.*, 2009).

Mon équipe a également développé différents inhibiteurs de HSP70. Nous avons élaboré un mutant de délétion de la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) capable d'interagir avec HSP70. Ce dérivé, nommé ADD70 (AIF Derived Decoy for HSP70), a montré une bonne sensibilisation des cellules cancéreuses à la mort induite par des agents chimiothérapeutiques (Schmitt *et al.*, 2006). Cependant sa grande taille limite son utilisation en clinique. Nous avons alors développé des aptamères peptidiques capables d'inhiber efficacement HSP70. Ces peptides augmentent la sensibilité des cellules cancéreuses à la mort induite par le cisplatine *in vitro* ainsi que dans des modèles de cancer chez la souris et le rat (Rerole *et al.*, article soumis).

### 3) HSP90

La famille HSP90 se compose de quatre membres principaux : HSP90 $\alpha$ , HSP90 $\beta$ , GP96 et TRAP1.

#### a) GP96 et TRAP1

- GP96

GP96 (GlycoProtéine 96) ou GRP94 est présente chez les vertébrés et quelques invertébrés tels que *Caenorhabditis elegans* mais est absente chez les bactéries, les levures ou la drosophile (Arrigo *et al.*, 2005). C'est une glycoprotéine de 96 kda présente en abondance dans le réticulum endoplasmique grâce à une séquence de rétention située en c-terminal (Maki *et al.*, 1990) et également exprimée à la surface des cellules (Robert *et al.*, 1999). Cette protéine est présente constitutivement dans toutes les cellules mais son expression peut être augmentée suite à un stress réticulaire (Bush *et al.*, 1997).

GP96 est un chaperon moléculaire responsable de la maturation des protéines (Yang and Li, 2005). Depuis quelques années, GP96 est devenue la cible de nombreuses études concernant son rôle dans le système immunitaire. GP96 participe en effet à la présentation des antigènes, notamment en chaperonnant les antigènes tumoraux (Multhoff, 2006). Un vaccin basé sur GP96 isolé à partir de tumeurs de patients est par ailleurs en essais clinique de phase III dans le traitement de certains cancers (Testori *et al.*, 2008).

- TRAP1

TRAP1 (Tumor Necrosis Factor Receptor–Associated Protein 1) est une protéine dépendante de l'ATP située dans la mitochondrie dont la fonction reste mal connue. Bien que très proche de HSP90, elle n'interagit pas directement avec les protéines clientes et les co-chaperons classiques de HSP90 (Felts *et al.*, 2000).

## b) HSP90 : structure

HSP90 $\alpha$  et HSP90 $\beta$  sont les membres principaux de la famille HSP90. Ces deux isoformes sont issues d'une duplication du gène originel au cours de l'évolution (Gupta, 1995) et présentent environ 86 % d'identité entre elles. Pendant de nombreuses années, la plupart des études ne faisaient pas la différence entre ces deux protéines, le terme HSP90 faisait et fait alors indistinctement référence aux deux isoformes (Chen *et al.*, 2005). HSP90 est une protéine de stress essentielle à la survie des cellules eucaryotes. C'est une des protéines les plus abondantes de la cellule puisqu'elle représente environ 1% des protéines totales et son expression peut être induite par un stress (Csermely *et al.*, 1998).

HSP90 est constituée de trois grandes régions (Figure 10):

- Un domaine N-terminal correspondant au site de fixation principal de l'ATP
- Un domaine central impliqué dans la reconnaissance des protéines clientes
- Un domaine C-terminal responsable de la dimérisation (Figure 10). L'ATP peut également se fixer au niveau d'un deuxième site situé en c-terminal lorsque le premier est occupé (Soti *et al.*, 2002).

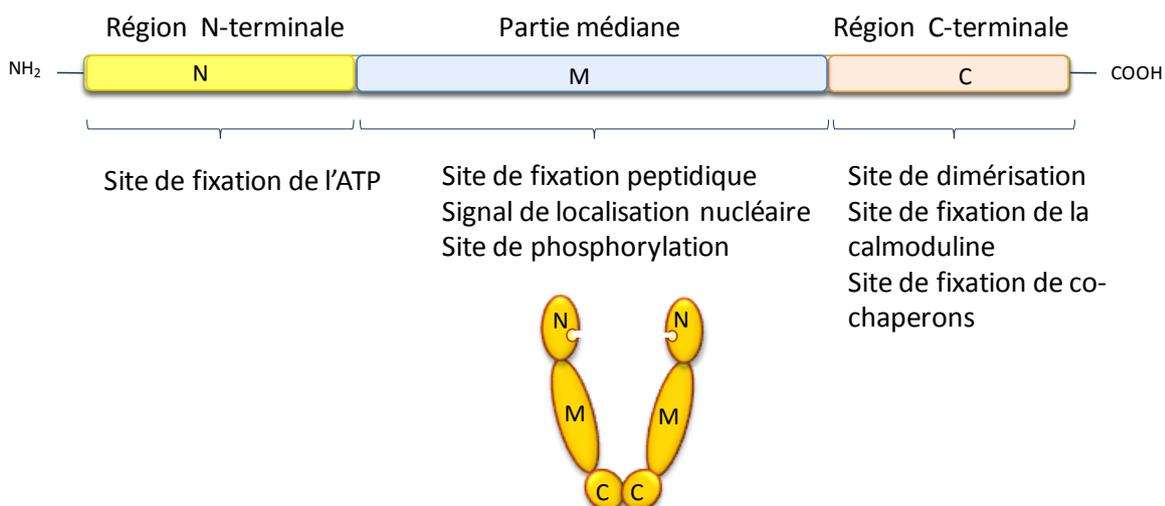


Figure 10. Structure de HSP90. N : domaine N-terminal, M : domaine central, C : domaine C-terminal.

La dimérisation de HSP90 est nécessaire à ses diverses fonctions (Minami *et al.*, 1994). C'est principalement sous forme d'homodimères  $\alpha$ - $\alpha$  ou  $\beta$ - $\beta$  que HSP90 est active mais elle existe également des formes hétérodimériques ainsi que des formes monomériques (essentiellement la forme  $\beta$ ). HSP90 s'associe alors à d'autres protéines afin de former des complexes impliqués dans le processus de repliement des protéines (Pratt and Toft, 2003).

#### c) HSP90 : fonction

HSP90 stabilise de très nombreuses protéines appelées « protéines clientes de HSP90 ». A l'heure actuelle plus de cent protéines clientes ont été identifiées. Néanmoins, HSP90 semble plus particulièrement impliquée dans le chaperonnage de 2 grandes classes de protéines :

- Les facteurs de transcription. Elle intervient dans la maturation et la régulation de l'activité de plusieurs facteurs de transcription, notamment les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Picard *et al.*, 1990).

- Les protéines kinases. Elle participe à la stabilisation et à l'activation des protéines kinases telle que Akt/PKB (Protéine Kinase B), v-Src kinase ou Raf Kinase (Csermely *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000).

HSP90 est également impliquée dans la stabilisation du cytosquelette en s'associant à la fois à l'actine et la tubuline. L'interaction avec les microfilaments permet de préserver l'intégrité cellulaire après un stress et le transport intra-cytoplasmique de protéines (Czar *et al.*, 1996; Pratt, 1992).

L'association de HSP90 avec ses protéines clientes est régulée par l'ATP. HSP90 se comporte comme une "pince" en piégeant sa protéine cliente entre ses monomères. La fixation puis l'hydrolyse de l'ATP induisent des changements conformationnels de HSP90 et entraînent la stabilisation de sa protéine cliente au bout de plusieurs cycles (Figure 11) (Pearl and Prodromou, 2006).

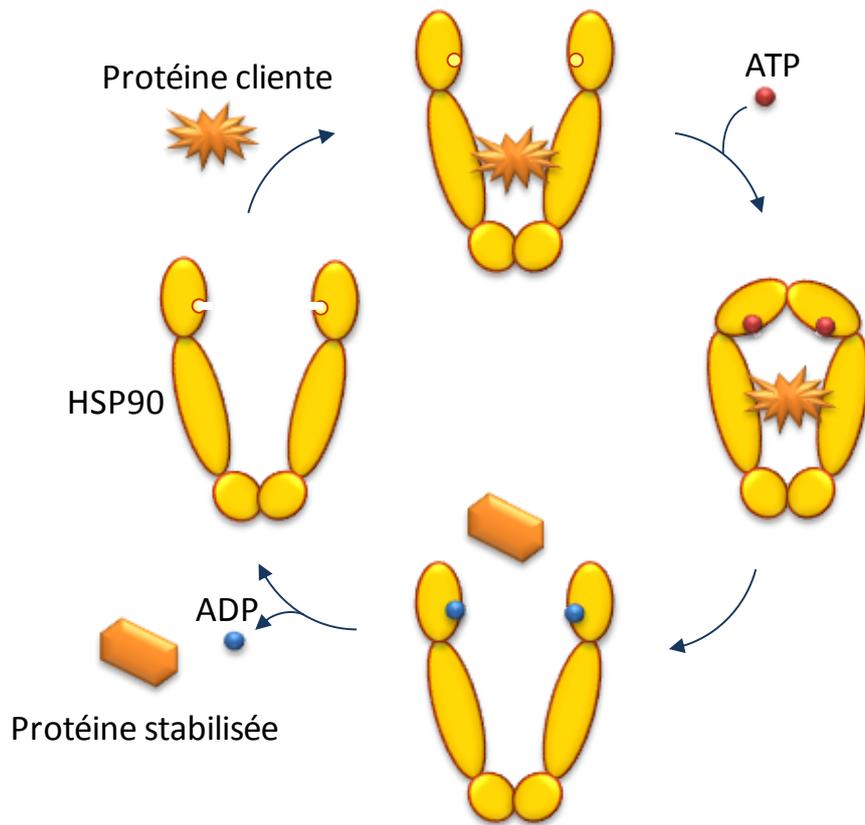


Figure 11. Modèle de l'activité chaperon de HSP90. La fixation de l'ATP sur son site induit des changements de conformation de HSP90. La protéine cliente de HSP90 est alors piégée et rendue à nouveau active. L'hydrolyse de l'ATP provoque la libération de la protéine cliente. D'après (Pearl and Prodromou, 2006).

L'activité chaperon de HSP90 dépend de nombreuses protéines co-chaperons. Le motif EEVD présent dans le domaine c-terminal de HSP90, reconnu par le domaine TPR (Tetratricopeptide Repeat) de certains co-chaperons, permet leur fixation sur HSP90 (Pearl and Prodromou, 2006). Le co-facteur Hop permet le recrutement du complexe HSP70/HSP40 et l'arrivée de la protéine cliente. D'autres co-chaperons jouent sur la conformation de HSP90 et son activité ATPasique de HSP90. Ainsi Cdc37 et p23 ont un effet inhibiteur alors que Aha1 ou Crp6 augmente cette activité ATPasique (Wandinger *et al.*, 2008).

Les modifications post-traductionnelles de HSP90 telles que son acétylation, sa s-nitrosylation ou sa phosphorylation régulent également l'activité de HSP90. L'acétylation de HSP90 inhibe par exemple l'activité chaperon de HSP90 (Bali *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2005). Des inhibiteurs d'histones deacetylases (HDAC) tels que la Trichostatine A (TSA) entraînent une hyperacétylation de HSP90 et une diminution des interactions entre HSP90, ses co-chaperones et certaines de ses protéines clientes qui restent alors non-fonctionnelles (phénomène décrit pour le récepteur aux glucocorticoïdes (Kovacs *et al.*, 2005)). La s-

nitrosylation de HSP90 par l'oxyde nitrique (NO) modifie la cystéine 597 de HSP90 et diminue son activité ATPasique (Martinez-Ruiz *et al.*, 2005).

Bien que le mécanisme de fonctionnement de HSP90 soit relativement bien connu (il existe de nombreuses structures en trois dimensions obtenues par cristallographie aux rayons X montrant les différents états de HSP90), les conditions de recrutement des co-chaperons et la spécificité des protéines clientes restent un mystère.

#### d) Différences entre HSP90 $\alpha$ et HSP90 $\beta$

HSP90 $\alpha$  et HSP90 $\beta$  partagent 86% d'identité entre elles et diffèrent par leur composition en amino-acides dans leur région C-terminale. HSP90 $\alpha$  est inductible par plusieurs stress externes et représente la forme minoritaire tandis que HSP90 $\beta$  est majoritaire et exprimée de manière constitutive (Sreedhar *et al.*, 2004).

L'étude de ces isoformes lorsqu'elles sont exprimées dans la levure en tant que seule source de HSP90 a révélé des différences dans leur capacité à activer certaines protéines clientes. Dans ce contexte, l'isoforme  $\beta$  a montré une plus forte sensibilité au radicicol, un inhibiteur de HSP90 (Millson *et al.*, 2007). De plus il a été montré récemment que la protéine GCUNC45 est un co-chaperon spécifique de HSP90 $\beta$  (Chadli *et al.*, 2008).

Ces isoformes semblent également jouer un rôle différent dans le développement des organismes. Au cours du développement de l'embryon de souris, HSP90 $\beta$  est présent dans tous les stades et dans la plupart des cellules alors que HSP90 $\alpha$  est plus particulièrement présente dans les hépatoblastes, les épithelia et les cellules germinales primordiales. L'invalidation du gène HSP90 $\beta$  chez la souris est létale suite à des altérations de la différenciation des trophoblastes et du développement du placenta (Voss *et al.*, 2000), bien que le niveau de HSP90 $\alpha$  ne soit pas modifié. Ainsi, bien que HSP90 $\alpha$  soit exprimée normalement, elle n'arrive pas à compenser la perte en HSP90 $\beta$  (Voss *et al.*, 2000).

Il semblerait que HSP90 $\alpha$  soit plus particulièrement impliquée dans la protection de la cellule lors d'un stress alors que l'isoforme  $\beta$  ait davantage un rôle dans le développement et la différenciation cellulaire.

#### e) Inhibition de HSP90

HSP90 est souvent fortement exprimée et sous forme active dans les cellules cancéreuses, notamment dans les cancers du sein et dans les leucémies (Jameel *et al.*, 1992; Yufu *et al.*, 1992). Cette surexpression est considérée comme un facteur de mauvais pronostic : HSP90 est en effet impliquée dans la protection de la cellule cancéreuse contre la mort induite par les agents du système immunitaire ou par les agents cytotoxiques. Elle confère également à la cellule cancéreuse une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et une insensibilité vis-à-vis des signaux anti-croissance. Enfin HSP90 permet de favoriser l'angiogenèse au sein de la tumeur (Powers and Workman, 2006). C'est pourquoi depuis quelques années HSP90 est devenue une cible thérapeutique de choix pour le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux.

L'étude du mécanisme d'action de HSP90 a permis le développement de petites molécules inhibitrices de HSP90. Lorsqu'il est lié à HSP90, l'ATP adopte une conformation particulière retrouvée uniquement dans les ATPases possédant un motif appelé « Bergerat fold ». Ce motif est présent dans les protéines de la superfamille GHKL (gyrase bactérienne, HSP90, histidine kinase, MutL) et ne ressemble pas aux domaines ATPase retrouvés par exemple dans les kinases classiques ou dans HSP70. Des petites molécules mimant cette conformation dans la poche de fixation de l'ATP ont alors été développées afin d'inhiber spécifiquement HSP90. Ainsi le 17-AAG, molécule dérivée de l'antibiotique geldanamycine, se fixe dans le site de fixation de l'ATP et empêchent les changements conformationnels de HSP90, induisant ainsi la déstabilisation et éventuellement la dégradation des protéines clientes (Neckers and Neckers, 2002). Le 17-AAG présente un fort potentiel thérapeutique puisque il inhibe HSP90 et de ce fait sensibilise les cellules cancéreuses aux agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie. De plus, ce produit semble être « spécifique » des cellules cancéreuses. En effet, dans les cellules cancéreuses l'affinité de HSP90 pour l'ATP est

100 fois supérieure à celle observée dans les cellules normales. Puisque le 17-AAG mime l'ATP, l'affinité de HSP90 pour le 17-AAG et donc son activité cytotoxique sont également augmentées dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales (Kamal *et al.*, 2003). Le 17-AAG est actuellement en études cliniques de phase III pour le traitement de myélomes multiples réfractaires (Usmani *et al.*, 2009). De nombreuses autres molécules dérivées ou non du 17-AAG telles que les purines synthétiques D-Z8 et H-71 ou le radicicol sont également développées afin d'inhiber HSP90 (Figure 12) (Didelot *et al.*, 2007). Il existe également d'autres inhibiteurs de HSP90 qui interfèrent avec la dimérisation de HSP90 ou son interaction avec ses protéines clientes (Barginear *et al.*, 2008).

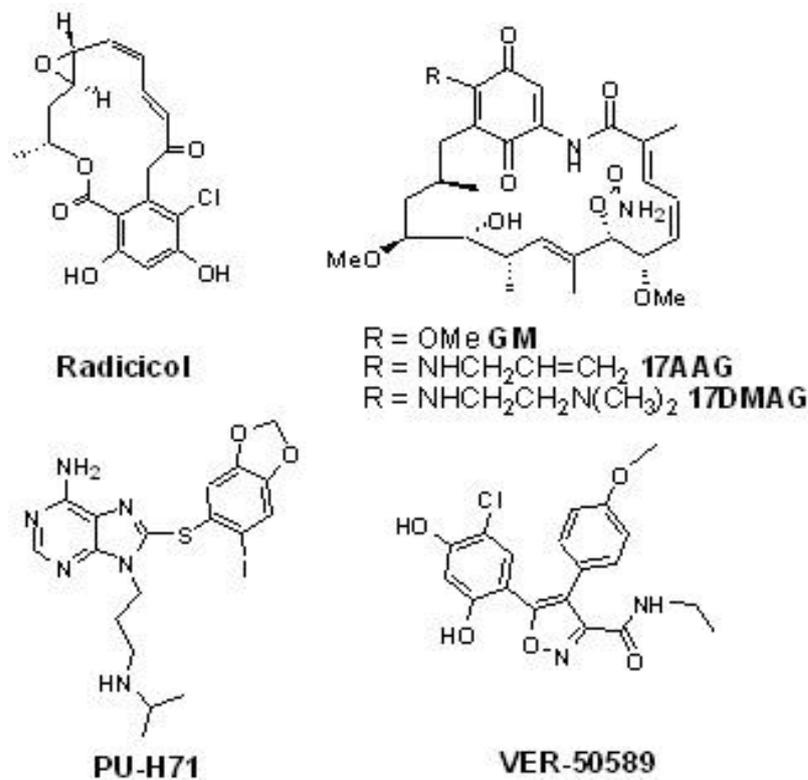


Figure 12. Exemples d'inhibiteurs de HSP90. GM : geldanamycine

L'utilisation de ces inhibiteurs soulève cependant quelques problèmes. On ignore en effet si ces inhibiteurs se lient de manière équivalente à HSP90 $\alpha$  et à HSP90 $\beta$ . Puisque HSP90 $\beta$  semble être particulièrement impliquée dans le développement des organismes, les conséquences de l'utilisation d'inhibiteurs de HSP90 doivent être étudiées, d'autant plus que HSP90 jouerait un rôle dans l'évolution en favorisant le polymorphisme et l'apparition de mutations génétiques (Queitsch *et al.*, 2002). L'inhibition de HSP90 a également pour effet

secondaire d'augmenter fortement l'expression de HSP70 (Kaarniranta *et al.*, 2005; Schmitt *et al.*, 2006) et donc de protéger les cellules de la mort, ce qui pourrait limiter l'utilisation de ces molécules.

## II. L'apoptose

### A) Généralités

Le terme d'apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles en automne (du grec *apo*: au loin, et *ptosis*: chute). C'est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui intervient dans de nombreux phénomènes physiologiques tels que l'organogénèse ou le maintien de l'homéostasie tissulaire en détruisant les cellules devenues inutiles ou altérées. Contrairement au phénomène de nécrose, défini comme étant une mort cellulaire désordonnée, l'apoptose est au contraire une mort propre et extrêmement contrôlée. Elle est considérée comme un mécanisme de suicide qui aboutit au démantèlement de la cellule par l'activation de toute une machinerie intra-cellulaire sans interférer avec les cellules voisines.

Le processus d'apoptose se caractérise par de profonds changements de la physiologie de la cellule. Les cellules en apoptose s'isolent des autres cellules par perte de contact cellulaire. La membrane plasmique forme des bourgeonnements à la surface des cellules. Celles-ci vont se disloquer en fragments cellulaires entourés d'une membrane phospholipidique, les corps apoptotiques, contenant des parties de cytoplasme et de noyau. Ces corps apoptotiques vont ensuite être rapidement éliminés par les cellules du système immunitaire, ce qui évite la libération du contenu cellulaire et le déclenchement d'une réponse inflammatoire locale. La reconnaissance de ces corps est facilitée par la translocation des phosphatidylserines du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe (Bever *et al.*, 1999; Krieser and White, 2002).

Au niveau cytoplasmique, l'apoptose s'accompagne d'une acidification et d'une condensation du cytoplasme. Les différents organites se regroupent et rétrécissent alors que la mitochondrie augmente de taille. Le potentiel mitochondrial transmembranaire diminue, ce qui entraîne un relargage des protéines mitochondriales présentes dans l'espace intermembranaire vers le cytosol (Wang and Youle, 2009). Au niveau du noyau cellulaire, la chromatine se condense le long de l'enveloppe nucléaire. L'ADN nucléaire est ensuite clivé en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases.

## **B) Les voies de l'apoptose**

Il existe deux principales voies d'activation du processus apoptotique : la voie extrinsèque faisant intervenir les récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou mitochondriale (Figure 13). Ces deux voies aboutissent au clivage et à l'activation de protéases à cystéine nommées caspases (Cysteiny Aspartate Cleaving Proteases). Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs activés par clivage protéolytique. Elles sont divisées en trois groupes : les caspases impliquées dans l'inflammation comme la caspase-1, les caspases initiatrices comme les caspases-8, -9 et -10, les caspases apoptotiques effectrices comme les caspases-3 et -7. Les caspases effectrices permettent le démantèlement de la cellule lors de l'apoptose.

- la voie extrinsèque ou la voie des récepteurs de mort est activée par les ligands de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) tels que le TNF $\alpha$ , FAS-L (FAS- Ligand) ou TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand). La fixation de ces ligands sur leurs récepteurs spécifiques conduit à l'activation des caspases-8 ou -10 au sein d'un complexe moléculaire appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex) composé de l'adaptateur FADD (Fas-Associated Death Domain), des procaspases-8 ou -10 et d'autres protéines régulatrices comme RIP1 (Receptor Interacting Protein 1) ou TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Death Domain Protein). Une fois activées, les caspases initiatrices vont à leur tour cliver les caspases effectrices, notamment la caspase-3.

- La voie intrinsèque ou voie mitochondriale est activée par des signaux externes comme des agents cytotoxiques, une carence en facteurs de croissance ou des stimuli physiques (rayons X ou UV). Ces signaux entraînent le relargage de protéines mitochondriales dans le cytosol. Une fois libérés de la mitochondrie, le cytochrome C et l'adaptateur Apaf-1 forment un complexe nommé apoptosome permettant le recrutement et l'activation de la procaspase-9. La caspase-9 va alors cliver les caspases effectrices telles que la caspase-3. Le relargage des protéines pro-apoptotiques mitochondriales et la formation de l'apoptosome peut également intervenir lors de la voie extrinsèque. En effet lorsque la formation du DISC est insuffisante, la caspase 8 peut cliver la protéine Bid qui va alors activée la protéine Bax et la voie mitochondriale.

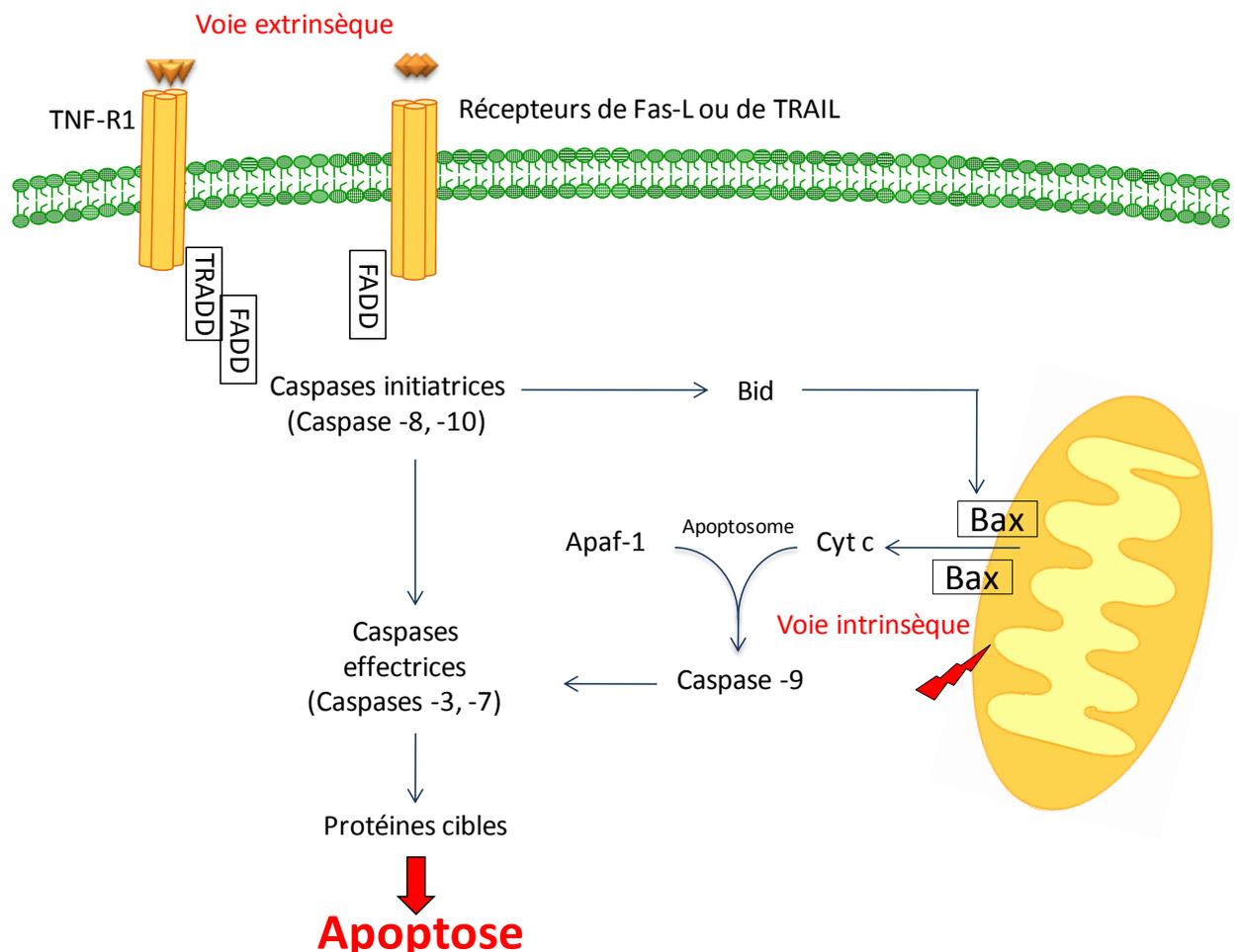


Figure 13. Représentation schématique des grandes voies de l'apoptose.

De très nombreuses protéines intracellulaires (plus de 350) sont des cibles des caspases lorsque ces enzymes sont activées au cours de l'apoptose (Fischer *et al.*, 2003). Ces cibles incluent par exemple des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité structurale (comme la spectrine  $\alpha$  ou l'actine  $\alpha$ ), des protéines contrôlant le cycle cellulaire (p21, p27<sup>kip1</sup>), des protéines impliquées dans la synthèse, le clivage ou la réparation de l'ADN (ICAD, Acinus, PARP, DNA-PK), des kinases (Lyn) ou des facteurs de transcription (GATA-1). Le clivage de ces protéines conduit au démantèlement de la cellule (clivage des protéines du cytosquelette, fragmentation de l'ADN), à l'inhibition des voies de survie et à l'activation de facteurs pro-apoptotiques aboutissant *in fine* à la mort irréversible de la cellule.

L'apoptose est un mécanisme extrêmement contrôlé. La dérégulation de l'apoptose est impliquée en effet dans de nombreuses pathologies telles que les maladies neuro-dégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson), certaines maladies auto-immunes (lupus érythémateux) ou le cancer. De nombreuses protéines pro- ou anti-apoptotiques interviennent à différents niveaux dans les voies de signalisation de l'apoptose. C'est le niveau d'expression et d'activation de ces protéines qui va au final orchestrer la décision survie *versus* mort cellulaire. Un grand nombre de protéines régulent ainsi de manière négative la mort cellulaire par apoptose.

### **C) Régulation de l'apoptose par les HSPs**

Le rôle des HSPs dans la régulation de l'apoptose est approfondi dans la revue citée en [Annexe II : Heat Shock Proteins : essential proteins for apoptosis regulation](#) (Lanneau *et al.*, 2008).

Les HSPs, *via* leur fonction de chaperon moléculaire, participent à la régulation du processus apoptotique. Le rôle cytoprotecteur des HSPs a été largement étudié et démontré par de nombreuses équipes, notamment la mienne. La surexpression de HSP27, de HSP70 ou de HSP90 inhibe ainsi l'apoptose dans un grand nombre de modèles différents et inversement, leur sous-expression par siRNA ou par des anti-sens sensibilise à la mort

cellulaire (Lanneau *et al.*, 2008). Les HSPs jouent un rôle essentiel dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose en interférant d'une part avec les deux voies principales de l'apoptose, la voie intrinsèque et extrinsèque, et en favorisant d'autre part les voies de survie. HSP27 peut par exemple induire l'ubiquitinylation et la dégradation de plusieurs protéines telles que I $\kappa$ B $\alpha$ , inhibiteur du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, et donc favoriser la survie des cellules. HSP27 peut également inhiber l'activation des caspases en interagissant avec différents acteurs des voies apoptotique tels que le cytochrome C (Bruey *et al.*, 2000).

Les cellules déplétées en HSP70 sont extrêmement sensibles à la mort cellulaire induites par de nombreux stimuli. Le contrôle de HSP70 sur l'apoptose s'effectue à différents niveaux en inhibant par exemple la trimérisation des récepteurs de mort de TRAIL (Guo *et al.*, 2005), en empêchant la perméabilisation de la mitochondrie en inhibant la translocation de Bax (Stankiewicz *et al.*, 2005), en prévenant la formation de l'apoptosome *via* son interaction avec Apaf-1 (Beere *et al.*, 2000) ou encore en protégeant certaines cibles des caspases telles que GATA-1 (Ribeil *et al.*, 2007). HSP70 peut également se lier à AIF et empêcher sa translocation dans le noyau et la condensation de la chromatine (Ravagnan *et al.*, 2001). L'étude approfondie de cette interaction par mon équipe a permis de développer des molécules pouvant se lier à HSP70 et l'inhiber.

HSP90 régule l'apoptose principalement *via* le chaperonnage de ses protéines clientes. De nombreuses protéines clientes de HSP90 sont ainsi impliquées dans les voies de survie des cellules. HSP90 stabilise par exemple RIP1, protéine recrutée au niveau du récepteur au TNF $\alpha$  TNF-R1 et qui favorise l'activation de NF- $\kappa$ B et de JNK (c-Jun N-terminal Kinase), généralement associée à la survie de la cellule. HSP90 interagit également avec la protéine kinase AKT, elle aussi associée à la survie cellulaire et stabilise certaines protéines anti-apoptotiques telles que FLIP ou Bcl-2, empêchant ainsi l'activation de l'apoptose.

### III. La différenciation macrophagique

La différenciation cellulaire est un processus physiologique indispensable au développement ainsi qu'au bon fonctionnement de l'organisme. C'est par ce mécanisme qu'une cellule pluripotente ou indifférenciée acquiert de nouvelles capacités afin de se spécialiser en un type cellulaire possédant des caractéristiques et des fonctions bien précises.

La différenciation cellulaire et l'apoptose sont des mécanismes très proches. Certaines modifications morphologiques observées lors des phénomènes de différenciation cellulaire, telle que la condensation du noyau ou la perte d'organites lors de la différenciation des spermatides ou au cours de la différenciation érythroïde terminale, rappellent fortement les caractéristiques de l'apoptose (Cagan, 2003). Les caspases, principales actrices de l'apoptose, sont également activées au cours de la différenciation de plusieurs types cellulaires (Launay *et al.*, 2005). Elles participent ainsi à la différenciation des fibres musculaires (Fernando *et al.*, 2002), la différenciation érythroïde (Zermati *et al.*, 2001) la différenciation mégacaryocytaire (Kozuma *et al.*, 2009) ou encore la différenciation macrophagique (Sordet *et al.*, 2002).

La différenciation macrophagique se déroule dans le cadre de l'hématopoïèse. C'est par ce mécanisme que les monocytes, cellules du système immunitaire circulant dans le sang, deviennent dans les tissus des macrophages. Les macrophages phagocytent alors les débris cellulaires et les pathogènes. Ils peuvent également présenter des antigènes aux lymphocytes T et induire une réponse immunitaire adaptée. La différenciation macrophagique est finement contrôlée par de nombreuses protéines. Nous aborderons ici le rôle du facteur transcription Spi-1/Pu.1, de la protéine inhibitrice de l'apoptose c-IAP1 ainsi que des protéines de choc thermique dans ce processus.

## A) L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus ordonné et hautement contrôlé conduisant à la production par la moelle osseuse de cellules sanguines matures (érythrocytes, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, lymphocytes, monocytes et plaquettes) à partir d'un nombre restreint de cellules souches. Afin de maintenir l'homéostasie, l'hématopoïèse doit maintenir un équilibre entre la production (prolifération et différenciation) et la disparition (apoptose) des différentes cellules sanguines. Un déséquilibre de ce processus peut conduire à la production anarchique d'un type cellulaire précis et au développement de leucémies.

L'hématopoïèse se déroule chez l'homme après la naissance dans la moelle des os, en particulier dans l'os sternal, les os iliaques et la tête du fémur. Elle se produit avant la naissance dans les îlots sanguins de la vésicule vitelline puis dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques.

L'hématopoïèse comporte quatre compartiments différents (Figure 14):

- Les cellules souches multipotentes

Toutes les cellules sanguines sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée dite cellule souche multipotente ou cellule souche primitive. Ces cellules ne sont pas morphologiquement identifiables. Elles sont dotées d'une capacité d'auto-renouvellement élevée, capacité qu'elles vont progressivement perdre lorsqu'elles vont s'engager de façon irréversible dans une des voies de différenciation hématopoïétique.

- Les progéniteurs

Une fois engagées dans une voie de signalisation, les cellules souches multipotentes perdent leur multipotence et deviennent une cellule souche engagée ou progéniteur. Ces cellules ne sont pas morphologiquement identifiables mais elles sont mises en évidence

grâce aux techniques de culture de cellules médullaires en milieux semi-solide et en présence de facteurs de croissance adaptés où elles donnent naissance à des colonies de différents types:

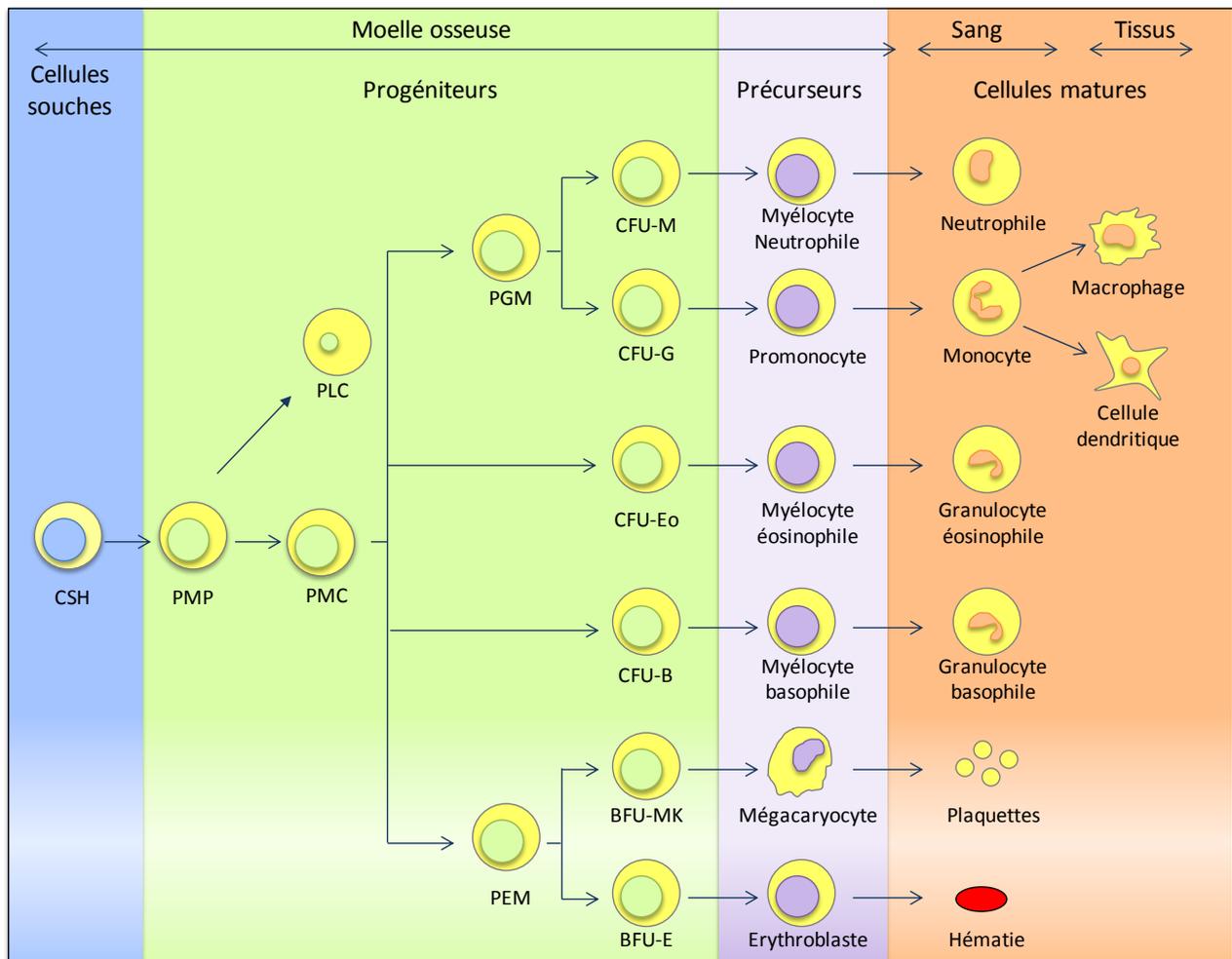
- Colonies de cellules granuleuses neutrophiles et monocytaires dont l'origine est la CFU-GM (Granulocyte Monocyte Colony Forming Unit)
- Colonies de cellules granuleuses basophiles dont l'origine est la CFU-B
- Colonies érythroblastiques dont l'origine est une BFU-E (Burst Forming Unit) et la CFU-E
- Colonies mégacaryocytaires dont l'origine est une CFU-Meg.

#### - Les précurseurs

Ce sont des cellules morphologiquement reconnaissables localisées dans la moelle osseuse. Le compartiment des précurseurs a pour buts la maturation cellulaire et la multiplication. La maturation des cellules s'accompagne de modifications morphologiques telles que la diminution de la taille cellulaire, la diminution du rapport nucléo-cytoplasmique, la disparition des nucléoles ou encore la condensation de la chromatine. Parallèlement à la maturation, les cellules vont subir entre 3 et 5 mitoses de sorte qu'un précurseur peut donner naissance jusqu'à 32 cellules filles. Les précurseurs les plus immatures sont les myéloblastes, les proérythroblastes, les mégacaryoblastes, les lymphoblastes et les monoblastes.

#### - Les cellules matures

Ces sont les différentes cellules sanguines de l'organisme. Ces cellules sont pour la plupart d'entre elles très différenciées et sont les éléments terminaux et fonctionnels des lignées. Elles n'ont pas ou très peu de possibilités de synthèse protéique et de division. Leur durée de vie est courte (quelques heures pour les polynucléaires, quelques jours pour les plaquettes, quelques semaines pour les hématies) mais leur nombre est très élevé.



**Figure 14.** Représentation schématique de l'hématopoïèse. CSH : cellules souches hématopoïétiques, PMP : progéniteur multipotent, PMC : progéniteur myéloïde commun, PLC : progéniteur lymphoïde commun, PGM : progéniteur granulomonocytaire, PEM : progéniteur érythro-mégacaryocytaire, CFU : colony-forming unit, BFU : burst-forming unit, E : érythrocyte, MK : mégacaryocyte, M : monocyte, G : granulocyte, Eo : éosinophile, B : basophile.

L'hématopoïèse doit être parfaitement contrôlée afin d'assurer la production de chaque élément en quantité et en temps voulu. Différents éléments régulateurs participent à ce contrôle tels que les facteurs de croissance produits par les cellules du stroma de la moelle osseuse ou le microenvironnement hématopoïétique lui-même.

## **B) Les monocytes**

La différenciation macrophagique correspond à la différenciation terminale des monocytes en macrophages. Les monocytes sont des cellules sanguines mobiles et douées de phagocytose issues de la différenciation des monoblastes ou promonocytes produits à partir des CFU-GM. Dans la moelle osseuse, les promonocytes se multiplient et continuent leur maturation. Lorsque cette maturation est suffisante (un ou deux jours), les monocytes quittent la moelle osseuse et se retrouvent dans le sang.

Les monocytes sont les plus grandes cellules circulant dans le sang. De forme ronde, elles mesurent entre 12 et 25  $\mu\text{m}$  et atteignent jusqu'à 40  $\mu\text{m}$  de diamètre. Leur nombre est variable tout comme leur durée de vie qui s'étale de quelques jours à quelques mois.

L'étude des marqueurs membranaires permet l'identification des populations de monocytes. Ces cellules présentent ainsi des marqueurs de différenciation de la lignée granulocytaire neutrophile : CD33 (Cluster of Differentiation 33), CD13 et des antigènes HLA DR (Human Leukocyte Antigen). Elles possèdent également des récepteurs pour les fragments Fc (Fragments Cristallisables), les immunoglobulines G (CD32, CD64), des récepteurs pour les fractions du complément (CD21, CD35), des protéines d'adhésion (CD11a, b et c) ou des protéines facilitant la liaison aux lipopolysaccharides bactériens (CD14).

Les monocytes restent environ 24 heures dans le sang puis quittent la circulation sanguine pour entrer dans les tissus où ils sont exposés à différents stimuli comme les cytokines, les chimiokines, les acides gras, les hormones et les immunoglobulines. Ces agents induisent leur différenciation en macrophages et leur migration dans les tissus environnants où ils assureront une immuno-surveillance innée.

### C) Les macrophages

Les macrophages sont des éléments de grande taille (30 à 60  $\mu\text{m}$  de diamètre), au noyau excentré arrondi à chromatine condensée. Le cytoplasme est volumineux, vacuolaire et contient de nombreux lysosomes primaires et secondaires.

Les macrophages sont des éléments essentiels du système immunitaire inné et adaptatif chez les vertébrés. Leurs fonctions sont variées et finement contrôlées par l'environnement cellulaire. Les macrophages reconnaissent et phagocytent les pathogènes et induisent, par présentation d'antigène aux lymphocytes T, une réponse immunitaire spécifique protectrice. Les macrophages peuvent cependant avoir des actions opposées dans la réaction inflammatoire (pro- ou anti-inflammatoire), dans la réponse immunitaire (immunogénicité ou tolérance), et dans l'homéostasie tissulaire (destruction ou restauration des tissus). Les macrophages sont en effet capables de sécréter différentes cytokines telles que :

- Le Tumor Necrosis Alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) qui initie une cascade de cytokines conduisant à une réponse inflammatoire
- L'interleukine (IL-) 1- $\beta$ , cytokine pro-inflammatoire
- Les interleukines 10 (anti-inflammatoire), 12, 18 (pro-inflammatoire) ou l'interféron  $\alpha$  et  $\beta$ , cytokines possédant une activité immuno-régulatrice
- L'IL-6, produite suite à une infection ou une blessure, qui stimule la production d'anticorps par les lymphocytes B et induit l'activation des lymphocytes T.

Malgré leur maturation, les macrophages nécessitent un stimulus permettant l'acquisition de leurs fonctionnalités. Les macrophages peuvent être activés ou désactivés par liaison des récepteurs de surface lors de contacts cellules-cellules ou par différentes cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  sécrété par de nombreuses cellules immunitaires dont les

lymphocytes T CD4+, les lymphocytes TCD8+, les cellules Natural Killer (NK) et les macrophages eux-mêmes (Schleicher *et al.*, 2005).

Les macrophages sont présents dans tous les tissus de l'organisme et peuvent résider dans les organes pendant plusieurs mois. Il existe par ailleurs des populations particulières de macrophages appelés macrophages résidents présentes dans certains organes. Ces populations ont des rôles spécifiques adaptés à leur localisation tissulaire. On trouve par exemple :

- les cellules de Langerhans de la peau spécialisées dans la présentation d'antigènes et dans la réaction inflammatoire
- les ostéoclastes présents dans la moelle osseuse et agissent dans les processus de remodelage osseux
- les astrocytes et les cellules microgliales présentes dans le cerveau, qui aident à la régulation de la croissance des neurones et peuvent servir à la présentation d'antigènes
- les cellules de Küpffer dans le foie responsables de la phagocytose des particules du sang.

#### **D) La différenciation macrophagique : rôle du M-CSF**

La différenciation des monocytes en macrophages est gouvernée principalement par un facteur de croissance : le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor, CSf-1, Colony Stimulating Factor 1) (Auffray *et al.*, 2009). Il existe trois différentes formes de M-CSF issues de l'épissage alternatif des ARN messagers : une forme associée à la surface des cellules, une forme ancrée à la matrice extracellulaire et une forme soluble (Fixe and Praloran, 1998). Le M-CSF est produit par un grand nombre de cellules et peut être sécrété par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ou produit localement dans les tissus par les cellules épithéliales et stromales (Pixley and Stanley, 2004). Le M-CSF stimule la prolifération, la différenciation et la survie des différents progéniteurs engagés dans la voie de

différenciation des macrophages. Les souris possédant une mutation au niveau du gène *csf-1* ont ainsi une sévère déficience en macrophage (Kodama *et al.*, 1991).

Le M-CSF, sous forme de dimère, se fixe au niveau du récepteur au M-CSF (M-CSF-R, *c-fms* ou CD115) à la surface des différents précurseurs myéloïdes, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Le récepteur, codé par le proto-oncogène *c-fms*, est un membre de la superfamille des immunoglobulines composé d'un seul domaine transmembranaire séparant deux parties:

- la partie extracellulaire contenant une séquence de type immunoglobuline répétée cinq fois. C'est sur cette partie que se fixe le ligand
- la partie intra-cellulaire composée de deux domaines tyrosine kinase qui entourent une séquence non catalytique. Cette partie permet la transduction du signal.

La fixation du M-CSF sur la partie extracellulaire de son récepteur entraîne la stabilisation du récepteur par dimérisation, puis l'activation de ses domaines kinases. Cette activation stimule la trans-phosphorylation des résidus tyrosine sur la partie intracellulaire du récepteur permettant la fixation de molécules de signalisation à domaine SH2. Ces protéines à tyrosine vont alors activer, en fonction du niveau de différenciation de la cellule, des voies de signalisation favorisant la survie (voie PI-3K ...), la prolifération (cas des voies impliquant Grb2, MEK/ERK Extracellular signal-Regulated Kinase), la différenciation (voie des Protéines Kinases C ou PKC) (Pixley and Stanley, 2004). La fixation du M-CSF sur son récepteur induit ainsi des vagues successives d'activation de la PI-3K et de la protéine kinase AKT dont la durée et l'amplitude augmentent en fonction du temps. L'activation d'AKT est nécessaire à l'activation de la caspase-8 et à la différenciation des monocytes en macrophages (Jacquel *et al.*, 2009).

Le processus de différenciation macrophagique peut être reproduit *in vitro* à partir de monocytes issus du sang périphérique ou de progéniteurs myéloïdes par un traitement au M-CSF. Ce processus peut aussi être mimé par des cellules de lignées cellulaires myéloïdes leucémiques capables de se différencier en cellules de type macrophagique comme les lignées humaines U937 et THP-1 (Figure 15). La différenciation est alors induite par une

exposition des cellules au M-CSF, à la vitamine D3 ou l'un de ses analogues, ou par les esters de phorbol comme le TPA (12-O-TétradécanoylPhorbol-13-Acétate). Ces derniers activent les PKC et vont en quelque sorte mimer l'effet du M-CSF en activant *via* les PKC certaines voies de signalisation impliquant AKT, ERK 1/2 ou la p38 MAPK (Jang *et al.*, 2005; Numazawa *et al.*, 2003). Le TPA peut également induire un arrêt des cellules dans le cycle cellulaire en inhibant notamment l'expression de c-Myc et à stimuler la sécrétion de M-CSF dans le milieu environnant (Tsiftoglou *et al.*, 2003).

L'état de différenciation des macrophages est évalué :

- Par des changements au niveau de la morphologie : les cellules deviennent adhérentes, s'étalent et forment des pseudopodes (protubérances).
- Par l'expression de nouvelles protéines à leur surface (marqueurs de différenciation) telles que le CD71 (récepteur de la transferrine) ou le CD163 (récepteur scavenger de l'hémoglobine) ou l'augmentation de l'expression de protéines déjà présentes telles que le CD11b (chaîne  $\alpha$ M de l'intégrine).
- Par l'acquisition (ou le renforcement) de nouvelles fonctions telles que la phagocytose ou la production de cytokines.

La différenciation de progéniteurs myéloïdes peut être obtenue également par l'exposition des cellules à de faibles concentrations de GM-CSF (Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor) (Barreda *et al.*, 2004). Cependant, bien qu'ils expriment les mêmes marqueurs de différenciation, ces macrophages ne possèdent pas le même phénotype que ceux obtenus par le traitement des cellules par le M-CSF, possèdent une activité phagocytaire diminuée et produisent moins d' $H_2O_2$  et d'IL-10 (Akagawa, 2002).

*In vitro*, les monocytes du sang circulants peuvent aussi être différenciés en cellules dendritiques par un traitement au GM-CSF et à l'IL-4. Les cellules développent alors des dendrites, expriment à leur surface les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH II) et les marqueurs de différenciation dendritiques tels que le CD36, le CD1a ou le CD86.

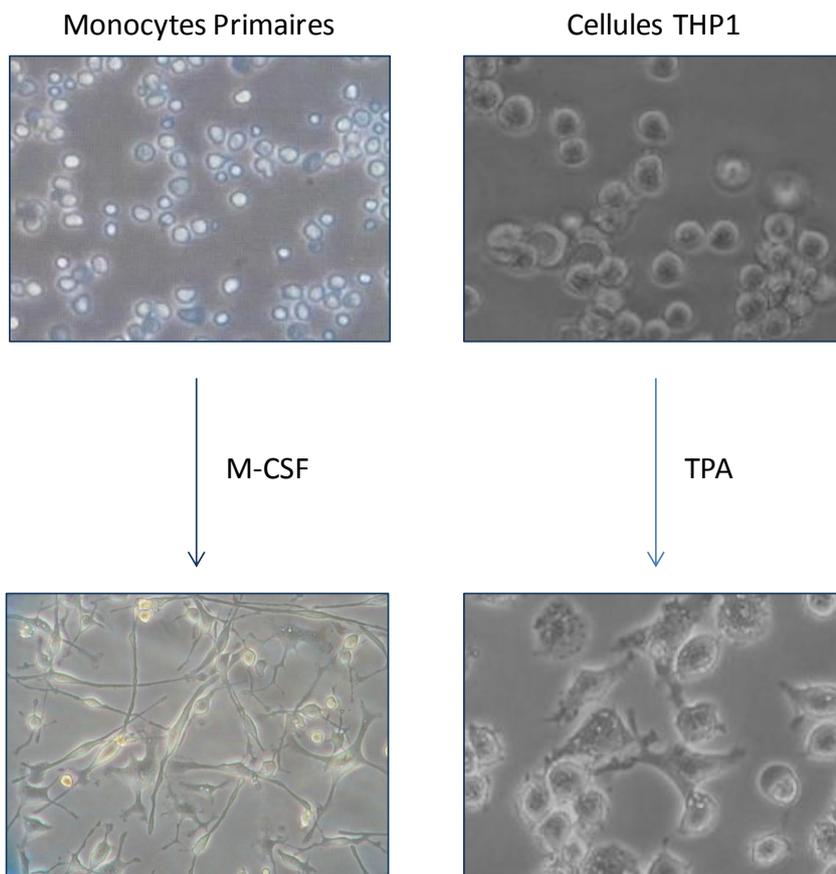


Figure 15. La différenciation macrophagique. A gauche : différenciation des monocytes primaires (isolés à partir du sang périphérique humain) en macrophages par le M-CSF. A droite : différenciation des cellules THP1 par le TPA. Au cours de la différenciation macrophagique, les cellules deviennent adhérentes au support, s'étalent et développent des pseudopodes. Grossissement : x100.

### E) La différenciation macrophagique : le facteur de transcription Spi-1/Pu.1

#### 1) Les facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation macrophagique

La différenciation macrophagique correspond à l'acquisition de la part des monocytes d'un nouveau phénotype et de nouvelles fonctions au sein de l'organisme. L'expression d'un grand nombre de gènes est ainsi modifiée au cours de ce processus. Ces modifications de l'expression génique sont notamment liées à l'activation ou à l'inhibition de facteurs de transcriptions.

L'utilisation de souris déficientes pour certains facteurs de transcription a permis de mettre en évidence l'implication d'un certain nombre d'entre eux dans la différenciation macrophagique (Friedman, 2002; Rosenbauer and Tenen, 2007; Valledor *et al.*, 1998) :

- Les facteurs de transcription de la famille des C/EBP (CCAAT Enhancer Binding Proteins). Leur expression est limitée au lignage myéloïde mais dépend du stade de différenciation. Ainsi C/EBP $\alpha$  et  $\epsilon$  sont principalement exprimés dans les granulocytes immatures alors que C/EBP  $\beta$  (Nuclear Factor for IL-6 expression, NF-IL6) et  $\gamma$  sont surexprimés au cours de la maturation des macrophages. C/EBP $\alpha$  participe au développement des monocytes en favorisant la transcription du gène *c-fms* codant pour le récepteur au M-CSF. NF-IL6, en collaboration avec d'autres facteurs de transcription, régule l'expression du gène de l'IL-1 $\beta$  (Yang *et al.*, 2000), du gène de la chitotriosidase CHIT1 (Pham *et al.*, 2007) ou du M-CSF (Xie *et al.*, 2002). La production et la différenciation des macrophages ne sont pas bloquées dans les souris déficientes en NF-IL6 mais ces souris possèdent des macrophages non fonctionnels incapables d'éliminer les pathogènes intracellulaires ou les cellules tumorales (Tanaka *et al.*, 1995). NF-IL6 serait donc principalement impliqué dans la maturation des macrophages.

- Les facteurs de transcription de la famille CBF (Core Binding Family). C'est une famille de protéines hétérodimériques contenant une sous unité CBF $\beta$  commune et d'une sous unité CBF $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 (ou Acute Myeloid Leukemia 1 protein, AML1) ou  $\alpha$ 3. AML1 reconnaît une région située dans le promoteur du gène *c-fms* et coopère avec NF-IL6 afin d'induire l'expression de ce gène (Zhang *et al.*, 1994). AML1 pourrait également faciliter l'action d'autres facteurs de transcription tels que Spi-1/Pu.1.

- Les facteurs de transcription c-Myb et c-Myc régulent de manière négative la différenciation en favorisant la prolifération des cellules et en répriment l'expression de gènes impliqués dans l'induction de la différenciation terminale. Ainsi c-Myb réprime le promoteur du gène *c-fms* et inhibe l'expression et l'activité des facteurs C/EBP (Friedman, 2002).

- La famille des STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Ces membres possèdent un domaine SH2 (SRC Homology 2) permettant la transduction du signal. STAT3 participe à la répression des facteurs c-Myb et c-Myc au cours de la voie de différenciation des monocytes. Un autre membre de cette famille, DIF (Differentiation-Induced Factor), est activé au cours de la différenciation des cellules U937 par les ester de phorbol.

- EGR1 et EGR2 (Early Growth Response), membres de la famille des facteurs de transcription à doigt de zinc sont exprimés dans les macrophages. Leur fonction est encore mal connue : les souris invalidées pour le gène codant pour EGR1 ne possèdent pas de défaut de la différenciation macrophagique ni de maturation, peut-être à cause de l'effet compensatoire d'autres facteurs.

- NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B). L'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B augmente au cours de la différenciation des monocytes en macrophages et participe à la synthèse du récepteur de la ferritine CD71 et à l'expression de molécules du CMH de classe II.

- IRF1 (Interferon Regulatory Factor 1), facteur de transcription impliqué dans l'arrêt de la prolifération et IRF8, autre facteur de transcription impliqué dans la détermination de la voie granulocytaire *versus* monocytique/macrophagique.

- La famille des HOX. Ces facteurs de transcription contiennent un domaine de liaison à l'ADN appelé homéodomaine. Parmi ces facteurs, HOXB7 participe aux étapes intermédiaires de la différenciation des monocytes.

- NF- $\kappa$ B. L'activation de NF- $\kappa$ B est transitoire mais indispensable au processus de différenciation des monocytes en macrophages (Pennington *et al.*, 2001). Cette activation est moins forte et moins soutenue que lors de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (Baltathakis *et al.*, 2001). Au cours de la différenciation macrophagique, la caspase-8 est recrutée et activée au sein d'un complexe protéolytique impliquant FADD,

RIP1 et FLIP. La caspase-8, en clivant RIP1, permet la diminution de l'activité NF- $\kappa$ B et la poursuite du processus de différenciation (Rebe *et al.*, 2007).

- Spi-1/Pu.1, le principal facteur de transcription de la différenciation des monocytes en macrophages.

## 2) Spi-1/Pu.1 : structure

Spi-1/Pu.1 (Spleen focus forming virus proviral integration 1 / Purine Rich Box 1) est un facteur de transcription appartenant à la famille Ets (E twenty six) découvert en 1988 par le docteur Moreau-Gachelin et ses collaborateurs (Moreau-Gachelin *et al.*, 1988) en tant que produit du gène ciblé par les insertions du rétrovirus de Friend (virus formant des foyers spléniques ou Spleen Focus Forming Virus) dans la maladie de Friend. Il a été « redécouvert » deux ans plus tard par une équipe américaine dirigée par le docteur Maki en tant que facteur de transcription se fixant sur des motifs riches en purines au niveau du promoteur du gène codant pour le CMH II (Klemsz *et al.*, 1990). Rapidement il s'est avéré que le facteur de transcription Pu.1 correspondait en réalité au produit du gène ciblé par le rétrovirus de Friend, Spi-1.

Spi-1/Pu.1 est codé par le gène *sfpi1* situé sur le chromosome 11 de l'homme. Il est composé de plusieurs domaines principaux (Figure 16) :

- Un domaine de transactivation situé en N terminal. Ce domaine comporte notamment une région riche en résidus acides et une autre région riche en glutamines. La participation de ces régions à l'activation de Spi-1/Pu.1 semble dépendre du gène ciblé par spi-1/Pu.1, de la lignée et du stade de différenciation (Fisher *et al.*, 1998; Klemsz and Maki, 1996; Nishiyama *et al.*, 2004).

- Un domaine PEST, comportant une séquence riche en proline (P), en acide glutamique (E), en serine (S) et en thréonine (T). Cette séquence est généralement associée

aux protéines possédant une faible demi-vie bien que la protéine délétée pour cette région présente la même durée de vie que la protéine sauvage (Fisher *et al.*, 1998). Ce domaine serait impliqué dans l'interaction avec d'autres partenaires protéiques (Huang *et al.*, 2007).

- Un domaine Ets, partagé par d'autres facteurs de transcription de la famille Ets, situé en C-terminal correspondant au site de fixation à l'ADN. Ce domaine, composé d'un enchaînement de 3 hélices alpha et 4 feuillets beta antiparallèles formant un motif hélice-tour-hélice et boucle-hélice-boucle, se lie à l'ADN au niveau de 2 lysines et 2 arginines conservées entre les protéines Ets. Il reconnaît au niveau de l'ADN, une séquence contenant le motif GAAA. Ce domaine permet par ailleurs la fixation sur des ARN (Hallier *et al.*, 1996) et est impliqué dans l'interaction avec d'autres facteurs de transcription tels que GATA-1 ou C/EBP $\beta$  (Nerlov *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000).

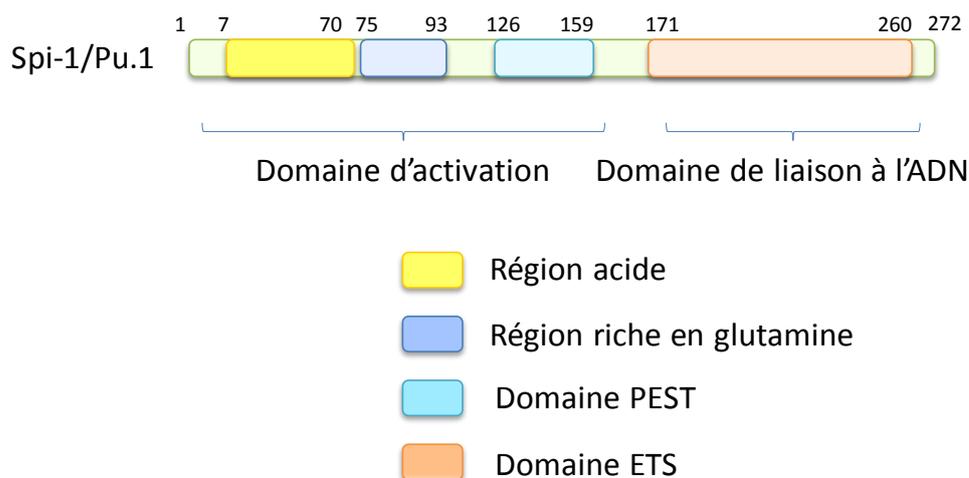


Figure 16. Structure de Spi-1/Pu.1

### 3) Spi-1/Pu.1 : expression

L'expression de Spi-1/Pu.1 est essentiellement restreinte au système hématopoïétique. Son expression est très dynamique pendant l'hématopoïèse, le niveau de Spi-1/pu.1 variant selon les stades de différenciation. Il est exprimé fortement dans les stades précoces de l'hématopoïèse dans les cellules souche hématopoïétiques, les progéniteurs lymphoïdes communs, les progéniteurs granulo-macrophagiques et les

progéniteurs thymiques. Il est également exprimé dans les macrophages, les granulocytes et les lymphocytes B mais ne l'est pas dans les lymphocytes T (à part certains lymphocytes Th2) et les cellules NK (Natural Killer) (Zhu and Emerson, 2002).

Les mécanismes qui contrôlent l'expression de Spi-1/Pu.1 commencent à être identifiés. Plusieurs facteurs de transcriptions sont impliqués dans le contrôle de l'expression de Spi-1/Pu.1. L'étude du promoteur par des expériences de délétion chez la souris et l'homme a ainsi montré qu'une région du promoteur nécessaire à l'expression spécifique de Spi-1/Pu.1 dans les lignées myéloïdes était présente à environ 330 paires de bases en amont de l'ATG. Cette région contient des sites de fixation des facteurs de transcription Oct et sp1 (Chen *et al.*, 1995). Spi-1/Pu.1 peut également se fixer sur son propre promoteur et réguler ainsi sa propre expression (Chen *et al.*, 1995).

Spi-1/Pu.1 est également fortement exprimé dans les cellules B. Le site responsable de la fixation des facteurs de transcription Oct-1 et Oct-2 ainsi que la présence du co-activateur OBF-1/Bob1/OCA-B sont essentiels à l'expression de Spi-1/Pu.1 (Chen *et al.*, 1996). Le fait qu'OBF-1/Bob1/OCA-B ne soit exprimé que dans les cellules B pourrait expliquer l'expression spécifique de Spi-1/Pu.1 dans la lignée lymphoïde.

*In vivo*, l'expression de Spi-1/pu.1 dans des modèles de souris transgéniques n'est pas rétablie lorsque des constructions comprenant seulement le promoteur de Spi-1/Pu.1 sont utilisées. Cependant des constructions comportant le gène *sfpi1* en entier ainsi que des séquences de 35 kilobases en 5' et 3' du gène permettent l'expression exogène de Spi-1/Pu.1 dans les cellules myéloïdes et les lymphocytes B. Il existe en effet un élément de régulation situé très en amont (aux alentours de 15 kb) du gène. Cet URE (Upstream Regulatory Element) est composé de 2 régions homologues hautement conservées entre les espèces ainsi qu'un site potentiel d'intégration du rétrovirus de Friend (Okuno *et al.*, 2005). La suppression de cet élément par recombinaison homologue chez la souris entraîne une diminution de 80% de l'expression de Spi-1/Pu.1 dans la moelle osseuse et induit le développement de leucémies (Rosenbauer *et al.*, 2006; Rosenbauer *et al.*, 2004). Il a été montré récemment que les facteurs de transcription AML1 et NF-κB sont capables de se fixer au niveau de cet élément et d'activer l'expression de Spi-1/Pu.1 (Bonadies *et al.*, 2009;

Huang *et al.*, 2008). Cet élément possède par ailleurs une hypersensibilité à la Dnase I témoignant de l'état ouvert de la chromatine à cet endroit (Li *et al.*, 2001).

L'expression de Spi-1/Pu.1 ainsi que son activité transcriptionnelle au cours de la différenciation des cellules myéloïdes sont également régulées par GATA-1. GATA-1 est le facteur de transcription essentiel à la différenciation érythroïde terminale GATA-1. Lorsqu'il est exprimé de manière exogène dans des lignées myéloïdes, GATA-1 induit une trans-différenciation de ces cellules en éosinophiles (à des niveaux intermédiaires de GATA-1) ou une retro-différenciation en progéniteurs multipotents (à de plus fort niveaux) (Kulesa *et al.*, 1995). De plus, la perte de GATA-1 chez le poisson zèbre transforme les précurseurs érythroblastes en cellules myéloïdes et provoque ainsi une forte augmentation du nombre de neutrophiles et de macrophages (Galloway *et al.*, 2005). GATA-1 est en effet capable d'interagir avec Spi-1/Pu.1 et réprime son activité transcriptionnelle (Nerlov *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été montré que GATA-1 et GATA-2 peuvent se fixer au niveau du promoteur de Spi-1/Pu.1 et empêcher son expression (Chou *et al.*, 2009). Le niveau d'expression de Spi-1/Pu.1, contrôlé entre autre par GATA-1, déterminerait ainsi le devenir des cellules lors de l'hématopoïèse. Spi-1/Pu.1 peut en retour inhiber la différenciation érythroïde en interagissant directement avec GATA-1 et en réprimant son activité transcriptionnelle (Rekhtman *et al.*, 1999).

Le niveau d'expression de Spi-1/Pu.1 est également contrôlé par des mécanismes autres que les facteurs de transcription. Des mécanismes épigénétiques tout d'abord : le statut de méthylation de l'ADN et la structure chromatinienne au niveau du gène *sfpi1* diffèrent entre les cellules exprimant Spi-1/Pu.1 et les cellules ne l'exprimant pas (Amaravadi and Klemsz, 1999). Il existe également un mécanisme de contrôle de l'expression de Spi-1/Pu.1 par des ARN anti-sens provenant des régions introniques du gène et d'une région en amont de ce gène. Ces transcrits interagissent avec l'URE et régulent l'expression de Spi-1/Pu.1 au niveau de la traduction de l'ARN messager (Ebralidze *et al.*, 2008).

#### 4) Spi1/Pu. : fonction

##### a) Rôle dans l'hématopoïèse

L'utilisation de souris déficientes totalement ou partie pour Spi-1/Pu.1 a permis d'étudier la fonction de ce facteur de transcription.

Les premières études ont été réalisées à l'aide de deux types de souris déficientes en Spi-1/Pu.1 générées par deux groupes indépendants. Dans la première étude, les souris Spi-1/Pu.1<sup>-/-</sup> meurent entre les jours 16 et 18 de la gestation. Les embryons mutants ont une sévère altération du développement des lymphocytes B et T, des monocytes et des granulocytes (Scott *et al.*, 1994) suite à l'absence des différents progéniteurs. Ces souris possèdent un nombre normal de précurseurs érythroïdes mais un nombre réduit de proérythroblastes, d'érythroblastes, de réticulocytes et d'érythrocytes. Les souris Spi-1/Pu.1<sup>-/-</sup> utilisées dans la deuxième étude naissent normalement mais meurent au bout de 48h de septicémie. Ces souris ne possèdent pas de macrophages, d'ostéoclastes, de neutrophiles, de cellules dendritiques et de lymphocytes B et T (McKercher *et al.*, 1996) mais parviennent cependant à vivre quelques semaines de plus en présence d'antibiotiques. On observe alors l'apparition de lymphocytes T (mais pas de lymphocytes B) ainsi que quelques neutrophiles incapables de se différencier complètement.

Plusieurs autres modèles de souris Spi-1/Pu.1<sup>-/-</sup> (notamment des KO conditionnels) ont montré l'importance de Spi-1/Pu.1 dans le développement des cellules myéloïdes et des lymphocytes B :

- Au niveau de la cellule souche hématopoïétique : Spi-1/Pu.1 est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques et est essentiel à leur auto-renouvellement (Iwasaki *et al.*, 2005). Les cellules souches déficientes en spi-1/Pu.1 n'arrivent pas à générer les précurseurs myéloïdes et lymphoïdes (Iwasaki *et al.*, 2005).

- Au niveau des progéniteurs : il est nécessaire au développement des progéniteurs myéloïde communs (CMP) et des progéniteurs polynucléaire/monocytaire

ainsi qu'au développement des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) (Dakic *et al.*, 2005; Iwasaki *et al.*, 2005). La délétion de Spi-1/Pu.1 dans les progéniteurs polynucléaires/monocytiques induit une augmentation du nombre de granulocytes (Dakic *et al.*, 2005) et son invalidation dans les progéniteurs lymphoïdes communs n'empêche pas la maturation des lymphocytes B (Iwasaki *et al.*, 2005). Enfin Spi-1/Pu.1 est également exprimé à un faible niveau dans les progéniteurs érythroïdes. Sa délétion dans ces cellules entraîne la perte de leur auto-renouvellement, l'arrêt de la prolifération, leur différenciation prématurée et finalement leur apoptose (Back *et al.*, 2004).

- Au niveau de la différenciation macrophagique : Spi-1/Pu.1 est un acteur essentiel de la différenciation des monocytes en macrophages. Les cellules souches embryonnaires invalidées pour ce gène sont en effet incapables de se différencier en macrophages et n'expriment pas les marqueurs de différenciation classiques des macrophages tels que le récepteur au M-CSF ou le CD11b (Henkel *et al.*, 1996).

#### b) Spi-1/Pu.1 : régulateur de la transcription

Les sites de fixation de Spi-1/pu.1 ont été retrouvés dans plusieurs promoteurs de gènes myéloïdes et lymphoïdes B (Tableau 3). Dans les cellules B, il participe à l'expression des gènes codant pour les chaînes  $\kappa$  et  $\lambda$ , les chaînes lourdes  $\mu$  et les chaînes J des immunoglobulines. Lors de la différenciation des monocytes en macrophages, il participe notamment au contrôle de l'expression du récepteur au M-CSF et de certaines molécules d'adhésion. Il contrôle l'expression de nombreuses protéines enzymatiques des granules des neutrophiles et des macrophages (macrosialine ...). Il participe également à l'augmentation de l'expression du CD11b (chaîne  $\alpha$ M de l'intégrine) observée lors de la différenciation de lignées cellulaires par les ester de phorbol (Pahl *et al.*, 1993).

### Immunoglobulines

Chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$

Chaîne lourde  $\mu$

Chaîne J

Protéine Membranaire MB1

### Récepteurs

Immunoglobulines : Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIIIa

Complément: CR3 (CD11b/CD18) CR4 (CD11c/CD18)

Facteurs de Croissance : GM-CSFR, G-CSFR, M-CSFR

Récepteurs scavenger de type I et II

Récepteur au mannose

### Autres gènes

Protéines de la surface cellulaire : LFA-1 (CD11a/CD18), CD72, CD20, macrosialine

Cytokines : IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-1Ra

Kinases : Btk

Enzymes : elastase, cathepsine G, lysozyme, gelatinase, gp91, p47

CMH II I-A $\beta$

Protooncogènes : c-rel, c-fes

Tableau 3. Exemples de gènes régulés par Spi-1/Pu.1. D'après (Lloberas *et al.*, 1999).

L'activité transcriptionnelle Spi-1/Pu.1 peut être évaluée à l'aide de gènes rapporteurs placés sous le contrôle d'éléments de réponse à Spi-1/Pu.1. Dans des modèles cellulaires non hématopoïétiques (fibroblastes par exemple), Spi-1/Pu.1 apparaît comme étant un faible transactivateur. Dans des cellules fonctionnelles pour Spi-1/Pu.1 (lymphocytes B ou macrophages), l'activité de Spi-1/Pu.1 est en revanche très supérieure. Spi-1/Pu.1 aurait ainsi besoin d'autres facteurs pour avoir une activité transcriptionnelle optimale. Spi-1/Pu.1 interagit par exemple avec NF-IL6 pour activer l'expression du gène de l'IL-1 $\beta$  (Yang *et al.*, 2000). Les facteurs de transcription sp1 ou c-Jun coopèrent avec Spi-1/Pu.1 afin d'induire l'expression de leur gènes cibles (Eichbaum *et al.*, 1997; Grondin *et al.*, 2007). Ces complexes favoriseraient le recrutement de l'ARN polymérase II et des facteurs généraux de la transcription au niveau de ces gènes cibles facilitant ainsi leur expression (Grondin *et al.*, 2007). Spi-1/Pu.1 pourrait également faciliter la fixation de ces différents facteurs en modifiant la structure de la chromatine (Huo and Zhang, 2005; Krysinska *et al.*, 2007). De manière intéressante, de nombreux gènes myéloïdes ne possèdent pas une TATA box. Spi-1/Pu.1, en interagissant avec le facteur TBP (TATA box Binding Protein) pourrait par ce moyen recruter la machinerie basale de transcription des gènes (Tenen *et al.*, 1997).

## F) La différenciation macrophagique : la protéine inhibitrice de l'apoptose c-IAP1

Au cours de la différenciation des monocytes en macrophages, les caspases sont activées mais cette activation n'est pas associée à la mort cellulaire. Il existerait donc des mécanismes capables de protéger certaines cibles du clivage par les caspases. Dans le but d'identifier ces mécanismes de protection, l'équipe dirigée par le professeur Solary au sein de mon laboratoire a étudié l'implication des protéines inhibitrices de l'apoptose, les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) dans la différenciation des monocytes en macrophages. C'est ainsi qu'il a été montré que la protéine c-IAP1 (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1) jouait un rôle essentiel lors de la différenciation.

c-IAP1 est une protéine appartenant à la famille des IAPs. Ces protéines ont été identifiées initialement chez les baculovirus : afin de favoriser leur réplication, ces virus sont capables de protéger les cellules infectées de la mort cellulaire en produisant une protéine neutralisant les caspases, la protéine Cp-IAP (Crook *et al.*, 1993). Les IAPs ont été par la suite décrites dans plusieurs autres organismes et sont très conservées au cours de l'évolution (Miller, 1999; Schimmer, 2004). Chez l'homme, huit protéines IAPs ont été identifiées: NAIP (Baculoviral IAP repeat-containing BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), XIAP (BIRC4), survivine (BIRC5), Apollon (BIRC6), ML-IAP (BIRC7) et ILP-2 (BIRC8) (LaCasse *et al.*, 1998).

### 1) c-IAP1 : structure

Les IAPs sont caractérisées par la présence d'un à trois domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat) (Figure 17). Ces domaines, composés d'environ 70 résidus aminoacides, sont repliés en trois feuillets  $\beta$  et surmontés de 4 hélices  $\alpha$  (Sun *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2000; Verdecia *et al.*, 2000). Ces hélices et ces feuillets sont regroupés de manière à former un noyau hydrophobe au centre duquel est situé un atome de zinc. Les BIR ont pour fonction principale de permettre des interactions entre protéines. Leur répétition dans la séquence des IAPs permet d'augmenter l'affinité pour un partenaire protéique le nombre de partenaires potentiels (Yang and Li, 2000). c-IAP1 possède ainsi 3 domaines BIR.

c-IAP1 possède en c-terminal un domaine RING (Really Interesting New Gene) caractérisé par un enchaînement spécifique de résidus histidine et de cystéine permettant de coordonner deux atomes de zinc. Ce domaine confère à c-IAP1 une activité E3 ubiquitine ligase (enzyme qui catalyse le transfert d'un résidu ubiquitine préalablement activé par l'enzyme E1 puis transféré aux enzymes de conjugaison E2) (Vaux and Silke, 2005).

c-IAP1 et c-IAP2 possèdent un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain). Les domaines CARD sont engagés dans des interactions homotypiques, c'est à dire entre protéines pourvues de tels domaines. Ce sont généralement des régulateurs de l'apoptose mais la fonction du CARD de c-IAP1 et c-IAP2 reste encore inconnue.

Récemment un nouveau domaine a été identifié dans X-IAP, c-IAP1 et c-IAP2 : le domaine UBA (ubiquitin-associated) (Gyrd-Hansen *et al.*, 2008). Ce domaine, localisé entre les domaines BIR3 et CARD de c-IAP1, est capable de fixer la mono-ubiquitine ainsi que les chaînes poly-ubiquitine Lys48 et Lys63. Cette ubiquitinylation jouerait un rôle dans le renouvellement de la protéine (Blankenship *et al.*, 2009).

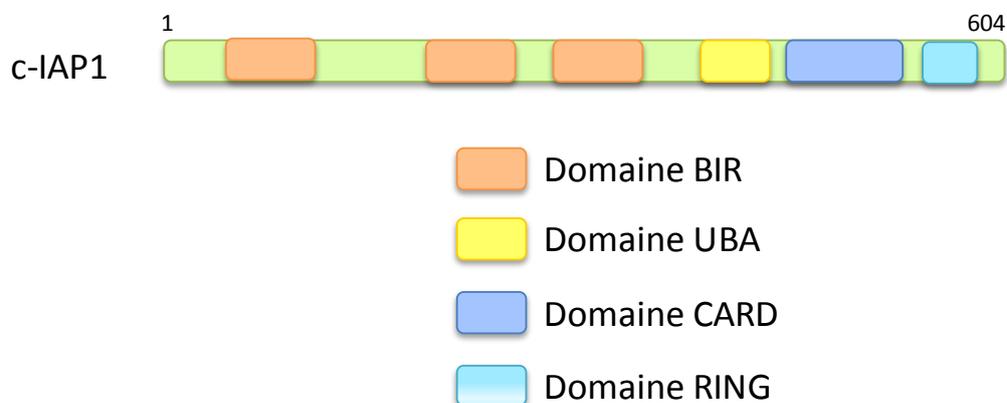


Figure 17. Structure de c-IAP1.

## 2) c-IAP1 : fonctions

### a) Régulation de l'apoptose

Les IAPs ont été initialement décrites comme protéines pouvant interagir avec les caspases et inhiber l'apoptose. C'est le cas par exemple de XIAP qui est le membre de la famille IAP le mieux caractérisé à l'heure actuelle. XIAP est capable d'inhiber directement les caspases -3, -7 et -9 *via* des interactions avec les domaines BIR2 et BIR3 (Salvesen and Duckett, 2002). Cependant malgré la présence de ces domaines, c-IAP1 ne semble pas être impliqué dans l'inhibition des caspases (Eckelman and Salvesen, 2006), même s'il se fixe à ces protéases. Grâce à leur domaine RING, c-IAP1 et c-IAP2 peuvent induire l'ubiquitinylation des caspases et pourraient donc ainsi entraîner leur dégradation par le protéasome (Choi *et al.*, 2009). c-IAP1 peut également interagir avec la protéine pro-apoptotique SMAC (Second Mitochondrial Activator of Caspases)/DIABLO (Direct IAP Binding protein with low pI). Cette dernière est relarguée de la mitochondrie dans le cytoplasme lors de l'apoptose et inhibe notamment XIAP. c-IAP1 séquestrerait smac/DIABLO et favoriserait ainsi l'activité anti-apoptotique de XIAP (Csomos *et al.*, 2009).

### b) Régulation de la voie des TNF-R et de NF- $\kappa$ B

c-IAP1 a été initialement isolée et caractérisée comme une protéine associée au récepteur II du Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . (TNFR-II). Il a été en effet observé qu'au niveau de ce récepteur, c-IAP1 interagissait avec les protéines adaptatrices TRAF1 et TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor) (Rothe *et al.*, 1995). Depuis, le rôle de c-IAP1 dans les mécanismes de signalisation cellulaire, notamment dans la signalisation des TNFR et de NF- $\kappa$ B a été approfondi.

Le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  a été identifié dans les années 1970 chez la souris pour son activité immunitaire anti-tumorale. Ce ligand se fixe à la surface des cellules au niveau de 2 récepteurs, TNFR-I et TNFR-II. La fixation du TNF $\alpha$  induit la trimérisation des récepteurs et le recrutement l'aide d'interactions domaine-domaine de différents partenaires protéiques à l'intérieur de la cellule. C'est la nature de ces partenaires protéiques qui va décider des mécanismes de signalisation à mettre en œuvre et, au final, du type de la

réponse à effectuer. Ainsi l'engagement du TNFR-I peut induire aussi bien des signaux de survie que des signaux de morts. Suite à la fixation du TNF $\alpha$  sur le TNFR-1, deux complexes protéiques peuvent être formés (Micheau and Tschopp, 2003). La formation du premier complexe (complexe 1), associé à la membrane plasmique, est responsable de l'activation de la voie de survie *via* notamment NF- $\kappa$ B. Le deuxième complexe (complexe 2) est cytosolique et conduit à la mort cellulaire (Figure 18). Le passage du complexe 1 au complexe 2 semble être induit par des modifications de RIP1 et de TRADD exposant le domaine de mort de TRADD permettant ainsi le recrutement de FADD et, par son intermédiaire, des caspases initiateurs.

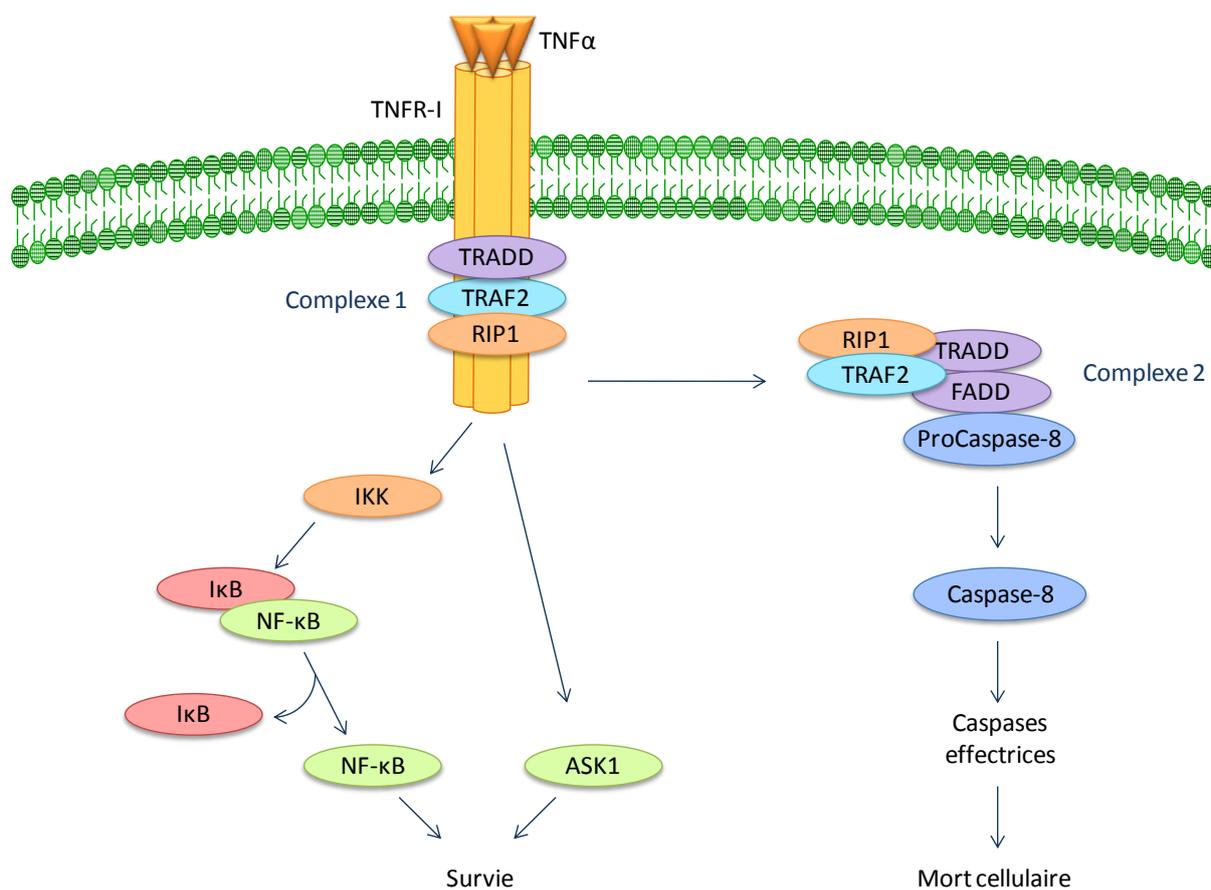


Figure 18. Représentation schématique de la signalisation du TNF $\alpha$ . L'engagement du TNFR-I au niveau membranaire peut induire des signaux de survie aussi bien que des signaux de mort suivant la nature du complexe formé. La fixation du TNF $\alpha$  sur le TNFR-1 peut entraîner la formation de deux complexes. Le complexe 1 regroupe la molécule adaptatrice TRADD, RIP1, TRAF2 et sa formation permet de favoriser la survie cellulaire via l'activation du facteur NF- $\kappa$ B et de ASK1. Le complexe 2 est composé de la quasi-totalité du complexe 1 ainsi que de la protéine FADD qui va permettre le recrutement et l'activation de la procaspase-8 et entraîner la mort cellulaire.

Grâce à son activité ubiquitine ligase, c-IAP1 possède deux grandes fonctions au niveau des récepteurs au TNF $\alpha$ . Au niveau du TNFR-II, c-IAP1 peut induire la dégradation de certains partenaires protéiques associés à ce récepteur et favoriser l'apoptose induite par l'activation du TNFR-I. Au niveau du TNFR-I, le rôle de c-IAP1 est moins connu. Il semblerait que c-IAP1 n'induit pas la dégradation des protéines mais contribue plutôt à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B généralement associé à la survie cellulaire (Srinivasula and Ashwell, 2008). Ainsi :

c-IAP1 ubiquitinyler TRAF2. L'étude des protéines associées au TNFR-2 a montré que c-IAP1 est capable de se fixer aux TNFR-I et TNFR-2 (Rothe *et al.*, 1995). Des expériences de double hybride ont par la suite mis évidence l'interaction directe entre c-IAP1 et un membre du complexe protéique associé au TNFR-I, la protéine adaptatrice TRAF2 (Uren *et al.*, 1996). Au sein du complexe, c-IAP1 interagit avec TRAF2 au niveau de son domaine BIR1 (Samuel *et al.*, 2006). Il permet alors l'ubiquitylation de TRAF2 et sa dégradation par le protéasome (Li *et al.*, 2002). L'activation du TNFR-II stimule la dégradation de TRAF2 par un mécanisme dépendant de l'activité ubiquitine ligase de c-IAP1, ce qui conduit à une sensibilisation des cellules à l'apoptose induite par la stimulation du TNFR-I par le TNF- $\alpha$  (Li *et al.*, 2002). c-IAP1 peut également ubiquityler TRAF3 et entraîner sa dégradation par le protéasome. TRAF3 est une protéine adaptatrice que se lie au niveau du CD40, autre membre de la famille des TNFR exprimé plus particulièrement au niveau des cellules immunitaires. La dégradation de TRAF3 permet l'activation des MAPK et de NF- $\kappa$ B (Karin and Gallagher, 2009).

c-IAP1 ubiquitinyler RIP1 : c-IAP1 et c-IAP2 ubiquitinyler directement la protéine RIP1 (Bertrand *et al.*, 2008; Mahoney *et al.*, 2008). L'ubiquitylation constitutive de RIP1 est associée à la survie des cellules, notamment les cellules cancéreuses, *via* la phosphorylation de IKK $\beta$  (I $\kappa$ B Kinase), la dégradation de I $\kappa$ B et l'activation de NF- $\kappa$ B (voie canonique d'activation). La déplétion de c-IAP1 conduit à la désubiquitylation de RIP1, sa dissociation du récepteur et son recrutement au niveau d'un complexe contenant FADD et la caspase-8 et à la mort cellulaire (Petersen *et al.*, 2007).

c-IAP1 ubiquitinylation ASK1 : ASK1 (Apoptotic Signal regulating Kinase1) appartient à la famille des MAPKKK (Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase). Elle peut s'associer à TRAF2 et réguler l'activation de p38 MAPK et de JNK suite à différents stimuli (Nagai *et al.*, 2007). Dans les lymphocytes B, une déficience en c-IAP1 empêche la dégradation de TRAF2 et d'ASK1 induite par une stimulation du TNFR-II, résultant en une activation prolongée de ces voies de survie (Zhao *et al.*, 2007).

c-IAP1 interagit avec NEMO/IKK $\gamma$  dans les cellules de col utérin humain HeLA, et catalyse son ubiquitinylation sans pour autant stimuler sa dégradation. Cette ubiquitinylation en réponse au TNF $\alpha$  induit l'activation de IKK $\gamma$  et de NF- $\kappa$ B (Tang *et al.*, 2003).

c-IAP1 peut également intervenir au niveau la voie non canonique de NF- $\kappa$ B *via* un complexe impliquant TRAF2, TRAF3 et NIK. L'ubiquitinylation de NIK et sa dégradation subséquente par le protéasome permet l'inhibition de la voie non canonique d'activation de NF- $\kappa$ B (Karin and Gallagher, 2009; Vince *et al.*, 2009).

Le rôle de c-IAP1 dans la signalisation du TNF $\alpha$  et dans l'activation de NF- $\kappa$ B est assez complexe. Les souris invalidées pour c-IAP1 possèdent une activation normale de NF- $\kappa$ B suite à la stimulation par le TNF $\alpha$  et ne sont pas plus sensibles à la mort induite par cette cytokine (Conze *et al.*, 2005). Cependant le niveau de c-IAP2 est anormalement élevé dans ces souris. c-IAP1 peut en effet ubiquitinyler et entraîner la dégradation de c-IAP2. Il existerait donc des mécanismes de compensation compromettant l'utilisation des souris invalidées pour c-IAP1.

### 3) c-IAP1 et la différenciation des monocytes en macrophages

Au cours de la différenciation des monocytes en macrophages, la protéine c-IAP1 migre du noyau vers le cytoplasme, et plus particulièrement au niveau de l'appareil de Golgi, (Plenchette *et al.*, 2004). Les mécanismes qui contrôlent la localisation cellulaire de c-IAP1 restent cependant assez mal compris. Sa taille l'empêchant de diffuser à travers les pores

nucléaires (Gorlich, 1998) ainsi que l'absence de signal de localisation nucléaire (NLS) classique suggèrent l'existence d'un autre mécanisme de transport impliqué dans sa localisation au niveau du noyau. Deux signaux d'export nucléaire (NES) fonctionnels sont retrouvés dans la séquence de la protéine au niveau du CARD. Ces séquences permettraient son export suite à sa reconnaissance par le transporteur exportine (Crm1) (Moroianu, 1998).

La translocation de c-IAP1 est un mécanisme nécessaire à la différenciation macrophagique. Sa surexpression bloque en effet le processus de différenciation (Plenchette *et al.*, 2004). Dans le noyau, c-IAP1 contribue à la régulation du cycle cellulaire (Samuel *et al.*, 2005) alors qu'il participe dans le cytoplasme à la dégradation de TRAF2 observée au cours de la différenciation des monocytes en macrophages. Cette dégradation, qui a lieu au niveau de l'appareil de Golgi, est nécessaire au processus de différenciation et à la réponse au ligand du CD40 (Dupoux *et al.*, 2009).

#### 4) Inhibition de c-IAP1

L'étude du rôle de c-IAP1 est facilitée par l'utilisation de différents inhibiteurs. Ces molécules ont été développées grâce à l'analyse de la structure tridimensionnelle des IAPs et de leur inhibiteur smac/DIABLO.

La fonction pro-apoptotique de smac/DIABLO dépend de 4 résidus conservés (Ala-Val-Pro-Ile : AVPI) situés en N-terminal et permettant l'interaction avec le domaine BIR3 de XIAP, c-IAP1 et c-IAP2 (Du *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2006; Verhagen *et al.*, 2000). Plusieurs molécules ont été alors développées à partir de l'étude de l'interaction entre ces IAPs et smac/DIABLO. Ces molécules (Smac mimétiques) imitent la partie AVPI de Smac/DIABLO et diffèrent entre elle dans leur structure chimique. On retrouve ainsi dans la molécule SMAC-N7 les résidus AVPIAQK correspondant à cette partie de smac/DIABLO (Heckl *et al.*, 2008). A l'heure actuelle, plus de 50 brevets ont été déposés concernant l'élaboration et l'utilisation de ces inhibiteurs (Flygare and Fairbrother, 2010). Ces molécules ont par ailleurs montré d'excellents résultats en tant qu'agents anti-cancéreux utilisés seuls ou en combinaisons avec d'autres produits (Petersen *et al.*, 2007; Vince *et al.*, 2007; Zobel *et al.*, 2006).

Les smac mimétiques n'inhibent pas réellement c-IAP1 et c-IAP2 mais induisent plutôt leur dégradation dès les minutes qui suivent le traitement sans affecter le niveau des autres IAPs et des TRAFs (Varfolomeev *et al.*, 2007; Vince *et al.*, 2007). Cette dégradation fait intervenir le protéasome et dépend de la concentration en inhibiteur utilisée. La dégradation de c-IAP1 est le résultat de l'auto-ubiquitinylation de c-IAP1 (Varfolomeev *et al.*, 2007) : les smac mimétiques altèrent probablement la conformation de c-IAP1 favorisant l'accès aux résidus à ubiquitinyler. De nombreuses ubiquitine ligase stimulent ainsi leur propre ubiquitinylation en absence de leur substrat.

### **G) Les HSPs**

Annexe III : Mini Review : *Apoptosis Versus Cell Differentiation*, (Lanneau *et al.*, 2007)

Les protéines de choc thermique possèdent, notamment grâce à leur activité chaperon, un rôle déterminant dans plusieurs processus cellulaires. Nous avons vu par exemple que ces protéines sont fortement impliquées dans la régulation de l'apoptose. Etant donné que les mécanismes de l'apoptose et de la différenciation sont assez proches, il n'est pas étonnant que les HSPs participent à la différenciation cellulaire.

Le niveau d'expression des HSPs est finement régulé au cours du développement et de la différenciation. Ainsi au cours de la formation de l'os endochondral, l'expression de HSP27, HSP70 et HSP90 varie selon les étapes de l'ossification (Loones and Morange, 1998). L'expression des différentes HSPs varie également au cours de la différenciation cellulaire des cellules de carcinome de colon HT29 (Cai *et al.*, 2006), des cellules K562 par le sodium butyrate (Grebénova *et al.*, 2006) ou de la différenciation des ostéoblastes (Shakoori *et al.*, 1992).

## 1) HSF1 au cours du développement et de la différenciation cellulaire

Les souris invalidées pour HSF1 sont viables mais possèdent plusieurs altérations du placenta, une létalité prénatale ou des retards de croissance. Ces souris ne sont pas fertiles et produisent de manière anormalement élevée du TNF $\alpha$ , provoquant alors une augmentation de la mortalité en réponse aux endotoxines (Xiao *et al.*, 1999). Le niveau basal des HSPs reste cependant inchangé mais la réponse au choc thermique est abrogée. HSF1 est également essentiel au développement des ovocytes en contrôlant l'expression de HSP90 $\alpha$  (Bierkamp *et al.*, 2010; Metchat *et al.*, 2009). HSF1 est ainsi considéré comme un facteur maternel essentiel au développement des embryons (Christians *et al.*, 2000). Chez le poisson zèbre, HSF1 est nécessaire au bon développement de la lentille au stade embryonnaire (Evans *et al.*, 2007).

Concernant le phénomène de différenciation cellulaire, une surexpression de HSF1 dans les cellules du colon bloque la différenciation induite par le sodium butyrate (Cai *et al.*, 2006). HSF1 est également responsable de l'augmentation de l'expression de HSP70 observée au cours de la différenciation des cellules erythroleucémiques K562 par l'hémine (Trinklein *et al.*, 2004; Yoshima *et al.*, 1998).

## 2) HSP27

L'expression de HSP27 est augmentée lors du développement des embryons de poissons zèbres (Mao and Shelden, 2006), au cours de la différenciation des keratinocytes, des cellules musculaires C2C12 (Ito *et al.*, 2001) ou lors de la différenciation des cellules HL-60 en granulocytes induite par l'acide rétinoïque (Chaufour *et al.*, 1996). L'implication de HSP27 dans la différenciation de ces cellules serait liée d'une part à sa capacité à se fixer aux protéines du cytosquelette et à favoriser le réarrangement de ce dernier lors de la différenciation cellulaire (Bektas and Rubenstein, 2010) et d'autre part à induire l'arrêt de la prolifération cellulaire (Spector *et al.*, 1994).

Nous avons montré récemment que HSP27 était fortement impliquée dans la différenciation érythroïde en contrôlant le niveau de GATA-1. La déplétion de HSP27 induit

en effet une accumulation de GATA-1 et bloque la différenciation des cellules K562 induite par l'hémine et la différenciation des cellules CD34+ par l'Epo. Vers la fin de la différenciation érythroïde, HSP27 est phosphorylée, entre dans le noyau, se lie à GATA-1 et induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (*annexe IV : HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation*, de Thonel *et al.*, 2010, sous presse).

### 3) HSP70

Le niveau d'expression de HSP70 varie également au cours du développement et de la différenciation de plusieurs types cellulaires (Martin *et al.*, 2009; Oza *et al.*, 2008).

Au cours de la différenciation érythroïde, HSP70 protège les cellules en cours de différenciation de la mort cellulaire. Elle empêche la translocation de AIF évitant ainsi la fragmentation de l'ADN (Lui and Kong, 2007) et protège également certaines protéines telles que GATA-1 du clivage par les caspases (Ribeil *et al.*, 2007). HSP70 favorise également la différenciation et la survie des cellules HL-60 en cellules de type macrophage ou granulocyte (Kwak *et al.*, 1998).

### 4) HSP90

HSP90 est une protéine essentielle au développement des organismes. Son invalidation, sa déplétion ou les mutations du gène correspondant sont effet létales chez la drosophile (Yue *et al.*, 1999), le nématode (Inoue *et al.*, 2006), le poisson zèbre (Krone *et al.*, 2003) et la souris (Voss *et al.*, 2000). Le rôle essentiel de HSP90 dans le développement et la différenciation cellulaire viendrait notamment du fait que de nombreuses protéines ont besoin de HSP90 pour être stabilisée ou actives. Par exemple HSP90, en contrôlant l'état de phosphorylation de AKT, permet la différenciation des cellules musculaires C2C12 (Yun and Matts, 2005). HSP90 permet également la translocation dans le noyau de l'héparanase aboutissant à la différenciation des cellules HL-60 par le TPA (Nobuhisa *et al.*, 2007).

Résultats : première partie

*L'interaction entre HSP90 $\beta$  et c-IAP1 est  
nécessaire à la différenciation cellulaire*

# Préambule

---

Les caspases, principales protéines effectrices de l'apoptose, sont activées au cours de la différenciation des monocytes en macrophages (Sordet *et al.*, 2002). Cette activation n'entraîne pas la mort des monocytes mais est au contraire nécessaire à la différenciation de ces cellules. Afin de comprendre les mécanismes par lesquels les monocytes sont protégés de la mort cellulaire, l'équipe dirigée par le professeur E. Solary au sein de mon laboratoire étudie les protéines normalement impliquées dans la régulation du processus apoptotique dans le contexte de différenciation cellulaire. C'est ainsi qu'ils ont mis en évidence l'implication de la protéine inhibitrice de l'apoptose c-IAP1 dans le cadre de la différenciation cellulaire.

Au cours de la différenciation macrophagique, c-IAP1 migre du noyau vers le cytoplasme (Plenchette *et al.*, 2004). Une analyse par protéomique des partenaires protéiques de c-IAP1 a révélé la présence de la protéine de choc thermique HS90. Mon travail a donc consisté à déterminer si la protéine de choc thermique HSP90 s'associe avec c-IAP1 pour permettre son export nucléaire et à étudier l'implication de cette protéine de choc thermique dans le cadre de la différenciation cellulaire.

Afin d'étudier la différenciation macrophagique, j'ai utilisé des monocytes primaires issus du sang périphérique de donneurs humains dont la différenciation en macrophage peut être induite par le facteur de croissance M-CSF. J'ai également utilisé la lignée cellulaire THP1. Ces cellules sont issues d'une leucémie monocytique aigüe et peuvent se différencier en cellules de type macrophage par un traitement par un ester de phorbol, le TPA. Ces deux modèles cellulaires présentent cependant l'inconvénient d'être extrêmement difficiles à transfecter. La relocalisation de c-IAP1 est un phénomène retrouvé dans plusieurs autres modèles de différenciation cellulaires. C'est le cas par exemple de la différenciation des cellules HT-29 (lignée de carcinome colique) en cellules productrices de mucus qui peut être induite par le butyrate de sodium. J'ai donc utilisé cet autre modèle de différenciation afin de réaliser les diverses expériences de transfection nécessaires à mon étude.

Des altérations des mécanismes de l'hématopoïèse sont retrouvées dans plusieurs types de leucémies (leucémies aiguës myéloblastiques et leucémies myélo-monocytaires chroniques). Ces deux types de leucémies sont caractérisés par un nombre anormalement élevé de monocytes résultant entre autre d'un défaut de la différenciation de ces cellules en macrophages. Comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les voies de différenciation se révèle donc extrêmement important afin de mieux connaître ces pathologies et de trouver des traitements adaptés.

L'ensemble de ce travail a été publié en 2008 dans le journal « Cell Death and Differentiation ».

# Interaction of heat-shock protein 90 $\beta$ isoform (HSP90 $\beta$ ) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation

C Didelot<sup>1,2,6</sup>, D Lanneau<sup>1,2,6</sup>, M Brunet<sup>1,2</sup>, A Bouchot<sup>3</sup>, J Cartier<sup>1</sup>, A Jacquel<sup>1</sup>, P Ducoroy<sup>3,4</sup>, S Cathelin<sup>1,2</sup>, N Decolgne<sup>1,2</sup>, G Chiosis<sup>5</sup>, L Dubrez-Daloz<sup>1,2</sup>, E Solary<sup>1,2</sup> and C Garrido<sup>\*,1,2</sup>

Members of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family have demonstrated functions in cell death, cell signalling, cell migration and mitosis. Several of them are E3 enzymes in the ubiquitination of proteins that leads to their degradation by the proteosomal machinery. We previously reported that one of them, cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (c-IAP1), migrated from the nucleus to the surface of the Golgi apparatus in cells undergoing differentiation. Here, we show that c-IAP1 is a client protein of the stress protein HSP90 $\beta$ . In three distinct cellular models, the two proteins interact and migrate from the nucleus to the cytoplasm along the differentiation process through a leptomycin B-sensitive pathway. Inhibition of HSP90 proteins by small chemical molecules and specific depletion of HSP90 $\beta$  isoform by siRNA both lead to auto-ubiquitination of c-IAP1 and its degradation by the proteasome machinery. This chaperone function of HSP90 towards c-IAP1 is specific of its  $\beta$  isoform as specific depletion of HSP90 $\alpha$  does not affect c-IAP1 content. Chemical inhibition of HSP90 or siRNA-mediated depletion of HSP90 $\beta$  both inhibit cell differentiation, which can be reproduced by siRNA-mediated depletion of c-IAP1. Altogether, these results suggest that HSP90 $\beta$  prevents auto-ubiquitination and degradation of its client protein c-IAP1, whose depletion would be sufficient to inhibit cell differentiation.

*Cell Death and Differentiation* advance online publication, 1 February 2008; doi:10.1038/cdd.2008.5

Members of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family were initially described as a series of natural inhibitors of cell death. Among the eight human proteins of this family, X-linked IAP (XIAP) demonstrated to be the bona fide caspase inhibitor<sup>1</sup> whereas the others demonstrated, for the most part, functions in cell signalling<sup>2</sup> and mitosis.<sup>3</sup> Several of these proteins harbour a Really Interesting New Gene (RING) domain at the carboxy terminus and function as an E3 enzyme in the cascade of ubiquitination that targets proteins to the ubiquitin-proteasome degradation machinery.<sup>4</sup>

One of these IAP with a RING domain is cellular IAP1 (c-IAP1) that was initially described as a signalling molecule.<sup>2</sup> Although c-IAP1 has subsequently been described as a direct inhibitor of caspases, this remains a controversial issue.<sup>5,6</sup> Due to its E3 function, c-IAP1 is responsible for the ubiquitination and subsequent degradation of the adaptor protein TNF receptor associated factor 2<sup>7</sup> and the serine-threonine apoptosis signal-regulating kinase 1<sup>8</sup> in the tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) signalling pathway. In this TNF $\alpha$  pathway, c-IAP1 was reported also to interact with the serine-threonine kinases receptor interacting protein 2 and nuclear

factor kappaB (NF- $\kappa$ B) essential modifier, upstream of NF- $\kappa$ B,<sup>9</sup> and to block caspase-8 activation, downstream of NF- $\kappa$ B.<sup>10</sup>

Deletion experiments in *Drosophila melanogaster* have revealed other functions of IAPs in cell differentiation,<sup>11</sup> cell migration,<sup>12</sup> and immune response.<sup>13</sup> In mammals, c-IAP1-deficient mice develop normally. However, cells from c-IAP1 $-/-$  mice express markedly elevated levels of its highly homologous protein c-IAP2, suggesting that a redundancy in the function of the two proteins might take place.<sup>14</sup> Deletion of several other IAPs have demonstrated to lead to defaults in the development. XIAP deficiency delays development of the mammary gland<sup>15</sup> whereas that of BRUCE, a giant E3 ubiquitin ligase IAP, affects placenta development<sup>16</sup> and T-cell maturation.<sup>17</sup> How IAPs interfere with the differentiation pathways remain undetermined.

We have reported previously that c-IAP1 was located in the nucleus of undifferentiated cells and migrated to the cytoplasm along the differentiation process to concentrate at the surface of the Golgi apparatus in terminally differentiated cells.<sup>18</sup> In a search for a function of c-IAP1 in the different

<sup>1</sup>INSERM, UMR 866, Dijon, France; <sup>2</sup>University of Burgundy, Dijon, France; <sup>3</sup>IFR-Sante-STIC, Dijon, France; <sup>4</sup>Department of haematology, CHU Le Bocage, Dijon, France and <sup>5</sup>Department of Medicine, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

\*Corresponding author: C Garrido, Faculty of Medicine and Pharmacy, INSERM UMR866, 7, boulevard Jeanne d'Arc, Dijon 21049, France. Tel: + 33 380 39 32 84; Fax: + 33 380 39 34 34; E-mail: cgarrido@u-bourgogne.fr

<sup>6</sup>These authors have contributed equally to this work.

**Keywords:** cell differentiation; HSP90 $\beta$ ; c-IAP1; new HSP90 client protein

**Abbreviations:** 17-AAG, 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; c-IAP1, cellular IAP-1; FBS, fetal bovine serum; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HSP, heat shock protein; IAP, inhibitor of apoptosis protein; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; NaB, sodium butyrate; NEMO, NF- $\kappa$ B essential modifier; NES, nuclear export sequence; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappaB; NP-40, Nonidet P-40; RING, really interesting new gene; RIP, receptor interacting protein; siRNA, small interfering RNA; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor alpha; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TRAF2, TNF receptor-associated factor 2; XIAP, X-linked IAP

Received 20.8.07; revised 22.11.07; accepted 09.12.07; Edited by S Kumar

cellular compartments, we have identified an interaction between c-IAP1 and heat-shock protein 90  $\beta$  isoform (HSP90 $\beta$ ), a molecular chaperone abundant in cancer cells and whose inhibition is currently being tested in cancer therapy. HSP90 $\beta$  migrates with c-IAP1 from the nucleus to the cytoplasm and its inhibition induces c-IAP1 degradation by the proteasomal machinery, which can be sufficient to block the differentiation process.

## Results

**HSP90 $\beta$  associates with c-IAP1.** In an approach to determine the functional role of c-IAP1 in the different cell compartments, we performed a mass spectrometry analysis of the proteins immunoprecipitated with an anti-c-IAP1 antibody in monocytic THP1 cells before (c-IAP1 located in the nucleus) and after (c-IAP1 located in the cytoplasm) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced differentiation into macrophages. Interestingly, in three different experiments, we identified peptides

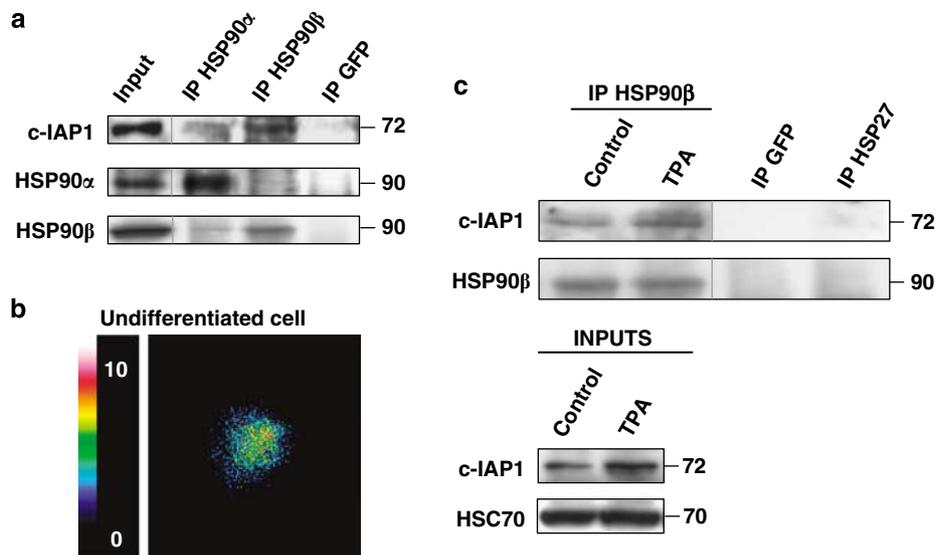
**Table 1** HSP90-derived peptides interacting with c-IAP1

Heat-shock protein	Peptide	Position
HSP90 $\beta$	ELISNANASDALDK	42–53
	IDIIPNPQER	73–82
	LGIHEDSTNR	439–448
	EQVANSAFVER	492–502
HSP90 $\alpha$	NONE	

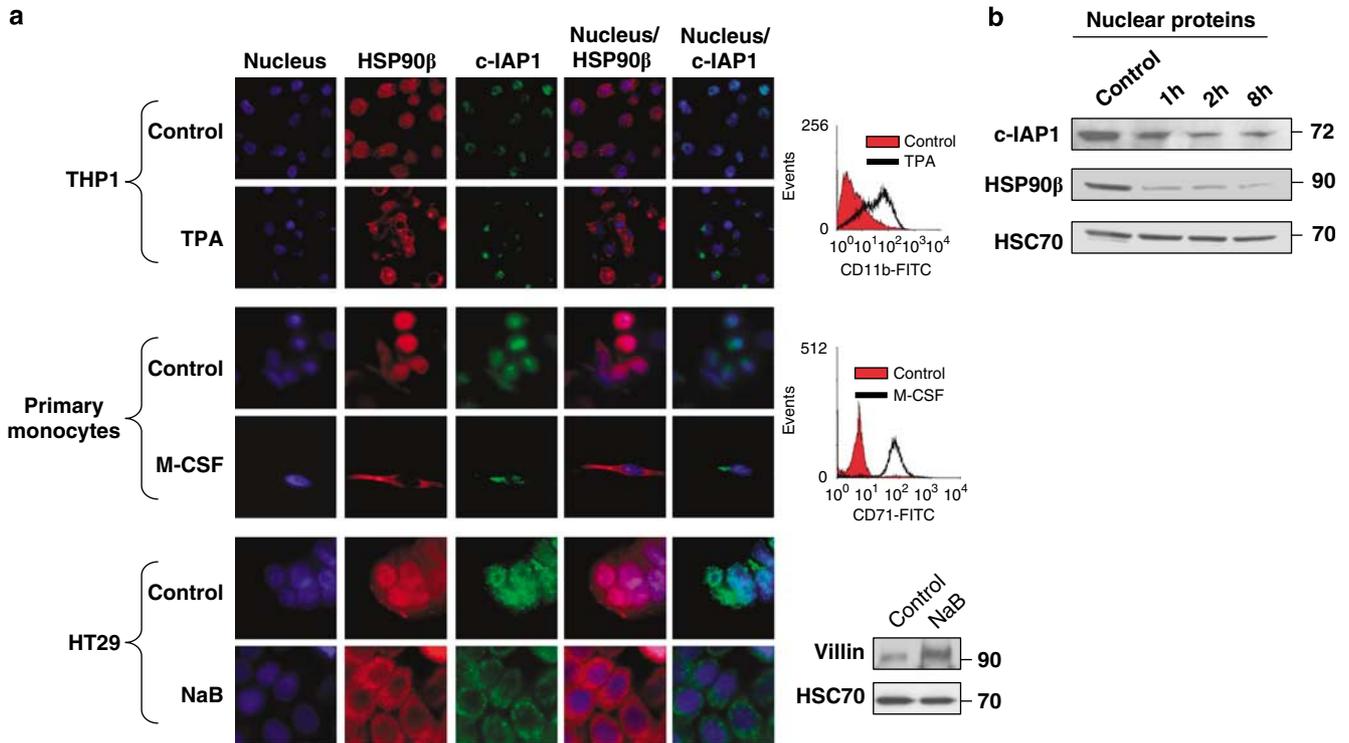
Peptides identified by mass spectrometry MS/MS after c-IAP1 immunoprecipitation

corresponding to the isoform  $\beta$  of the heat-shock protein HSP90 whereas no peptide of the  $\alpha$  isoform was identified (Table 1). HSP90 is the most abundant molecular chaperone in eukaryotic cells, comprising  $\sim$ 1–2% of cellular proteins under non-stressed conditions. In mammals, two isoforms exist, which are encoded by different but highly conserved genes.<sup>19</sup> We confirmed the interaction of c-IAP1 with HSP90 $\beta$  by immunoprecipitation using an antibody that specifically recognizes the HSP90 $\beta$  isoform and immunoblotting with an anti-c-IAP1 antibody (Figure 1a). In contrast, immunoprecipitation with an antibody that specifically recognizes HSP90 $\alpha$  isoform did not detect a strong interaction of this isoform with c-IAP1 (Figure 1a). FRET analysis confirmed the c-IAP1/HSP90 $\beta$ -interaction in THP1 cells (energy level higher than five, in green, yellow or red (Figure 1b). In these THP1 cells, c-IAP1/HSP90 $\beta$ -interaction was observed only in the nucleus, confirming our previous observations that c-IAP1 has a nuclear localization in undifferentiated cells.<sup>18</sup> The c-IAP1/HSP90 $\beta$ -interaction was also observed in differentiated cells (Figure 1c). TPA-induced differentiation of THP1 cells was associated with an increase in c-IAP1 expression (Figure 1c, lower panel) together with an increased amount of c-IAP1 associated with HSP90 $\beta$  (Figure 1c, upper panel). Mutations in leucine residues that characterize the three potential c-IAP1 nuclear export sequences<sup>18,20</sup> did not affect the HSP90 $\beta$ /c-IAP1 interaction (data not shown), indicating that the protein–protein interaction involves other c-IAP1 sequences.

**HSP90 $\beta$  translocates with c-IAP1 from the nucleus to the cytoplasm.** To determine whether HSP90 $\beta$  relocalized with c-IAP1 from the nucleus to the cytosol during differentiation, we performed immunofluorescence and cell fractionation



**Figure 1** c-IAP1 interacts with HSP90 $\beta$ . (a) Immunodetection of c-IAP1, HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  after immunoprecipitation with HSP90 $\alpha$  (IP HSP90 $\alpha$ ) or HSP90 $\beta$  (IP HSP90 $\beta$ ) or a non-relevant (IP GFP) antibody (Ab) in undifferentiated THP1 cells. (b) FRET analysis of c-IAP1 interaction with HSP90 $\beta$  in undifferentiated THP1 cells. (c) Upper blot, immunodetection of c-IAP1 after immunoprecipitation with HSP90 $\beta$  Ab (IP HSP90 $\beta$ ) in THP1 cells left untreated or treated with TPA (20 nM, 24 h). Immunoprecipitations with HSP27 or GFP antibodies were used as negative controls (IP HSP27, IP GFP). Lower blot, amount of c-IAP1 in the inputs. HSC70 was used as protein loading control

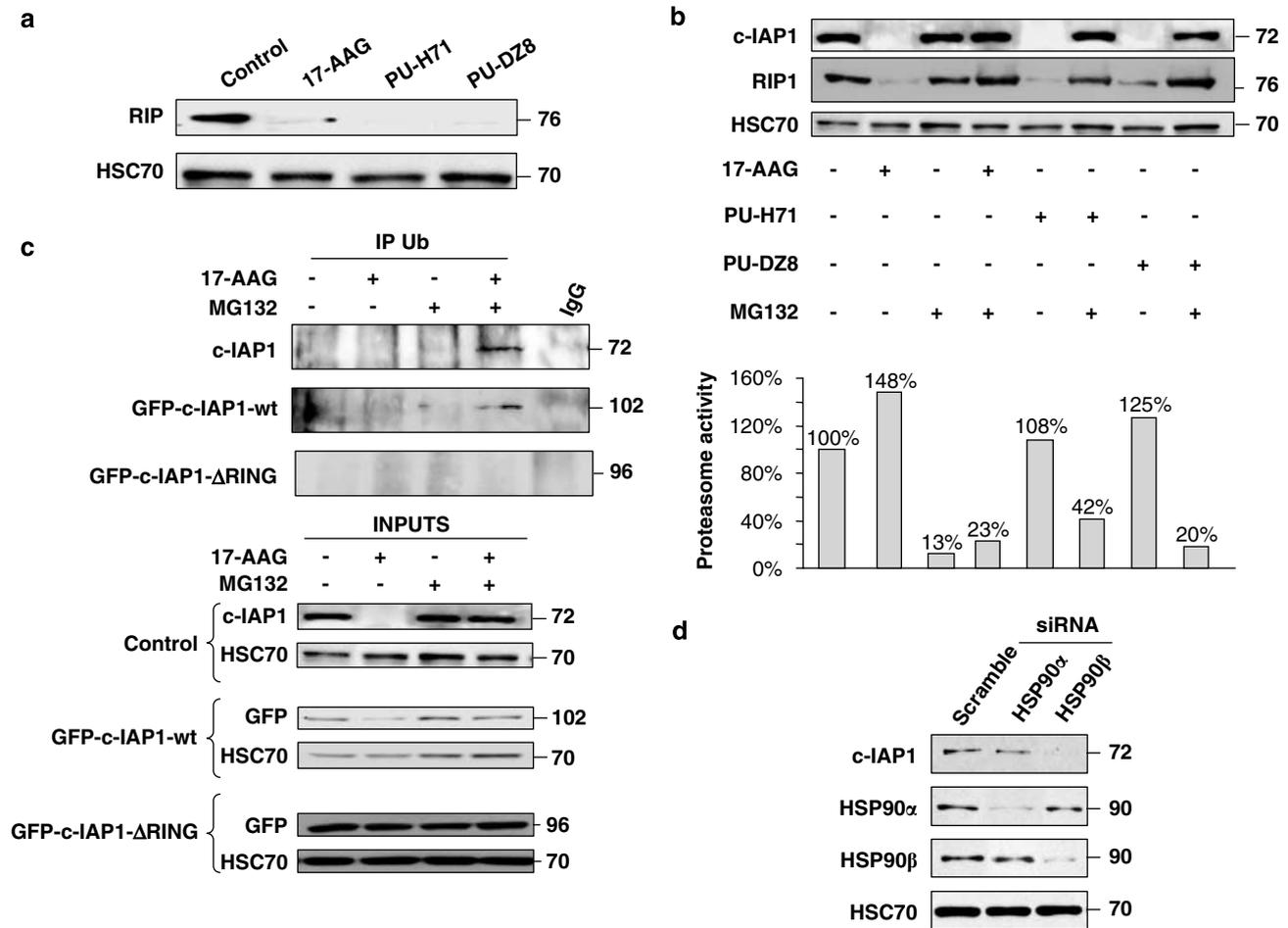


**Figure 2** Nuclear extrusion of c-IAP1 and HSP90 $\beta$  during cell differentiation. (a) Fluorescence microscopy analysis of HSP90 $\beta$  (red) and c-IAP1 (green) in monocytic cells (THP1 and peripheral blood mononuclear cells) and colon cancer HT-29 cells. Cells were either left untreated (control) or exposed to TPA (20 nM, 24 h), M-CSF (100 ng/ml, 3 days) or NaB (3 mM, 3 days), respectively. Differentiation was monitored by flow cytometric analysis of CD11b or CD71 membrane expression for THP1 and primary monocytes respectively, and by immunodetection of villin for HT-29 cells. HSC70 was used as protein loading control. Nuclei, labelled with Hoescht 33342, are stained in blue. Magnification  $\times 300$ . One representative figure is shown ( $N=4$ ). (b) Western blot analysis of c-IAP1 and HSP90 $\beta$  in nuclear extracts of THP1 cells, either left untreated or treated with 20 nM TPA for 1, 2 or 8 h. HSC70 was used as protein loading control

studies. Immunofluorescence analysis in TPA-differentiated compared to undifferentiated THP1 cells indicated that c-IAP1 and HSP90 $\beta$  both translocated from the nucleus to the cytosol (Figure 2a). The cellular redistribution of the two proteins was also observed in two other cell models. Primary monocytes (peripheral blood mononuclear cells) were induced to differentiate into macrophages upon M-CSF exposure for 3 days and their differentiation was assessed by morphological changes and the expression of CD71 and CD163 at their surface (Figure 2a and Supplementary Figure 1). HT-29 colon cancer cells were induced to differentiate in mucin-producing cells by exposure to sodium butyrate (NaB) and their differentiation was assessed by morphological changes and the expression of villin (Figure 2a). In all cases, the differentiation associated nuclear extrusion of both c-IAP1 and HSP90 $\beta$  was blocked by cell treatment with leptomyacin B, a specific inhibitor of the nuclear export protein exportin 1 (Supplementary Figure 2).<sup>18,20</sup> The nuclear exit of c-IAP1 and HSP90 $\beta$  seems to be an early event in a differentiation process. Only one hour after TPA treatment of THP1 cells, the content of both proteins in the nucleus was strongly decreased (Figure 2b).

**c-IAP1 is a client protein of HSP90.** Heat shock protein 90 is required for the maturation and functional stability of a number of proteins termed HSP90 client proteins. Upon

inhibition of HSP90, the client protein is not anymore chaperoned and, as a consequence, is degraded by the proteasome. Since c-IAP1 associated with HSP90 $\beta$  and these two proteins were redistributed from the nucleus to the cytoplasm with the same kinetics, we wondered whether c-IAP1 was a client protein of HSP90 $\beta$ , that is, was degraded by the proteasome machinery when HSP90 activity was inhibited. To answer this question, we used three small soluble inhibitors of HSP90, including the benzoquinone ansamycin 17-allylaminogeldanamycin (17-AAG) and the synthetic small molecule inhibitors of the purine scaffold class PU-H71 and PU-DZ8. Exposure of HT-29 cells for 18 h to any of the three compounds efficiently decreased the expression of the protein RIP1, a well known HSP90 client protein (Figure 3a),<sup>21</sup> in the absence of any significant apoptosis (not shown). These treatments all reduced the amount of the endogenous c-IAP1 detected with a virtually complete disappearance of the protein after 24 h of drug treatment, as demonstrated by western blot (Figure 3b) and immunofluorescence experiments (Supplementary Figure 3). The pattern of c-IAP1 levels after the different treatments was similar to that of RIP1 (Figure 3b). The disappearance of c-IAP1, as that of RIP1, was prevented by cotreatment with the proteasome inhibitor MG132 whose efficacy was assessed by quantifying the ability of cell lysates to cleave the substrate Suc-LLVY-AMC<sup>22</sup> (Figure 3b) and by determining the total amount of

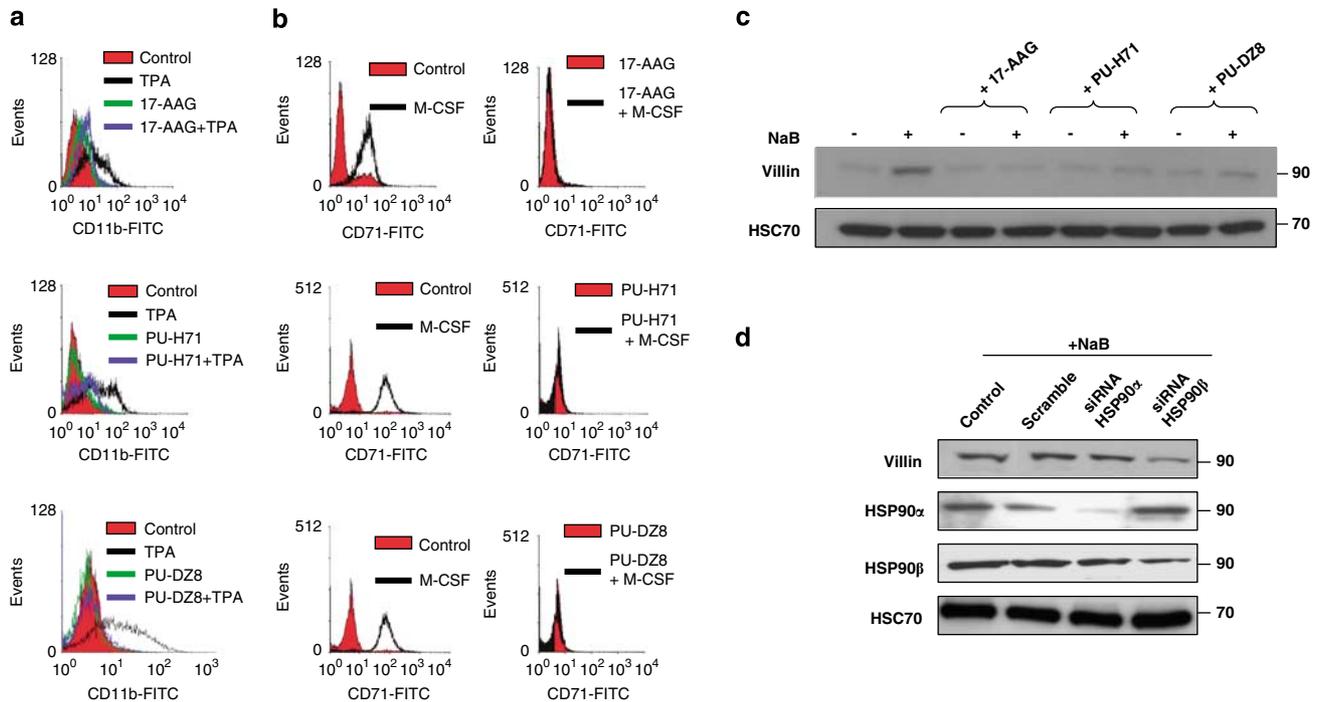


**Figure 3** c-IAP1 is a client protein of HSP90. (a) Western blot analysis of RIP in untreated cells (control) or treated for 18 h with 17-AAG (1  $\mu$ M), PU-H71 (200 nM) or PU-DZ8 (100 nM). HSC70 was used as protein loading control. (b) HT-29 cells were treated with the HSP90 inhibitors 17-AAG (1  $\mu$ M), PU-H71 (200 nM) or PU-DZ8 (100 nM) for 18 h in the presence or absence of MG132 (2  $\mu$ M) before measuring the ability of cell lysates to cleave the substrate Suc-LLVY-AMC. c-IAP1 and RIP1 protein contents were determined by western blot. HSC70 was used as protein loading control. (c) Upper panel, HT-29 control transfected (Control), transfected with a c-IAP1 wild-type construct (GFP c-IAP1 wt) or transfected with a c-IAP mutant in which the RING domain has been deleted (GFP c-IAP1 $\Delta$ RING), were either left untreated or treated with 17-AAG (1  $\mu$ M, 18 h) in the presence or absence of MG132 (2  $\mu$ M, 18 h). The amount of the c-IAP1 was immunodetected (IB) with a c-IAP1 Ab or GFP Ab (for endogen and transfected c-IAP1 respectively) after immunoprecipitation with an ubiquitin Ab (IP Ub). Lower panel, immunodetection of c-IAP1 (endogen and GFP-derived constructs) in the previously described transfected cells, before ubiquitin immunoprecipitation (inputs). HSC70 was used as protein loading control. (d) Immunodetection of c-IAP1, HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  in HT-29 cells, transfected with scramble siRNA or transfected with a siRNA that targets HSP90 $\alpha$  or HSP90 $\beta$  respectively. HSC70 was used as protein loading control

ubiquitinated proteins in the cells (Supplementary Figure 4). As expected, this total amount of ubiquitinated proteins inversely correlated with the proteasome activity, reflecting their degradation.

Immunoprecipitation of ubiquitinated proteins followed by identification of c-IAP1 by immunoblotting indicated that ubiquitinated c-IAP1 was detected upon treatment with 17-AAG in the presence of the proteasome inhibitor MG132 (Figure 3c). Interestingly, deletion of the RING domain of c-IAP1 prevented its ubiquitination upon inhibition of HSP90 by 17-AAG, suggesting its auto-ubiquitination (Figure 3c).<sup>23</sup> HSP90 inhibitors equally target HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  isoforms. To determine which of the two isoforms was involved in the degradation of c-IAP1, we depleted one or the other isoform by the use of specific siRNAs. As shown in Figure 3d, depletion of HSP90 $\beta$  induced a decrease in c-IAP1 expression while no effect was observed when depleting HSP90 $\alpha$  (Figure 3d).

**Inhibition of HSP90 blocks cells differentiation.** Exposure of THP1 cells to the three tested HSP90 inhibitors was observed to prevent their TPA-induced differentiation, as assessed by the lack of characteristic changes in cell morphology (not shown) and the lack of CD11b expression increase at the cell surface (Figure 4a). Similarly, these inhibitors prevented M-CSF-induced differentiation of peripheral blood monocytes, as indicated by the lack of cell adhesion to the culture flask (not shown) and the lack of appearance of the differentiation markers CD71 (Figure 4b) and CD163 (Supplementary Figure 1). HSP90 inhibitors also blocked the NaB-induced differentiation of HT-29 cells, as indicated by the lack of induction of villin expression (Figure 4c). siRNA-mediated decrease in the expression of HSP90 $\beta$  also inhibited NaB-induced villin expression in HT-29 cells whereas siRNA-mediated decrease in the expression of HSP90 $\alpha$  did not (Figure 4d). These results suggested a specific function for HSP90 $\beta$  isoform in cell differentiation.



**Figure 4** Inhibitors of HSP90 or specific depletion of HSP90 $\beta$  block cell differentiation. (a) Flow cytometry analysis of CD11b membrane expression in THP1 cells left untreated (control) or treated with the inhibitors of HSP90 17-AAG (1  $\mu$ M), PU-H71 (200 nM) or PU-DZ8 (100 nM), in the presence or absence of TPA (20 nM, 24 h). (b) Flow cytometry analysis of CD71 membrane expression in primary monocytes before (control) and after exposure to M-CSF (100 ng/ml) for 3 days, in the presence or absence of 17-AAG (1  $\mu$ M), PU-H71 (200 nM) or PU-DZ8 (100 nM). (c) Immunodetection of villin in HT-29 cells either left untreated or treated with sodium butyrate (NaB, 3 mM for 3 days), in the presence or absence of 17-AAG (1  $\mu$ M), PU-H71 (200 nM) or PU-DZ8 (100 nM). HSC70 was used as protein loading control. (d) Immunodetection of Villin, HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  in HT-29 cells non transfected (control), transfected with scramble siRNA, a siRNA that targets HSP90 $\alpha$  or a siRNA that targets HSP90 $\beta$ . HSC70 was used as protein loading control

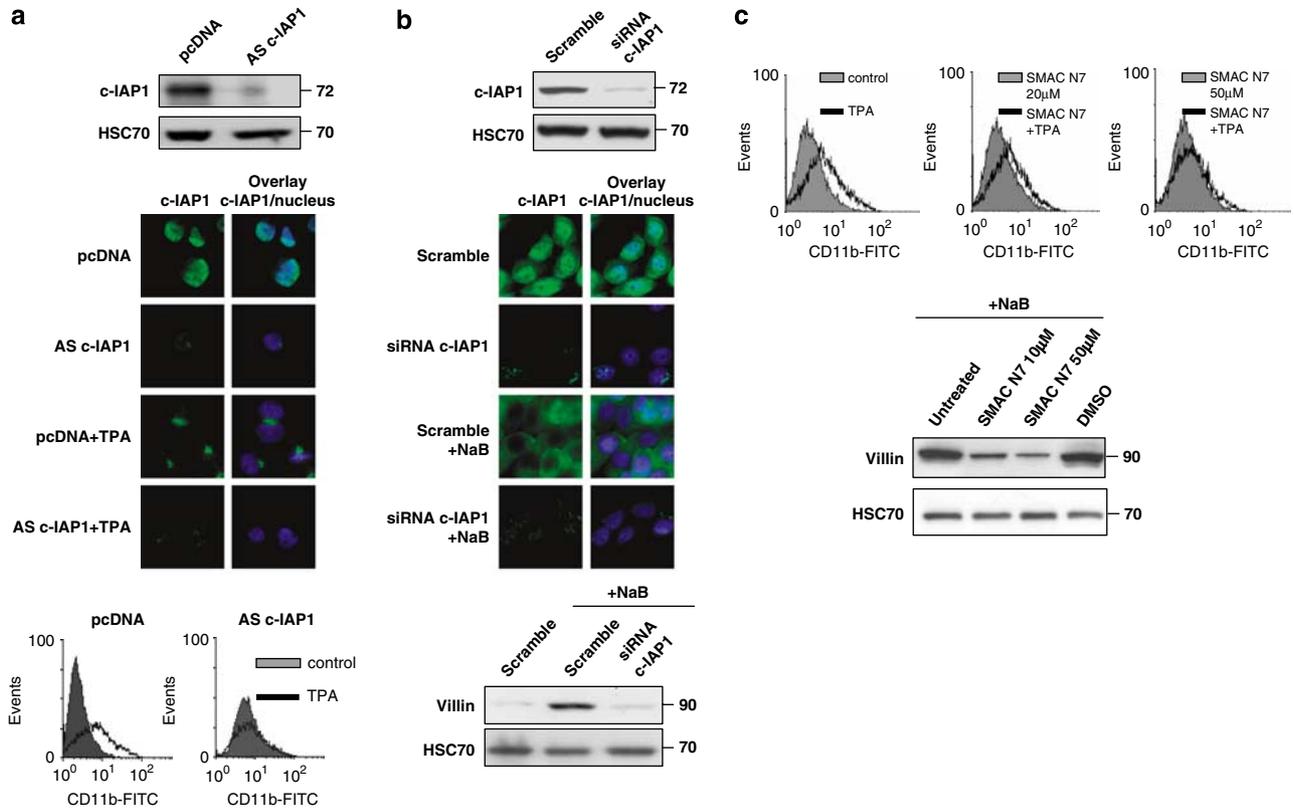
**c-IAP1 depletion inhibits macrophage and epithelial cells' differentiation.** Since we had observed that c-IAP1 was a client protein of HSP90 $\beta$ , that is, that c-IAP1 was degraded by the proteasome machinery in the absence of HSP90 $\beta$ , we tested the effects of c-IAP1 depletion on cell differentiation. Western blots, flow cytometry and microscopy analyses showed that siRNA-mediated depletion of c-IAP1 prevented the differentiation of THP1 cells into macrophages upon TPA exposure, as assessed by the lack of morphological changes and the lack of increase in CD11b expression at the cell surface (Figure 5a). Similarly, depletion of c-IAP1 prevented the differentiation of HT-29 cells exposed to NaB, as indicated by the lack of villin expression (Figure 5b). Accordingly, a commercial inhibitor of IAPs, SMAC N7, was observed to inhibit the TPA-induced differentiation of THP1 cells (Figure 5c) and NaB-induced differentiation of HT-29 cells (Figure 5d), in a dose-dependent manner. Altogether, these results suggest that HSP90 $\beta$  inhibition leads to auto-ubiquitination and degradation of its client protein c-IAP1 whose depletion is sufficient to inhibit cell differentiation.

## Discussion

We and others previously reported that, during cell differentiation, c-IAP1 relocalized from the nucleus to the cytosol in an nuclear export sequences-dependent manner.<sup>18,20</sup> The present work demonstrates that c-IAP1

nuclear exclusion also requires the  $\beta$  isoform of the chaperone HSP90. We identify c-IAP1 as a client protein of HSP90 $\beta$  and demonstrate that the chaperone prevents the auto-ubiquitination and degradation of the IAP protein, which would otherwise block the differentiation process. Whereas deletion experiments in *D. melanogaster* have revealed functions of IAPs in cell differentiation,<sup>11</sup> c-IAP1 deficient mice develop normally. This lack of phenotype was most probably related to markedly elevated levels of c-IAP2 in c-IAP1-deficient mouse cells with redundancies in the functions of the two proteins.<sup>14</sup> Other potential explanations include the use of alternative pathways of differentiation when c-IAP1 is disrupted or the appearance of specific c-IAP1 functions in humans as compared to mice.

Interaction networks emerging from large scale experiments demonstrate that HSP90 plays a central role in multiple pathways and cellular processes.<sup>24</sup> Some reports suggest that the two isoforms of the stress protein, HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ , might have different functions in the cells. HSP90 $\alpha$  has often been described to protect the cells from death in stressful conditions whereas HSP90 $\beta$  has been involved in embryonic development, cell differentiation and cytoarchitecture maintenance.<sup>25</sup> In *D. melanogaster*, homozygous point mutations of the *hsp90* orthologue named *hsp83* is lethal whereas heterozygous mutants are sterile.<sup>26</sup> In *Caenorhabditis elegans*, deletion of *daf-21*, the orthologue of *hsp90*, affects oocyte development<sup>27</sup> and in zebrafish, *Danio rerio*, disruption of *hsp90* orthologue affects somatic muscle



**Figure 5** Depletion of c-IAP1 inhibits macrophage and colon cancer cells differentiation. (a) Upper panel, immunodetection of c-IAP1 in THP1 cells transfected with a pcDNA3 control construction or a c-IAP1 antisense construction (AS). Middle panel, fluorescence microscopy analysis of c-IAP1 (green) in monocytic THP1 cells transfected with a pcDNA3 control construction or a c-IAP1 antisense construct (AS), either untreated or treated with TPA (20 nM, 24 h). Lower panel, flow cytometry analysis of CD11b membrane expression in THP1 control-transfected (pcDNA) or AS-c-IAP1-transfected cells treated with TPA (20 nM, 24 h). HSC70 was used as protein loading control. (b) Upper blot, immunodetection of c-IAP1 in HT-29 cells transfected with a scramble siRNA or a siRNA that targets c-IAP1 (siRNA-clAP1). Middle panel, fluorescence microscopy analysis of c-IAP1 (green) in HT-29 cells transfected with a scramble siRNA or a c-IAP1 targeting siRNA, then left untreated or treated with 3 mM NaB for 3 days. Lower blot, immunodetection of villin in the HT-29 cells. SC70 was used as protein loading control. (c) THP1 and HT-29 cells were pre-treated with the IAP inhibitor SMAC N7 (20 or 50  $\mu$ M) before inducing their differentiation by exposure to TPA and NaB, respectively

development.<sup>28</sup> In mice, *hsp90 $\beta$*  loss-of-function is lethal, due to defects in trophoblast differentiation and placenta development that cannot be rescued by endogenous HSP90 $\alpha$ .<sup>25</sup> Here, we show that while HSP90 $\beta$  depletion blocks cell differentiation, HSP90 $\alpha$  depletion does not seem to affect this physiological process. These results further emphasize the functional divergences between these two HSP90 proteins in humans.

HSP90 is an ubiquitous molecular chaperone that is required for the proper folding of a set of client proteins. Its broad clientele includes structurally and functionally different proteins that include a growing range of protein kinases, a variety of nuclear hormone receptors, cell surface receptors such as ErbB2/neu, transcription factors such as HIF-1 $\alpha$  and many others.<sup>29</sup> The molecular basis for HSP90's specificity for client proteins is largely unknown and close homologue proteins can demonstrate different dependence on HSP90 for their function. When no more chaperoned by HSP90, for example when the conformation of the stress protein changes upon binding and hydrolysis of ATP, the client protein is ubiquitinated by ligases and degraded by the proteasome.<sup>30</sup> Here, we show that c-IAP1 is another client protein of HSP90 $\beta$  that protects c-IAP1 from its previously identified ability for auto-ubiquitination and degradation.<sup>31,32</sup>

HSP90 $\beta$  and c-IAP1 depletion experiments reported in the present study demonstrate that both proteins are required for cell differentiation. Given the number of HSP90 client proteins in the cell, including proteins such as RIP1 and the inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase (IKK $\alpha/\beta$ ) that play a role in cell differentiation,<sup>33</sup> c-IAP1 is probably not the unique mediator of HSP90 pro-differentiating effect. How c-IAP1 redistribution from the nucleus to the cytoplasm contributes to the differentiation process is still a matter of speculation. As an E3 ligase, c-IAP1 could favour the degradation of specific proteins. Caspases have been reported to be ubiquitinated by mammalian IAPs *in vitro* but the role of these enzymes in cell differentiation is limited to specific cell types<sup>33,34</sup> and evidence that IAPs physiologically ubiquitinate caspases and promote their degradation, is still missing.<sup>32</sup> c-IAP1 could also modulate NF- $\kappa$ B transcription factor activity<sup>9</sup> or specific signalling pathways involving adaptor molecules such as TRAF2<sup>7</sup> and serine-threonine kinases such as ASK1.<sup>8</sup>

HSP90 is overexpressed in many cancers and is presumed to be required to sustain aberrant signalling in malignant cells.<sup>19</sup> HSP90 has therefore emerged as an exciting target in cancer therapy and small molecule inhibitors of HSP90 are currently developed for clinical evaluation. Those include the

three inhibitors used in this work, the 17-AAG that has completed phase I clinical trials and is currently tested in phase II trials and the purine-scaffold inhibitors PU-H71 and PU-DZ8, in phase I and advanced preclinical evaluation respectively.<sup>29</sup> Both ansamycins and purines bind to the conserved N-terminal ATP-binding pocket at the surface of the two HSP90 proteins, HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ , which inhibits their ATP-dependent chaperone activity. It is at present unknown whether the effect of HSP90 inhibitors blocking cell differentiation has any repercussion in the treated patients. The effect of HSP90 inhibitors in the cell differentiation process has already been hinted by other authors. Geldanamycin was shown to block myoblast differentiation<sup>35</sup> and to promote apoptosis of human leukaemic and breast cancer cells.<sup>36</sup> The molecule was recently shown also to significantly inhibit dendritic cell functions, thereby affecting the immune response.<sup>37</sup> However, in some circumstances and specific cellular models, HSP90 inhibitors can promote rather than inhibit cell differentiation.<sup>38</sup> This discrepancy could be related to the preferential inhibition of HSP90 $\alpha$  compared to HSP90 $\beta$ , depending on the drug and the cell type.

Altogether, our study identified an essential function of HSP90 $\beta$  isoform in cell differentiation, that is, to chaperone c-IAP1 and thereby protect this E3 ligase from auto-ubiquitination and degradation by the proteasomal machinery. This protective effect is essential as cell differentiation is inhibited as soon as c-IAP1 is degraded or deleted. It remains to be determined which essential function is exerted by c-IAP1 when migrating, together with HSP90 $\beta$ , from the nucleus to the cytoplasm in cells undergoing differentiation.

## Materials and Methods

**Cell culture and differentiation.** THP1 monocytic leukaemia cells, obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany), were cultured at a density up to  $8 \times 10^5$  cells per ml in RPMI 1640 medium supplemented with 9% fetal bovine serum and induced to differentiate into macrophage by exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, 20 nM, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) during 24 h. Cell differentiation was assessed by following morphological changes and the expression of cell surface marker CD11b-FITC by flow cytometry analysis as described.<sup>39</sup> Monocytes from human peripheral blood were obtained with informed consent from healthy donors and purified using an isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) following manufacturer's instructions. Primary monocytes were differentiated into macrophages by treatment with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF exposure, 100 ng/ml, 3 days, R&D Systems, Abington, UK) and differentiation was assessed by analysis of the membrane differentiation marker CD71, as described.<sup>39</sup> The HT-29 cell line, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) containing 4.5 g/l of glucose and supplemented with 9% fetal bovine serum. Medium was changed every day to limit spontaneous differentiation or differentiation was induced by exposure to sodium butyrate (NaB, 3 mM, 3 days, Sigma-Aldrich) and assessed by determining the expression of villin.

**HSP90 and c-IAP inhibitors.** 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) was purchased from BioMol (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) and used at 1  $\mu$ M. PU-H71 and PU-DZ8 were provided by G Chiosis (Sloan-Kettering Cancer Center, NY) and used at 200 and 100 nM, respectively. SMAC-N7 was purchased from Calbiochem (Merck Chemicals, Nottingham, UK) and used at 20 and 50  $\mu$ M during 4 h before differentiation induction of THP1 and HT-29 cells with TPA (20 nM) and NaB (3 mM) respectively.

**Immunoprecipitation.** Cells were lysed in immunoprecipitation buffer (50 mM HEPES, pH 7.6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.1% Nonidet P-40 (NP-40, Sigma-Aldrich)) during 1 h. After centrifugation during 10 min at  $15\,000 \times g$ , the

protein concentration of supernatant was evaluated (DC protein assay, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) and 500  $\mu$ g of protein were incubated with 2  $\mu$ g of the indicated antibody (anti-GFP, anti-ubiquitin and anti-HSP90 $\alpha/\beta$  from TebuBio; anti-c-IAP1 from R&D Systems; anti-HSP90 $\alpha$  and anti-HSP90 $\beta$  kindly donated by D Toft (Rochester, USA)) with constant agitation at 4 °C. Then, the immunocomplexes were precipitated with protein A/G-Sepharose (Amersham, Les Ulis, France). The pellet was used for immunoblotting or MS/MS analysis.

**MS/MS analysis of c-IAP1 immunoprecipitation.** After Coomassie blue staining, the SDS-PAGE (polyacrylamide gel and electrophoresis) is excised in three parts. Proteins were digested in gel by trypsin at 37 °C overnight. Peptides were extracted and analysed by MS/MS as described previously.<sup>40</sup>

**Immunoblot analysis.** Whole cell lysates were prepared by lysing the cells in immunoprecipitation buffer excepted for villin expression analysis for which proteins were extracted with CHAPS 1% (Sigma-Aldrich) diluted into Tris buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4). Cells were kept on ice for 1 h and were vortexed three times. After centrifugation ( $15\,000 \times g$ , 10 min, 4 °C), supernatant was evaluated for protein concentration by a micro-bicinchoninic acid protein assay (Bio-Rad).

Cytoplasmic and nuclear extracts were obtained by lysing cells during 15 min on ice in a lysis buffer (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT) with 0.6% NP-40 in the presence of protease inhibitors (Roche, Neuilly sur Seine, France). Cell lysate was centrifugated at  $1200 \times g$  for 15 min and the supernatant was carefully collected (cytoplasmic fraction). The pellet was washed once and resuspended in lysis buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40, protease inhibitors) and nuclear fractions were harvested after centrifugation ( $15\,000 \times g$ , 10 min). Proteins were separated in SDS-PAGE onto PVDF membranes (Millipore, Molsheim, France). Immunoblot analysis was performed using specific antibodies and enhanced chemoluminescence-based detection (Millipore). The antibodies used were the rabbit polyclonal anti-HSP90 $\beta$  from ABR (Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France), anti-c-IAP1 from R&D Systems, the mouse monoclonal anti-HSC70 and anti-ubiquitin from Santa-Cruz (Tebu-Bio), anti-Villin from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France) and anti-GFP from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). All the monoclonal antibodies used were of the IgG1 isotype.

**Proteasome activity.** Proteasome activity was determined as described previously.<sup>22</sup> Briefly, cells ( $2 \times 10^6$  in 200  $\mu$ l PBS, pH 7.4) were incubated for 30 min at 37 °C with 100  $\mu$ M of the cell-permeant fluorogenic substrate *N*-succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-tyrosine-7-amido-4-methyl coumarin (Bachem, Basel, Switzerland). Fluorescence generated by its cleavage was quantified by using a Kontron SFM 25 spectrofluorometer (Kontron AG, Zurich, Switzerland). When needed, proteasome activity was inhibited by exposure of the cells to Z-leu-leu-leu-H (aldehyde) (MG132, Peptide Institute, Osaka, Japan), at 2  $\mu$ M for 18 h.

**Plasmid constructs.** pECFP-c-IAP1 and pEGFP-c-IAP1 plasmids were constructed by subcloning full length c-IAP1 cDNA (provided by JC Reed, La Jolla, CA, USA) into the *Bgl*II/*Sal*I site of pECFP-C1 and pEGFP-C1 respectively (Clontech, Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France). pEYFP-HSP90 $\beta$  plasmid was constructed using GFP-HSP90 $\beta$  provided by D Picard (Geneve, Switzerland). After PCR amplification (sense 5'-gATAGGTACCATGCCTGAGGAAGTGCAC-3'; antisense: 5'-GGTCGGATCCCTAATCGACTTCTTCCAT-3'), the cDNA encoding HSP90 $\beta$  was cloned into *Kpn*I/*Bam*H1 sites of pEYFP-C1 (Clontech). The cDNA encoding the 1-566 amino acid sequence of c-IAP1 (c-IAP1- $\Delta$ RING) was amplified by PCR from the pcDNA-myc-c-IAP1 (JC Reed, La Jolla, CA, USA) (sense: 5'-GAACAGAACTCATCTCTGAAGAGGATCTG-3'; antisense: 5'-GATCTTTGCAACCTCTCAATTGT-3') and first cloned into pCR-2.1 TOPO plasmid (Invitrogen), then subcloned into the *Eco*R1 site of pEGFP-C2 (Clontech). The c-IAP1 antisense (AS-c-IAP1) construct was obtained by subcloning full length c-IAP1 cDNA in an antisense orientation into the *Eco*R1/*Kpn*I site of pcDNA 3.1 (Invitrogen).

**Small interfering RNA (siRNA) and transfection.** HSP90 $\alpha$  and  $\beta$  siRNA and scramble were purchased from Ambion (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and c-IAP1 siRNA from Eurogentec (Angers, France). HT-29 cells were plated in serum-containing medium one day before transfection. Cells were transfected with siRNAs using oligofectamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and with plasmids using Superfect transfection reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France), following the manufacturer's instructions. Cells were analysed 48 h after transient transfection. THP1 cells were transfected by

AS-c-IAP1 or pcDNA3.1, or cotransfected by pECFP-c-IAP1 and pEYFP-HSP90 $\beta$  using the AMAXA nucleofector kit (Amaxa, Köln, Germany). Transfected cells were selected with geneticin (0.7  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich).

**Immunofluorescence staining.** Cells were fixed in PBS-paraformaldehyde 4% during 15 min and permeabilized by incubation with PBS-Triton 0.1% for 3 min. After washing with PBS, samples were saturated with PBS-BSA 3% during 30 min before incubation overnight at 4 °C with anti-c-IAP1 (BD Biosciences) or anti-HSP90 $\beta$  (ABR). After four washes in PBS-BSA 1%, appropriate secondary antibodies coupled with fluorochromes (Alexa 486 and 568 nm; Molecular Probe, Leiden, Netherlands) were added during 1 h at room temperature in the dark. The nucleus was labelled by Hoechst 33342 incubation during 5 min. Images were acquired using the Cell Observer station (Zeiss, Germany). Briefly, the system is composed by an inverted microscope AxioVert 200M equipped for fluorescence with a CCD camera. All the system is motorized and controlled by the Axiovision software (Zeiss).

**CFP/YFP fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis.** For FRET imaging experiment in living cells, THP1 transfected cells in Petri dish were placed on the stage of the microscope (Cell Observer station, Zeiss). FRET image acquisition and analysis were done by the Axiovision FRET software (Zeiss) using the Youvan's calculation method.

**Acknowledgements.** We thank D Toft and D Picard for HSP90 $\alpha$ - and  $\beta$ -specific antibodies, cDNA and useful discussions. We thank J Vinh (CNRS UMR 7637) for proteomic analysis and A Hammann for excellent technical assistance. We thank D Zatorska and H He for PU-H71 and PU-DZ8. This work was financially supported by 'la Ligue Contre le Cancer' (Nievre Committee), 'l'Association pour la Recherche contre le Cancer', 'l'INSERM' (to CG), the SynCure Cancer Research Foundation, The Experimental Therapeutics Center of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC), H Goodwin, A Goodwin and the Commonwealth Cancer Foundation for Research (to CG). CD received a fellowship from the 'Fondation pour la Recherche Medicale' and 'Fondation de France Leucémie', AJ and SC from 'La Ligue Nationale Contre le Cancer' and DL from 'Ministere de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur'.

- Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 2006; **7**: 988–994.
- Werneburg BG, Zoog SJ, Dang TT, Kehry MR, Crute JJ. Molecular characterization of CD40 signaling intermediates. *J Biol Chem* 2001; **276**: 43334–43342.
- Lens SM, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Biol Biol* 2006; **18**: 616–622.
- Yang YL, Li XM. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 2000; **10**: 169–177.
- Eckelman BP, Salvesen GS. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem* 2006; **281**: 3254–3260.
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM *et al*. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998; **17**: 2215–2223.
- Li X, Yang Y, Ashwell JD. TNF-R1I and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 2002; **416**: 345–347.
- Zhao Y, Conze DB, Hanover JA, Ashwell JD. Tumor necrosis factor receptor 2 signaling induces selective c-IAP1-dependent ASK1 ubiquitination and terminates mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2007; **282**: 7777–7782.
- Tang ED, Wang CY, Xiong Y, Guan KL. A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 2003; **278**: 37297–37305.
- Wang CY, Mayo MW, Komeluk RG, Goeddel DV, Baldwin Jr AS. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; **281**: 1680–1683.
- Kuranaga A, Kanuka H, Tonoki A, Takemoto K, Tomioka T, Kobayashi M *et al*. Drosophila IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. *Cell* 2006; **126**: 583–596.
- Geisbrecht ER, Montell DJ. A role for Drosophila IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell* 2004; **118**: 111–125.
- Leulier F, Lhocine N, Lemaître B, Meier P. The Drosophila inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist Gram-negative bacterial infection. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 7821–7831.
- Conze DB, Albert L, Ferrick DA, Goeddel DV, Yeh WC, Mak T *et al*. Posttranscriptional downregulation of c-IAP2 by the ubiquitin protein ligase c-IAP1 *in vivo*. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 3348–3356.
- Olaiyoye MA, Kaufmann H, Pakusch M, Vaux DL, Lindeman GJ, Visvader JE. XIAP-deficiency leads to delayed lobuloalveolar development in the mammary gland. *Cell Death Differ* 2005; **12**: 87–90.
- Ren J, Shi M, Liu R, Yang QH, Johnson T, Skarnes WC *et al*. The Birc6 (Bruce) gene regulates p53 and the mitochondrial pathway of apoptosis and is essential for mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 565–570.
- Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, Lee J, Nomoto K, Schrantz N *et al*. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 1754–1766.
- Plenchette S, Cathelin S, Rebe C, Launay S, Ladoire S, Sordet O *et al*. Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event. *Blood* 2004; **104**: 2035–2043.
- Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 761–772.
- Vischioni B, Giaccone G, Span SW, Krut FA, Rodriguez JA. Nuclear shuttling and TRAF2-mediated retention in the cytoplasm regulate the subcellular localization of cIAP1 and cIAP2. *Exp Cell Res* 2004; **298**: 535–548.
- Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L *et al*. Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 10519–10526.
- Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A *et al*. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J* 2006; **20**: 1179–1181.
- Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000; **288**: 874–877.
- Zhao R, Houry WA. Molecular interaction network of the Hsp90 chaperone system. *Adv Exp Med Biol* 2007; **594**: 27–36.
- Voss AK, Thomas T, Gruss P. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development* 2000; **127**: 1–11.
- Yue L, Karr TL, Nathan DF, Swift H, Srinivasan S, Lindquist S. Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in Drosophila spermatogenesis. *Genetics* 1999; **151**: 1065–1079.
- Inoue T, Hirata K, Kuwana Y, Fujita M, Miwa J, Roy R *et al*. Cell cycle control by daf-21/Hsp90 at the first meiotic prophase/metaphase boundary during oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ* 2006; **48**: 25–32.
- Krone PH, Evans TG, Blechinger SR. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2003; **14**: 267–274.
- Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Joly AL, De Thonel A, Chiossi G *et al*. Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Curr Med Chem* 2007; **14**: 2839–2847.
- Kunisawa J, Shastri N. Hsp90alpha chaperones large C-terminally extended proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway. *Immunity* 2006; **24**: 523–534.
- Yang QH, Du C. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 16963–16970.
- Vaux DL, Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 287–297.
- Rebe C, Cathelin S, Launay S, Filomenko R, Prevotat L, L'Ollivier C *et al*. Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* 2007; **109**: 1442–1450.
- Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M *et al*. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 2007; **445**: 102–105.
- Yun BG, Matts RL. Differential effects of Hsp90 inhibition on protein kinases regulating signal transduction pathways required for myoblast differentiation. *Exp Cell Res* 2005; **307**: 212–223.
- Nimmanapalli R, O'Bryan E, Bhalla K. Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Res* 2001; **61**: 1799–1804.
- Bae J, Mitsiades C, Tai YT, Berthreau R, Shammam M, Batchu RB *et al*. Phenotypic and functional effects of heat shock protein 90 inhibition on dendritic cell. *J Immunol* 2007; **178**: 7730–7737.
- Yu W, Rao Q, Wang M, Tian Z, Lin D, Liu X *et al*. The Hsp90 inhibitor 17-allylamide-17-demethoxygeldanamycin induces apoptosis and differentiation of Kasumi-1 harboring the Asn822Lys KIT mutation and downregulates KIT protein level. *Leuk Res* 2006; **30**: 575–582.
- Sordet O, Rebe C, Plenchette S, Zermati Y, Hermine O, Vainchenker W *et al*. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 2002; **100**: 4446–4453.
- Pflieger D, Chabane S, Gaillard O, Bernard BA, Ducoroy P, Rossier J *et al*. Comparative proteomic analysis of extracellular matrix proteins secreted by two types of skin fibroblasts. *Proteomics* 2006; **6**: 5868–5879.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

# Discussion – Conclusions

---

HSP90 est une protéine de choc thermique essentielle à la survie des cellules. Son activité de chaperon moléculaire la conduit à jouer un rôle dans de nombreux processus cellulaires. Elle intervient par exemple dans la protection contre la mort par apoptose, dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la transduction de signaux (Didelot *et al.*, 2006).

Dans cette étude, nous démontrons que HSP90 est impliquée dans la différenciation des monocytes en macrophages. Elle migre du noyau vers l'appareil de Golgi et son inhibition empêche la différenciation des cellules. Nos résultats montrent que HSP90 chaperonne c-IAP1 et participe à son export du noyau. HSP90 $\beta$  interagit en effet avec c-IAP1 et l'inhibition de cette protéine chaperon bloque sa sortie.

c-IAP1 est située dans le noyau dans les monocytes et migre vers le cytoplasme dans les macrophages. Lorsqu'elle est exprimée dans le noyau, c-IAP1 participe à la régulation du cycle cellulaire (Samuel *et al.*, 2005). Dans les cellules HeLa, un signal apoptotique (un traitement par la cytokine TRAIL, par la staurosporine ou après exposition aux rayons UV) induit également la relocalisation de c-IAP1 vers le cytoplasme *via* un mécanisme dépendant des caspases (Samuel *et al.*, 2005). Les caspases étant également activées lors de la différenciation macrophagique, on peut supposer qu'il existe un mécanisme commun entre la sortie de c-IAP1 observée lors de la différenciation cellulaire et lors de l'apoptose. Les caspases une fois activées clivent de nombreuses protéines substrats et notamment des protéines nucléaires. L'absence de c-IAP1 dans le noyau suite à sa relocalisation dans la mitochondrie pourrait favoriser l'activité nucléaire des caspases, c-IAP1 ne pouvant plus interférer avec elles. Une fois localisée dans le cytoplasme, c-IAP1 participe entre autre à la dégradation de la protéine adaptatrice TRAF2 par le protéasome nécessaire à la progression de la différenciation macrophagique (Dupoux *et al.*, 2009).

c-IAP1 est une protéine essentielle à la différenciation des monocytes. Son inhibition par le SMAC-N7 bloque en effet la différenciation cellulaire. Bien que le SMAC-N7 ne soit pas un inhibiteur spécifique de c-IAP1 (il inhibe également les protéines XIAP et c-IAP2), le fait que la diminution de son expression par ARN interférence bloque également la

différenciation macrophagique souligne l'importance de c-IAP1 dans ce processus de différenciation.

HSP90 est également essentielle à la différenciation macrophagique car son inhibition ou la diminution de son expression bloquent la différenciation cellulaire. Nous montrons dans ce travail que c-IAP1 est une protéine cliente de HSP90. L'inhibition de HSP90 par différentes molécules induit en effet la dégradation par le protéasome de c-IAP1 et la déplétion par ARN interférence de HSP90 $\beta$  entraîne également une diminution de l'expression de c-IAP1.

Le rôle de HSP90 dans la différenciation macrophagique n'est bien sûr pas restreint au chaperonnage de c-IAP1. HSP90 est impliquée dans la stabilisation et l'activation d'un grand nombre de protéines. HSP90 participe par exemple à l'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B (en stabilisant RIP1 ou IKK) ou de Akt qui sont toutes deux impliquées dans le processus de différenciation cellulaire (Lanneau *et al.*, 2008). L'inhibition de HSP90 perturberait donc ces voies de signalisation et pourrait expliquer le blocage de la différenciation des monocytes en macrophages observé après traitements par les différents inhibiteurs.

Un dérèglement de l'expression de HSP90 participe au processus de cancérisation. En effet, dans les cellules cancéreuses, HSP90 est particulièrement active et stabilise de nombreuses protéines oncogéniques telles que Src ou Akt. Certains phénomènes de résistance des cellules cancéreuses, problème majeur des traitements anti-cancéreux actuels, pourraient être évités du fait des multiples cibles potentielles des inhibiteurs de HSP90. C'est pourquoi HSP90 est devenue une cible intéressante pour le développement de nouveaux agents anti-cancéreux. Les molécules dérivées de l'antibiotique geldanamycine ainsi que les purines synthétiques que nous avons utilisées se lient au niveau du site de fixation de l'ATP de HSP90 $\alpha$  et HSP90 $\beta$  et inhibent leur l'activité chaperon. Bien qu'il n'y ait pas encore d'études concernant l'effet de l'inhibition de HSP90 sur les patients traités avec ces inhibiteurs, certaines données montrent que ces molécules bloquent plusieurs processus cellulaires tels que la différenciation des myoblastes (Yun and Matts, 2005) et la maturation des cellules dendritiques, perturbant ainsi leur fonction et la réponse immunitaire (Bae *et al.*, 2007). Nous démontrons dans cette étude que l'inhibition de HSP90 par le 17-AAG altère

la différenciation des monocytes en macrophages. Ces expériences étant menées *in vitro*, Il serait intéressant de vérifier, dans le contexte des essais cliniques actuellement menés, si un traitement par le 17-AAG affecte la différenciation ou la fonction des monocytes et des macrophages en raison de la susceptibilité aux infections que provoquerait un tel effet secondaire.

L'inhibition de HSP90 favorise cependant dans certains cas la différenciation cellulaire comme par exemple la différenciation cellules Kasumi-1 possédant une mutation du gène codant la protéine KIT ou celle des cellules HL-60 possédant la protéine chimère Bcr-Abl (Nimmanapalli *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2006). Les conséquences de l'inhibition de HSP90 dépendraient donc du type cellulaire ciblé, de la concentration en inhibiteur utilisée ou du niveau de HSP90 (notamment le niveau d'expression des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ ) dans la cellule.

Le terme HSP90 regroupe en réalité deux isoformes appelées HSP90 $\alpha$  et HSP90 $\beta$ . Leurs séquences peptidiques étant très proches, de nombreuses études ne différencient pas ces deux protéines et les différents inhibiteurs de HSP90 disponibles bloquent indistinctement les deux isoformes. Ces deux protéines semblent cependant avoir des fonctions différentes lors du développement des organismes ou il a été montré que l'inactivation de l'isoforme  $\beta$  chez la souris était létale malgré un niveau normal de HSP90 $\alpha$ . Nous montrons dans ce travail que HSP90 $\beta$  interagit avec c-IAP1 et que la diminution de son expression bloque la différenciation macrophagique. Au contraire, HSP90 $\alpha$  n'interagit que faiblement avec c-IAP1 et sa déplétion n'a pas d'effet sur la différenciation. Nos résultats soulignent donc la différence de fonction entre ces deux isoformes lors de la différenciation cellulaire et l'importance de l'isoforme  $\beta$  dans ce phénomène.

# Perspectives

---

Les perspectives de ce travail s'articulent autour de trois axes principaux :

- **Comprendre les mécanismes de relocalisation de HSP90.** Nous avons montré que HSP90 $\beta$  sortait du noyau au cours de la différenciation cellulaire. Cependant les mécanismes permettant l'export de HSP90 $\beta$  sont encore inconnus. Nous pensons que les modifications post-traductionnelles de HSP90 $\beta$ , notamment son acétylation, sa phosphorylation, sa nitrosylation ou sa sumoylation, jouent un rôle sur sa localisation cellulaire. Nous étudions ces modifications post-traductionnelles par électrophorèse bidimensionnelle afin de séparer les différentes formes de HSP90 puis nous les révélons par immuno-empreinte. Nous pourrions modifier par mutagenèse dirigée les sites responsables de ces modifications afin de déterminer leur impact sur l'interaction avec c-IAP1 et sur le rôle de HSP90 dans la différenciation cellulaire. Il serait également très intéressant de déterminer s'il existe un lien entre l'activation de la cascade de signalisation provoquée par la liaison du M-CSF sur son récepteur et les modifications post traductionnelles de HSP90 $\beta$  qui peuvent apparaître ou disparaître au cours de la différenciation.

- **Evaluer les effets de l'inhibition de HSP90 in vivo dans des modèles murins.** Après traitements des animaux par les différents inhibiteurs que nous possédons (17-AAG, 17-DMAG : 17-Diméthylamino-éthylamino-17-déméthoxygeldanamycine, PU-H71, PU-DZ8), nous déterminerons si ces animaux possèdent des anomalies au niveau du nombre de cellules immunitaires (notamment des macrophages) et si la réponse immunitaire elle-même est affectée.

- **Déterminer l'implication de HSP90 dans un contexte de différenciation pathologique.** L'équipe du professeur Eric Solary à Dijon s'intéresse à la physiopathologie des leucémies myélomonocytaires chroniques, une affection entre syndrome myélodysplasiques et myéloprolifératif caractérisée par une accumulation de monocytes dans le sang, la moelle et la rate. Un réseau a été constitué en France autour de partenaire pour collecter des

échantillons de moelle de patients. Nous différencierons *ex vivo* des monocytes du sang périphérique de patientes avec leucémie aiguë et de patients atteints de leucémie myélo-monocytaire chronique et nous déterminerons si, dans ces deux pathologies myéloïdes malignes, il existe des anomalies de l'expression et ou de la fonction de la protéine de stress HSP90 par microscopie et fractionnement cellulaire. Nous regarderons également les effets des traitements par les inhibiteurs de HSP90 sur ces cellules leucémiques.

## Résultats : deuxième partie

*HSF1 contrôle l'expression du facteur de transcription Spi-1/Pu.1 au cours de la différenciation macrophagique*

La deuxième partie de mon travail de thèse a constitué à étudier le rôle de la protéine de choc thermique HSP70 lors de la différenciation des monocytes en macrophages ainsi que l'implication du facteur de transcription HSF1 dans ce phénomène.

Lors de la première partie de ce travail de thèse, j'ai étudié l'expression des différentes HSPs au cours de la différenciation macrophagique. J'ai remarqué que l'expression de HSP70 augmentait fortement au cours de la différenciation cellulaire. J'ai également observé que l'expression du facteur de transcription clé de la différenciation macrophagique, la protéine Spi-1/Pu.1, augmentait au cours de la différenciation et ce de manière similaire à celle de HSP70. J'ai donc dans un premier temps étudié le rôle de la protéine HSP70 dans la différenciation des monocytes en macrophages en déterminant notamment s'il existe une relation entre HSP70 et Spi-1/Pu.1. Je me suis intéressé dans un second temps aux mécanismes de l'induction de ces deux protéines lors de la différenciation des monocytes en macrophages. Le principal facteur de transcription contrôlant l'expression des protéines de choc thermique étant HSF1, j'ai déterminé si ce facteur est activé lors de la différenciation macrophagique. Nos résultats montrent que HSF1 est impliqué dans le contrôle de l'expression de Spi-1/Pu.1 lors de la différenciation des monocytes en macrophages.

Le travail présenté ici est encore en cours de réalisation. Il manque en effet plusieurs résultats supplémentaires (indiqués en tant résultats non montrés, data not shown) avant d'être complet et de pouvoir être soumis.

## **HSF1 controls Spi-1/Pu.1 expression during macrophagic differentiation**

Lanneau David<sup>1,2</sup>, Jego Gaetan<sup>1,2</sup>, Wettstein Guillaume<sup>1,2</sup>, Jacquelin Arnaud<sup>3</sup>, Hammann Arlette<sup>1</sup>  
Bonniaud Philippe<sup>1,4</sup>, Solary Eric<sup>5</sup>, Garrido Carmen<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> INSERM U866, <sup>2</sup> Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21000, France. <sup>3</sup> INSERM U 526, Nice, 06107. <sup>4</sup> CHU Dijon BP1542, Dijon, France. <sup>5</sup> Institut Gustave Roussy, Villejuif, 94800

\*Correspondence should be addressed to Carmen Garrido, INSERM U866, Faculty of Medicine and Pharmacy, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France.

Tel: 33 3 80 39 32 84. Fax: 33 3 80 39 34 34. E-mail: [cgarrido@u-bourgogne.fr](mailto:cgarrido@u-bourgogne.fr)

**Keywords: Macrophages, differentiation, Spi1, HSF1, HSP, stress response**

## **Abstract**

We previously showed that heat shock protein HSP70 played a determinant role in erythroblasts' differentiation. Here, we studied HSP70 involvement in macrophagic differentiation. We used two models of differentiation: human peripheral monocytes exposed to M-CSF and THP1 cells induced to differentiate by TPA. We found that in both models, HSP70 expression was induced during differentiation. Interestingly, the expression of Spi-1/Pu.1, a transcription factor essential for monocytes to differentiate, was similarly induced. Upon differentiation, both proteins co-localized in the nucleus and associated. Inhibition or down regulation of HSP70 induced Spi-1/Pu.1 degradation and blocks the differentiation process, indicating that the necessity of Spi-1/Pu.1 to be chaperoned by HSP70 during differentiation. Since Spi-1/Pu.1 promoter has a HSE-like, we have studied whether transcription factors responsible for HSPs induction, HSF, could be involved. We show that although HSF2 do not seem involved, HSF1 binds to Spi-1/Pu.1 promoter and its inhibition blocks Spi-1/Pu.1 expression and monocytes differentiation. Understanding monocyte differentiation regulation is important since defects of the differentiation process can lead to the development of leukemias (acute myeloid leukemia, chronic myelomonocytic leukemia). A better understanding of the roles of HSPs may provide new therapeutic strategies for the treatment of these pathologies.

## **Introduction**

Exposure to a wide variety of physical and chemical stresses activates the expression of stress response genes coding for the Heat shock proteins (HSPs). HSPs are molecular chaperones that help the cell to cope with these stressful conditions by mediating correct refolding of denatured proteins. Beside their well described role in cell protection under stressful conditions, HSPs play essential roles in a variety of cellular processes such as cell cycle and apoptosis. HSPs have also demonstrated essential functions for cell differentiation. They are involved, for instance, in erythroblast (De Thonel *et al.*, 2010; Ribeil *et al.*, 2007) and macrophage differentiation (Didelot *et al.*, 2008), and their level of expression is tightly regulated during development.

Expression of HSP genes is regulated by the family of the heat shock transcription factors (HSFs), which bind to the heat shock element (HSE) in the promoter region of heat shock genes and stimulate their transcription. Three members have been identified in mammals: HSF1, HSF2 and HSF4. HSF1 is the major stress-responsive family member while HSF2 has been related to differentiation (Akerfelt *et al.*, 2007). In response to stressful stimuli such as elevated temperatures, oxidants and bacterial or viral infections, HSF1 is activated by trimerization and hyperphosphorylation (Holmberg *et al.*, 2002; Pirkkala *et al.*, 2001). As a result, HSF1 acquires the ability to bind to HSE and to activate transcription of heat shock genes, which results in accumulation of HSPs such as HSP70 with, as a final outcome, cell protection. However, HSF1 not only regulates expression of heat shock genes in response to stress but it is also involved in development by regulating non heat shock genes.

The transcription factor Spi-1/Pu.1 is a member of the Ets family expressed during hematopoiesis in myeloid and B lymphoid cells. It plays an essential role in the acquisition of the macrophage phenotype by regulating the expression of many myeloid genes such as the M-CSF receptor, the macrophage scavenger receptor, CD11b or Il- $\beta$ . The level of Spi-1/Pu.1 is critical for specifying cell fate and its dysregulation can lead to the development of leukemias and lymphomas (Rosenbauer *et al.*, 2004; Tatetsu *et al.*, 2007). Previous reports demonstrated that the proximal promoter of human *Spi-1/Pu.1* gene and an upstream regulatory element (URE), located -17 kb upstream of the transcription start site, are essential for *Spi-1/Pu.1* gene regulation (Bonadies *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 1995).

Here we show that both HSP70 and Spi-1/Pu.1 are induced during macrophagic differentiation of human monocytes from peripheral blood and THP1 monocytic cells. HSP70 interacts with Spi-1/Pu.1 and its inhibition with the HSP70 specific inhibitor PES (Leu *et al.*, 2009) blocks the differentiation process. Moreover, we show that HSF1 binds to Spi-1/Pu.1 promoter on a HSE-like sequence, located 730 pb upstream of the transcription start site, and controls Spi-1/Pu.1 expression. All these data demonstrate that HSF1 is involved in macrophagic differentiation, upstream Spi-1/Pu.1.

## Materials and methods

**Cell culture and differentiation.** THP1 monocytic leukaemia cells, obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany), were cultured at a density up to  $8 \cdot 10^5$  cells per ml in RPMI 1640 medium supplemented with 9% fetal bovine serum and induced to differentiate into macrophage by exposure to 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, 20 nM, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) during 24 h. Cell differentiation was assessed by following morphological changes and the expression of cell surface marker CD11b by flow cytometry analysis as described (Sordet *et al.*, 2002). Monocytes from human peripheral blood were obtained with informed consent from healthy donors and purified using an isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) following manufacturer's instructions. Primary monocytes were differentiated into macrophages by treatment with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF exposure, 100 ng/ml, 3 days, R&D Systems, Abington, UK) and differentiation was assessed by analysis of the membrane differentiation marker CD71, as described (Sordet *et al.*, 2002). PES (pifithrin- $\mu$ ), quercetin and triptolide were purchased from Sigma-Aldrich.

**Cell transfection and plasmids used.** HeLa cells were plated in serum-containing medium one day before transfection. Cells were transfected with plasmids using JetPEI™ transfection reagent (Polyplus Transfection, Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France) following the manufacturer's instructions. Cells were analysed 48 h after transient transfection. HSP70 full length and HSP70 mutants lacking ATP binding domain or peptide binding domain plasmids were obtained after cloning in a HA-tagged vector. Spi-1/Pu.1 Myc tagged vector was a kindly gift from Françoise Moreau-Gachelin (Institut Curie, Paris, France).

**Immunoblot analysis.** Whole cell lysates were prepared by lysing cells in Lysis buffer (150mM NaCl, 1% Triton X-100, 50mM Tris HCl pH 8.0). Cells were kept on ice for 30 min and were vortexed three times. After centrifugation (15 000 g, 10 min, 40°C), supernatant was evaluated for protein concentration by a micro-bicinchoninic acid protein assay (Bio-Rad).

Cytoplasmic and nuclear extracts were obtained by lysing cells during 15 min on ice in a lysis buffer (10mM Hepes, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM DTT) with 0.6% NP-40 in the presence of protease inhibitors (Roche, Neuilly sur Seine, France). Cell lysate was

centrifuged at 1200 g for 15 min and the supernatant was carefully collected (cytoplasmic fraction). The pellet was washed once and resuspended in lysis buffer (50mM Hepes, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% NP-40, protease inhibitors) and nuclear fractions were harvested after centrifugation (15 000 g, 10 min). Proteins were separated in SDS-PAGE onto PVDF membranes (Millipore, Molsheim, France). Immunoblot analysis was performed using specific antibodies and enhanced chemoluminescence-based detection (Millipore). The antibodies used were the mouse monoclonal anti-HSP70 from StressGen (TebuBio Le Perray en Yvelines, France), mouse monoclonal anti-HSC70, goat polyclonal anti-Lamin B and the rabbit polyclonal HSF1 from Santa Cruz (TebuBio), rabbit polyclonal anti-Spi-1/Pu.1 and anti-Myc from Cell Signaling (Ozyme) and anti-HA from Covance ImmunoTechnologies, (Eurogentec, Liège Science Park, Belgium).

Monoclonal antibodies used were of the IgG1 isotype.

**Immunoprecipitation.** Cells were lysed in immunoprecipitation buffer (50mM HEPES, pH 7.6, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40 (NP-40, Sigma-Aldrich)) during 30 min. After centrifugation (10 min 15 000g), the protein concentration of supernatant was evaluated (DC protein assay, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) and 800 µg of protein were incubated with 3 µg of the indicated antibody (anti-HSP70, anti-HA) with constant agitation at 4°C. Then, the immunocomplexes were precipitated with protein A/G-Sepharose (Amersham, Les Ullis, France).

**Immunofluorescence staining.** Cells were fixed in PBS-paraformaldehyde 4% during 15 min and permeabilized by incubation with PBS-Triton 0.1% for 3 min. After washing with PBS, samples were saturated with PBS-BSA 3% during 30 min before incubation overnight at 4°C with anti-HSP70 (Tebu-Bio), anti-Spi-1/Pu.1 (Ozyme), anti-HSF1 and anti-HSF2 (Tebu-Bio). After four washes in PBS-BSA 1%, appropriate secondary antibodies coupled with fluorochromes (Alexa 486 and 568 nm; Molecular Probe, Leiden, Netherlands) were added during 45 min at room temperature in the dark. The nucleus was labeled by Hoechst 33342 incubation during 5 min. Images were acquired using the Cell Observer station (Zeiss, Germany). Briefly, the system is composed by an inverted microscope AxioVert 200M

equipped for fluorescence with a CCD camera. All the system is motorized and controlled by the Axiovision software (Zeiss). Colocalization

**Chromatinimmunoprecipitation (chIP).** chip experiments were performed by using Milipore EZ-ChIP™ Chromatin Immunoprecipitation Kit according manufacturer's instructions. Briefly cells ( $20 \cdot 10^7$ ) were first fixed by 37% formaldehyde. Glycine was added to quench unreacted formaldehyde and cells were lysed in SDS Lysis Buffer after 2 PBS washes. Samples were sonicated (7 pulses of 15 seconds) and immunoprecipitation of crosslinked protein/DNA was performed with an anti-HSF1 or an anti-IgG1 antibody (TebuBio). The complexes were washed 4 times. After reverse crosslinking, the DNA was purified using Nucleospin Extract II kit (Macherey Nagel, Hoerd, France). PCR was performed using AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Primers used: 5'- CTGAGAAACCTGGGCTGGAAAC-3' and 5'- GATCTAGCAGGCTATCAGG-3'.

## Results

- 1) HSP70 and Spi-1/Pu.1 are both induced during macrophagic differentiation and colocalize in the nucleus.

In order to study whether HSP70 plays a role in macrophage differentiation, we analyzed the expression of HSP70 and compare it with that of Spi-1/Pu.1, a transcription factor essential for macrophages formation (Henkel *et al.*, 1996). Two models of macrophagic differentiation were used, M-CSF induced differentiation of primary monocytes from peripheral blood (Figure 1a) and TPA induced differentiation of THP1 cells (Figure 1b). In these two differentiation models, the expression of both HSP70 and Spi-1/Pu.1 increased 24 hours after the beginning of the differentiation and lasted several days. The localization of these two proteins was studied by immunofluorescence in primary monocytes (Figure 1c). Spi-1/Pu.1 localized in the nucleus 24 hours after the beginning of the differentiation. HSP70,

although present in the whole cell, it also accumulated in the nucleus. We conclude that these two proteins colocalize in the nucleus during differentiation (Figure 1d).

## 2) HSP70 and Spi-1/Pu.1 interact during differentiation.

Since both HSP70 and Spi-1/Pu.1 are induced at the same time and colocalize in the nucleus of the differentiating monocytes, we studied whether they could associate. We first immunoprecipitated endogenous HSP70 and immunoblotted with a Spi-1/Pu.1 in THP1 cells left untreated or treated 24 hours with TPA (Figure 2a). An interaction between HSP70 and Spi-1/Pu.1 was detected in TPA treated cells. HSP70 contains two functional domains, the ATP binding domain and the peptide binding domain. HeLA cells were co-transfected with a vector coding Spi-1/Pu.1 tagged with Myc and with a HSP70 full length plasmid or a HSP70 lacking the ATP binding domain (HSP70 $\Delta$ ABD) or the peptide binding domain (HSP70 $\Delta$ PDB) plasmid fused with a HA tag. Immunoprecipitation experiments on cell lysates with an anti-HA antibody demonstrated that while Spi-1/Pu.1 binds to HSP70 full length or to HSP70 $\Delta$ ADB, no interaction was found between Spi-1/Pu.1 and HSP70 $\Delta$ PDB (Figure 2b). Therefore, Spi-1/Pu.1 interacts with HSP70 and the peptide binding domain of HSP70 is involved in the association.

## 3) HSP70 is essential for macrophagic differentiation

In order to determine if HSP70 was required for macrophagic differentiation, we first used a recently described HSP70 specific inhibitor, PES (Leu *et al.*, 2009). Exposure of peripheral blood monocytes to PES prevented M-CSF-induced differentiation, as assessed by the lack of cell adhesion to the culture flask (not shown) and the lack of appearance of the differentiation marker CD71 (Figure 3a). Similarly, this HSP70 inhibitor prevented TPA-induced differentiation of THP1 cells as indicated by the lack of CD11b expression increase at the cell surface (Figure 3b). Thus, HSP70 inhibition by PES leads to macrophagic differentiation blockage. Down regulation of HSP70 by means of a siRNA allowed us to confirm that HSP70 activity is required in this differentiation process (not shown). Inhibition of HSP70 also induces Spi-1/Pu.1 degradation (figure 3c).

#### 4) HSF1 but not HSF2 localizes in the nucleus during macrophagic

We then checked by immunofluorescence and cell fractionation studies the expression and the localization of the main transcription factors responsible for the induction of HSPs, HSF1 and HSF2, during the differentiation of both primary monocytes (Figure 4a, 4c) or THP1 cells (Figure 4b, 4d). Although HSF2 is more related to differentiation processes than HSF1, we did not detect this transcription factor in the nucleus. Thus, HSF2 do not seem to be involved in macrophagic differentiation. HSF1 was expressed in undifferentiated peripheral monocytes but only translocates into the nucleus 6 to 24 hours after M-CSF exposure; At 48, HSF1 content in the nucleus decreased (Figures 4a and 4c). This transitory expression of HSF1 in the nucleus during differentiation was also found in THP1 cells. HSF1 accumulated in the nucleus from 6 to 16 hours after TPA exposure and, by 24 hours, HSF1 nuclear content strongly decreased (Figure 4b and 4d). We can conclude that HSF1 is transitory activated during macrophagic differentiation. Studies of HSF1 trimerization confirmed the activation of HSF1 during monocytic differentiation (not shown).

#### 5) HSF1 binds to Spi-1/Pu.1 promoter on a HSE-like sequence

Analysis of the Spi-1/Pu.1 gene (*spfi1*) promoter allowed us to find a HSE-like sequence (5'-GAACAGATTCAGAGGGAA-3') located 730 pb upstream of the initiation site (Figure 5a). Chromatin immunoprecipitation (chIP) experiments using an anti-HSF1 antibody and primers surrounding this HSE shown that HSF1 can bind to *spfi1* promoter in the region of this HSE (Figure 6b). EMSA experiments with this particular *spfi1*/HSE or with a mutated form will further validate HSF1 binding to *spfi1*.

#### 6) HSF1 inhibition prevents Spi-1/Pu.1 expression

To determine the role of HSF1 on Spi-1/Pu.1 expression, we used two inhibitors of HSF1, quercetin and triptolide (Hansen *et al.*, 1997; Westerheide *et al.*, 2006). We first checked if these molecules can efficiently inhibit HSF1 by analyzing their ability to prevent the induction of HSP70 during heat shock in THP1 cells (Figure 6a). As expected, heat shock induced the expression of HSP70 and treatment with quercetin (10  $\mu$ M) or triptolide (10 nM) prevents this HSP70 induction, indicating the inhibition of the heat shock response. Then, we

determined the effect of these inhibitors on Spi-1/Pu.1 expression. Triptolide treatment inhibited the induction of Spi-1/Pu.1 in primary monocytes treated 48 hours with M-CSF (figure 6b). Similarly, in THP1 cells, quercetin and triptolide inhibited the increase in Spi-1/Pu.1 expression induced by 24 hours exposure to TPA (Figure 6c). An increase in the proteasomal degradation of the protein did not participate in the overall decrease in Spi-1/Pu.1 expression observed since proteasome inhibitors did not restore the level of Spi-1/Pu.1 (Figure 6c). Thus, HSF1 inhibition prevents the expression of Spi-1/Pu.1 gene during macrophagic differentiation.

#### 7) HSF1 inhibition blocks macrophagic differentiation

Treatment of peripheral blood monocytes with HSF1 inhibitors (quercetin or triptolide) prevented both M-CSF-induced differentiation, as assessed by the lack of expression of the differentiation marker CD71 (Figure 7a), and TPA-induced differentiation of THP1 cells as indicated by the lack of CD11b expression at the cell surface (Figure 7b). So HSF1 inhibition leads to macrophagic differentiation blockage. HSF1 down regulation with a shRNA confirms the need of HSF1 in this monocytic differentiation process (not shown).

**Acknowledgements.** We thank F Moreau-Gachelin for Spi-1/Pu.1 vector, A Bouchot for excellent technical assistance. This work was financially supported by ‘la Ligue Contre le Cancer’ (Nievre Committee), ‘l’Association pour la Recherche contre le Cancer’, l’INSERM (to CG), DL from ‘Ministere de la Recherche et de l’Enseignement Superieur’ and ‘l’Association pour la Recherche contre le Cancer’, AJ from ‘La Ligue Nationale Contre le Cancer’ and GW from ‘The EU 7th framework program « European IPF Network » ‘.

#### Figure Legends.

**Figure 1. HSP70 and Spi-1/Pu.1 are both induced during macrophagic differentiation and colocalize in the nucleus. a.** Immunodetection of HSP70 and Spi-1/Pu.1 during M-CSF induced differentiation (100 ng/mL) of monocytes from peripheral blood. HSC70 was used as loading control. **b.** Immunodetection of HSP70 and Spi-1/Pu.1 during TPA induced

differentiation (20 nM) of THP1 cells. **c.** Fluorescence microscopy analysis of HSP70 and Spi-1/Pu.1 in M-CSF induced differentiation of human peripheral monocytes. Nuclei, labeled with Hoescht 33342, are stained in blue. **d.** Fluorescence microscopy analysis of HSP70 and Spi-1/Pu.1 in peripheral monocytes treated 48 hours with M-CSF.

**Figure 2. HSP70 interacts with Spi-1/Pu.1.** **a.** Immunodetection of Spi-1/Pu.1 and HSP70 after immunoprecipitation with HSP70 (IP HSP70) or a non-relevant (IP IgG) antibody in THP1 cells left untreated (D0) or treated for 24 hours with TPA (D1). Lower blot, inputs. **b.** Hela cells were co-transfected with a plasmid coding Spi-1/Pu.1 fused with a Myc Tag and a plasmid coding HSP70 full length or deleted for the ATP binding domain, HSP70 $\Delta$ ADB, or for the peptide binding domain, HSP70 $\Delta$ PBD, fused to a HA tag. Immunodetection of Spi-1/Pu.1 (Myc) and HSP70 (HA) followed after immunoprecipitation with an anti-HA antibody or with a non-relevant (IP IgG). HSC70 was used as a loading control.

**Figure 3. HSP70 inhibition prevents macrophagic differentiation.** **a.** Flow cytometry analysis of CD71 expression, phycoerythrin (PE)-coupled anti-CD71, on monocytes from peripheral blood left untreated or treated with PES (5  $\mu$ M or 2  $\mu$ M) and then exposed to M-CSF for two days. **b.** Flow cytometry analysis of CD11b expression, phycoerythrin (PE)-coupled anti-CD11b, on THP1 cells pre-treated or not with PES (10  $\mu$ M or 5  $\mu$ M) and then exposed to TPA for 24 hours. In grey: staining with a non-relevant antibody (IgG1). **c.** Immunodetection of Spi-1/Pu.1 in THP1 left untreated (NT) or treated with 10 or 20  $\mu$ M of PES. HSC70: loading control.

**Figure 4. HSF1 transitory localizes in the nucleus during macrophagic differentiation.** **a.** Fluorescence microscopy analysis of HSF2 and HSF1 during M-CSF induced differentiation of monocytes from peripheral blood. Nuclei, labeled with Hoescht 33342, are stained in blue. **b.** Fluorescence microscopy analysis of HSF2 and HSF1 during TPA induced differentiation of THP1 cells. **c.** Immunodetection of HSF1 during M-CSF induced differentiation of monocytes from peripheral blood. **d.** Western blot analysis of HSF1 and Spi-1/Pu.1 in nuclear extracts from THP1 cells, either left untreated or treated with 20 nM TPA for 6, 16, 24 and 48 hours. HSC70, loading control.

**Figure 5. HSF1 binds to Spi-1/Pu.1 promoter.** **a.** Spi-1/Pu.1 promoter sequence. In blue : potential HSE. **b.** PCR detection of a DNA fragment containing the potential HSE after immunoprecipitation with an anti-HSF1 antibody (IP HSF1) or a non-relevant antibody (IP IgG) in THP1 cells treated with TPA for 6 hours or 16 hours.

**Figure 6. HSF1 inhibition blocks Spi-1/Pu.1 expression.** **a.** Western blot analysis of HSP70 in THP1 cells after a heat shock (45 min, 42°C) with or without quercetin (10 µM) or triptolide (10 nM). **b.** Immunodetection of Spi-1/Pu.1 in monocytes from peripheral blood treated during 1 or 2 days with M-CSF with or without triptolide (10 nM). **c.** Western blot analysis of Spi-1/Pu.1 in THP1 cells treated 24 hours with TPA with or without triptolide (10 nM), quercetin (10 µM) and MG132 (25 µM, 4 hours before cell lysis). HSC70 was used as a loading control.

**Figure 7. HSF1 inhibition impairs macrophagic differentiation.** **a.** Flow cytometry analysis of CD71 expression (phycoerythrin (PE)-coupled anti-CD71) on monocytes from peripheral blood either left untreated or treated with triptolide (left, 10 nM) or with quercetin (right, 10 µM) and then exposed to M-CSF for two days. In grey: non relevant (IgG1) staining. **b.** Flow cytometry analysis of CD11b expression (phycoerythrin (PE)-coupled anti-CD11b) on THP1 cells treated with triptolide (left, 10 nM) or with quercetin (right, 10 µM) and then exposed to TPA for 24 hours. In grey: staining with a non-relevant antibody (IgG1).

## References

Akerfelt, M., Trouillet, D., Mezger, V., and Sistonen, L. (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1113**, 15-27.

Bonadies, N., Neururer, C., Steege, A., Vallabhapurapu, S., Pabst, T., and Mueller, B.U. (2009). PU.1 is regulated by NF-kappaB through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene* **29**, 1062-1072.

Chen, H., Ray-Gallet, D., Zhang, P., Hetherington, C.J., Gonzalez, D.A., Zhang, D.E., Moreau-Gachelin, F., and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* **11**, 1549-1560.

De Thonel, A., Vandekerckhove, J., Lanneau, D., Selvakumar, S., Courtois, G., Hazoume, A., Brunet, M., Maurel, S., Hammann, A., Ribeil, J.A., Zermati, Y., Gabet, A.S., Boyes, J., Solary, E., Hermine,

O., and Garrido, C. (2010). HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood In press*.

Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Bouchot, A., Cartier, J., Jacquel, A., Ducoroy, P., Cathelin, S., Decolgne, N., Chiosis, G., *et al.* (2008). Interaction of heat-shock protein 90 beta isoform (HSP90 beta) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell death and differentiation* **15**, 859-866.

Hansen, R.K., Oesterreich, S., Lemieux, P., Sarge, K.D., and Fuqua, S.A. (1997). Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **239**, 851-856.

Henkel, G.W., McKercher, S.R., Yamamoto, H., Anderson, K.L., Oshima, R.G., and Maki, R.A. (1996). PU.1 but not ets-2 is essential for macrophage development from embryonic stem cells. *Blood* **88**, 2917-2926.

Holmberg, C.I., Tran, S.E., Eriksson, J.E., and Sistonen, L. (2002). Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends in biochemical sciences* **27**, 619-627.

Leu, J.I., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M.E., and George, D.L. (2009). A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Molecular cell* **36**, 15-27.

Pirkkala, L., Nykanen, P., and Sistonen, L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J* **15**, 1118-1131.

Ribeil, J.A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., *et al.* (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102-105.

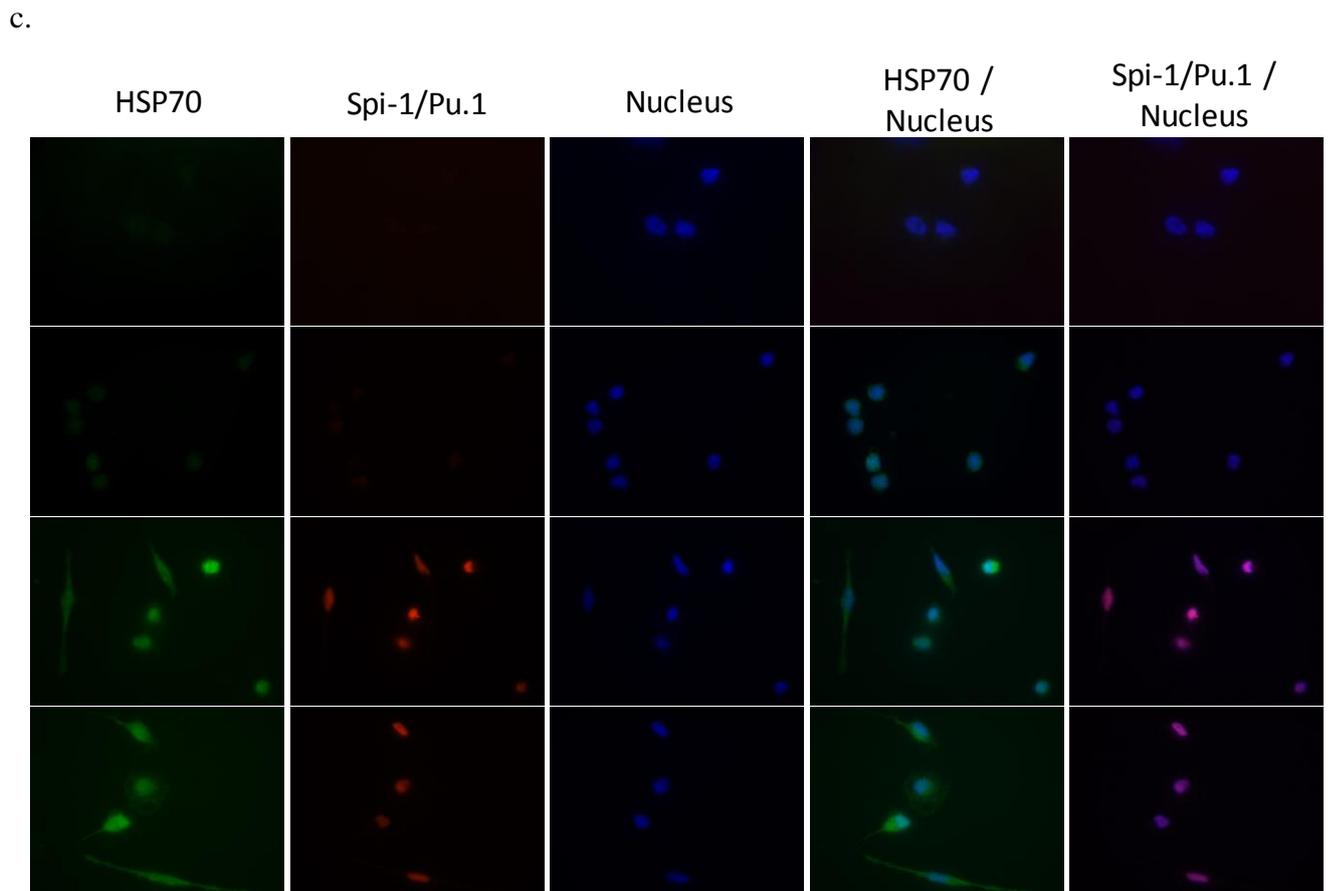
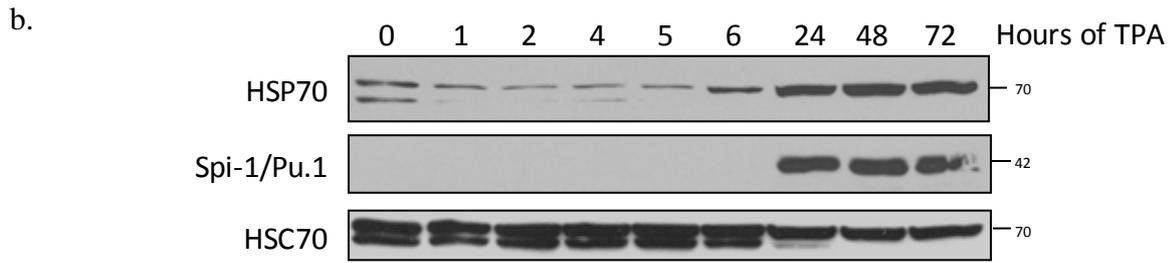
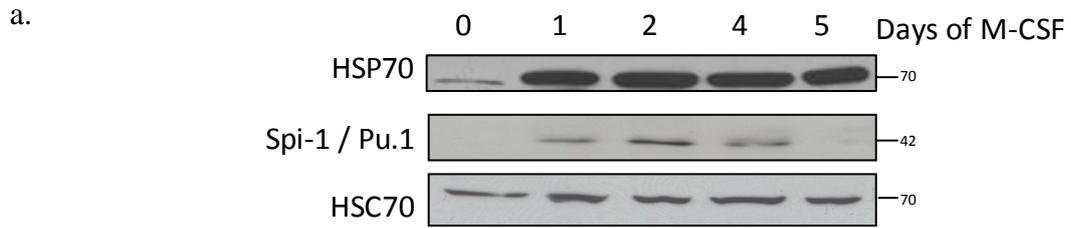
Rosenbauer, F., Wagner, K., Kutok, J.L., Iwasaki, H., Le Beau, M.M., Okuno, Y., Akashi, K., Fiering, S., and Tenen, D.G. (2004). Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nature genetics* **36**, 624-630.

Sordet, O., Rebe, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* **100**, 4446-4453.

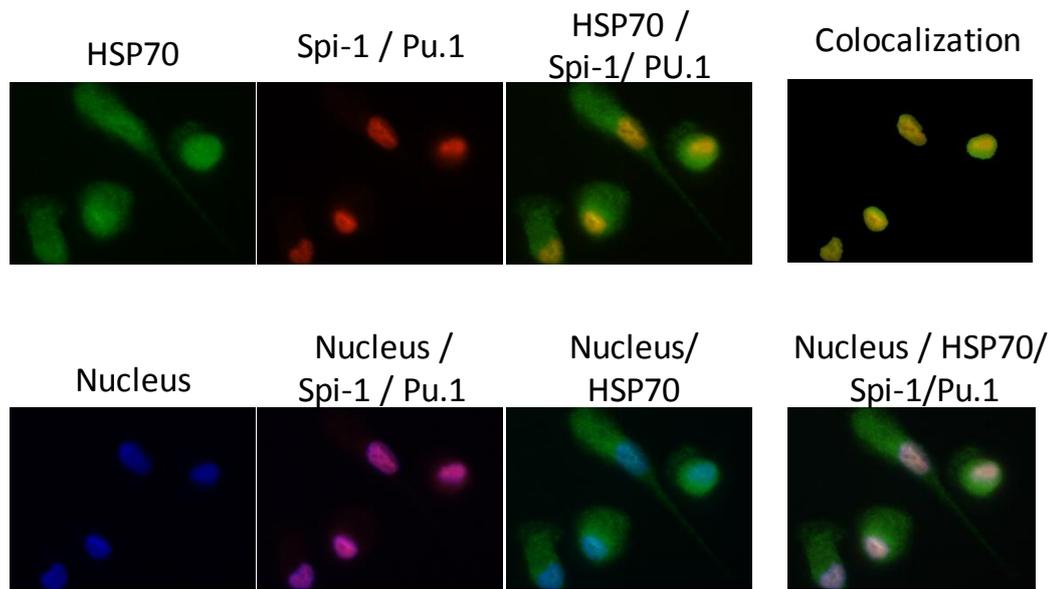
Tatetsu, H., Ueno, S., Hata, H., Yamada, Y., Takeya, M., Mitsuya, H., Tenen, D.G., and Okuno, Y. (2007). Down-regulation of PU.1 by methylation of distal regulatory elements and the promoter is required for myeloma cell growth. *Cancer research* **67**, 5328-5336.

Westerheide, S.D., Kawahara, T.L., Orton, K., and Morimoto, R.I. (2006). Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *The Journal of biological chemistry* **281**, 9616-9622.

**Figure1.**

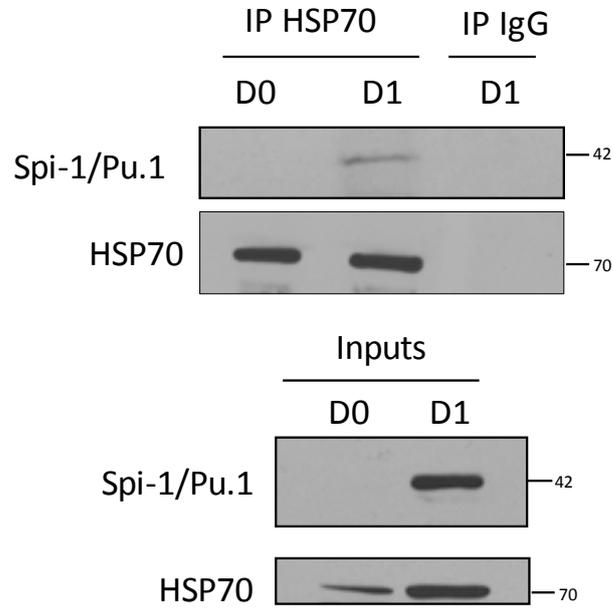


d.

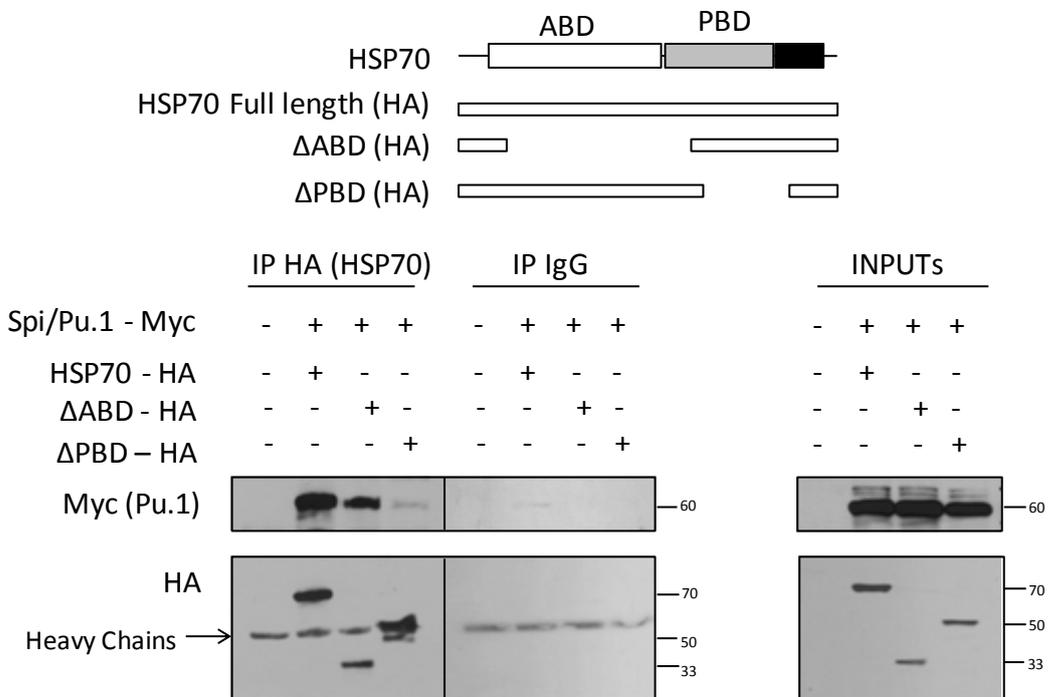


**Figure 2.**

a.

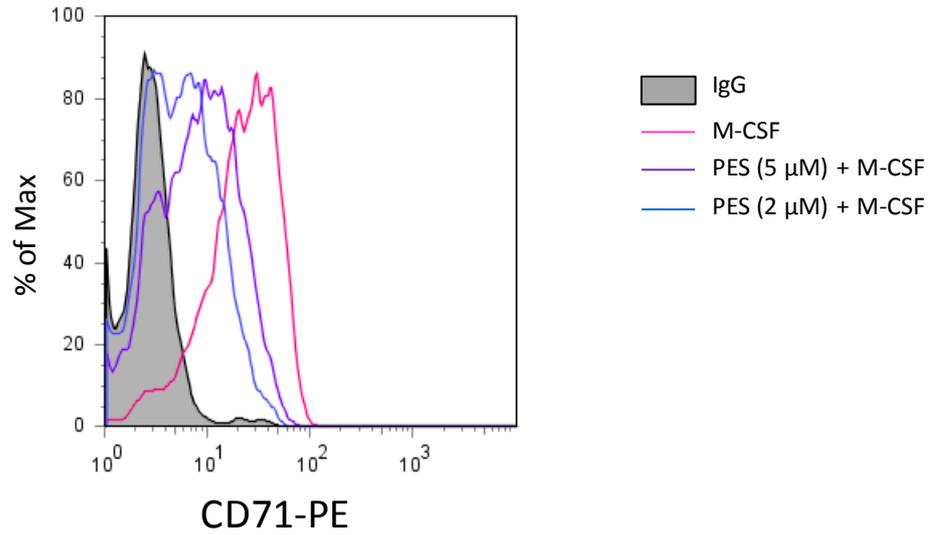


b.

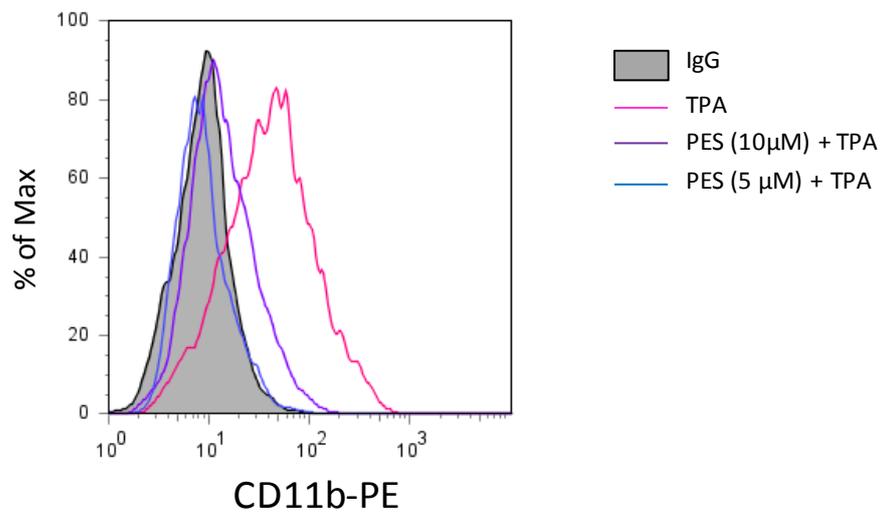


**Figure 3.**

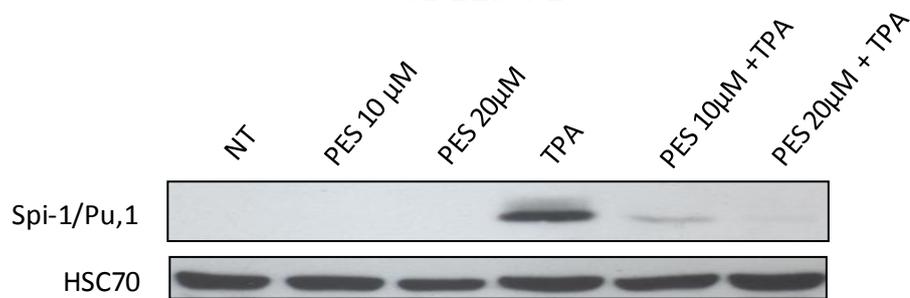
a.



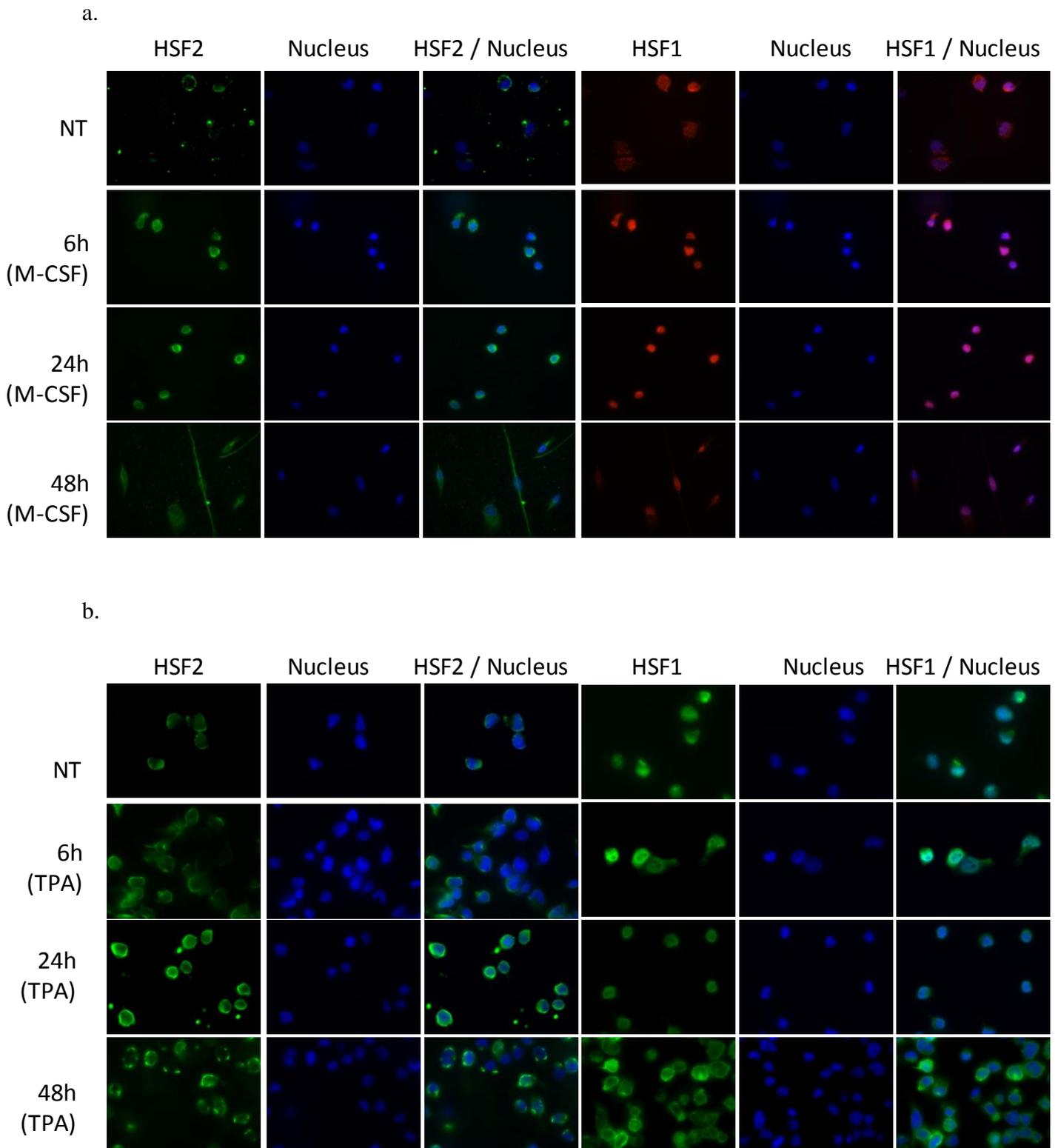
b.



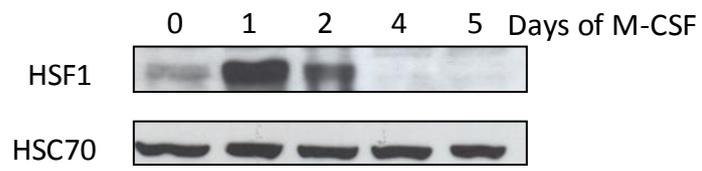
c.



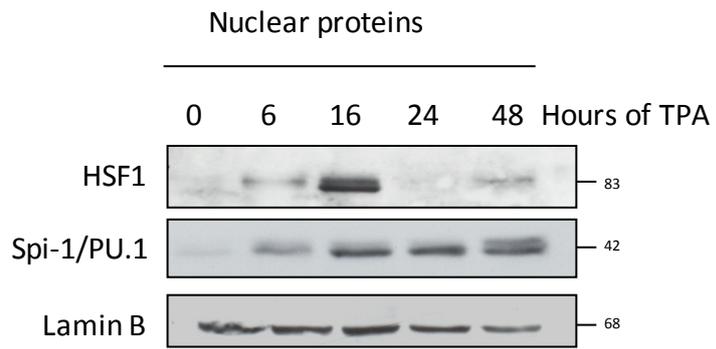
**Figure 4.**



c.



d.



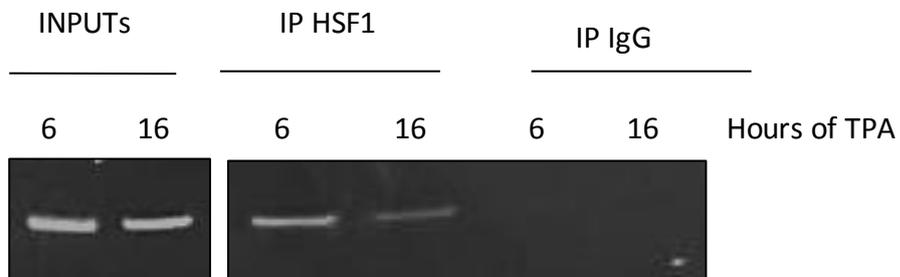
## Figure 5.

a.

Spi-1/Pu.1 promoter

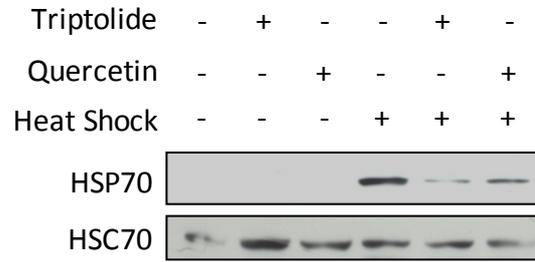
TTGTAAACCAGGAGGGTTAGATTGATATTCAGGCATTGCCAAGGGATGGGGAAACTGAGAAACCTGG  
GCTGGAAACAGAGCCCTAGGGATTTGAATGTGGTAATCAAGAAGCTGGGAGGGGAGGGTATAAGAA  
CCCAGGACCCTCTTCTGGTGGTAGGGAAGCCCATGTGAACAGATTCAGAGGGAAGGAAGAAAGCAG  
CACTATGCTGAAGACCCTACACCTGAGCCCAGCCTCAGCCTAGGGATAGCCTAGGCAGTGGGGGTGC  
AGGGCCACAGGAAGAGCCAGGCCTGATAGCCTGCTAGATCAGAGCCCTCACCCAGGAAGGCTGACT  
CCAGAAAGTGGAGGCCCAAGAGGGCCACCCCTTCCAGCTCTGACCCCAATGAGGTGACTGTTGGCTA  
CATAGGGATCTCAAAGAAGCAGGCATTTGTTGGGTTAGAGCAAAGCCTCCCAGTGGTGTGGCAG  
AGCTACAGTTCTCCCTCCCATCCTCCCTCCCAGCTTAGCCCCCAAAGTCATCCCTCTCAGTCCCAGCT  
TCCTCTGGGCAGGGGGCCTGGACCCCATGGCTTCCCAGGCCAGCCCTTTGAGCACCCACCTGCCCCAG  
CCGGCCAGAGACTTCCTGTATGTAGCGCAAGAGATTTATGCAAACGGGTTGGGGCGGTGATGTCACC  
CCAAGGGGACTATCTCCCAGCGGCAGGCCCTTCGATAAAATCAGGAACTTGTGCTGGCCCTGCAATGT  
CAAGGGAGGGGGCTCACCCAGGGCTCCTGTAGCTCAGGGGGCAGGCCTGAGCCCTGCACCCGCC  
CACGACCGTCCAGCCCCTGACGGGGCACCCATCCTGAGGGGCTCTGCATTGGCCCCCACCAGGGCA  
GGGGATCTGACCGACTCGGAGCCCGGCTGGATG

b.

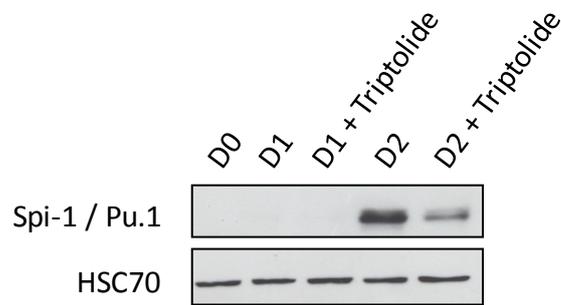


**Figure 6.**

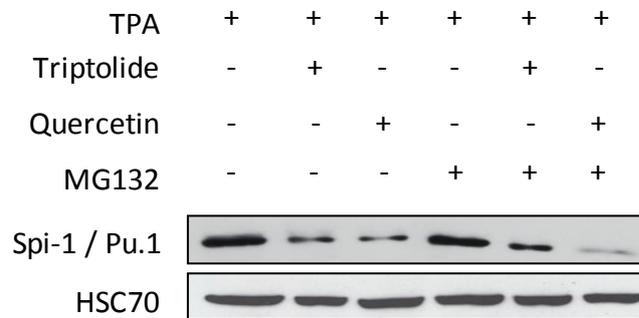
a.



b.

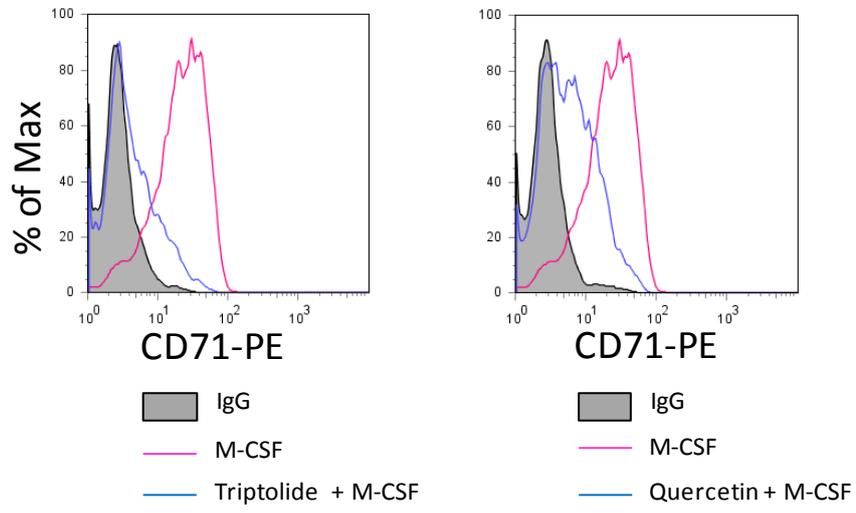


c.

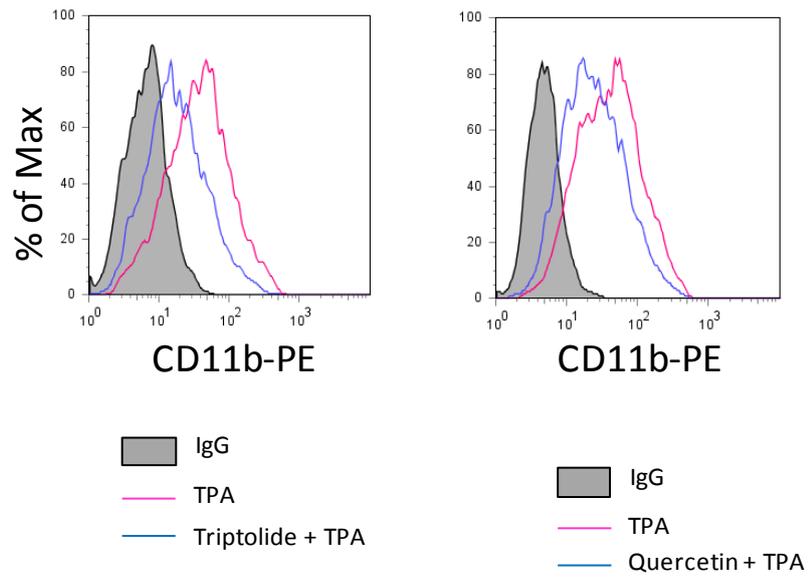


**Figure 7.**

a.



b.



# Discussion – Conclusions

---

HSP70 est probablement la protéine de choc thermique la plus fortement induite après un stress cellulaire afin de protéger la cellule contre les diverses agressions auxquelles elle peut être soumise. HSP70 participe en effet au repliement des protéines, à l'assemblage des complexes multi-protéiques ainsi qu'au transport de protéines à travers les membranes. HSP70 possède également un rôle important dans la régulation des processus cellulaires en interagissant avec de nombreuses protéines impliquées dans la transduction des signaux cellulaires, de la transcription, du cycle cellulaire ou de l'apoptose.

Nous montrons dans ce travail que HSP70 est impliquée dans la différenciation macrophagique. Nous avons en effet observé que cette protéine était fortement induite après stimulation des cellules par le facteur de croissance M-CSF ou par le TPA. De plus son inhibition à l'aide du PES, récemment décrit comme étant un inhibiteur spécifique de HSP70, bloque la différenciation des monocytes en macrophage. Nous utilisons actuellement des siRNA dirigés spécifiquement contre HSP70 afin d'évaluer plus précisément l'importance de HSP70 dans la différenciation cellulaire.

Nous montrons également que HSP70 interagit avec le facteur de transcription clé de la différenciation macrophagique, la protéine Spi-1/Pu.1. HSP70 étant un chaperon moléculaire, HSP70 pourrait chaperonner Spi-1/Pu.1 et participer à son repliement ou à sa stabilisation ou à son transport dans le noyau. Le PES, en interférant avec l'activité chaperon de HSP70, empêcherait le chaperonnage de Spi-1/Pu.1 et inhiberait ainsi l'activité de ce facteur de transcription et par conséquent bloquerait la différenciation macrophagique.

Certains rôles de HSP70 dans d'autres processus de différenciation ont été précédemment décrits. Mon équipe, en collaboration avec le groupe dirigé par le professeur Olivier Hermine, a ainsi montré que HSP70 pouvait protéger le facteur de transcription GATA-1 du clivage par les caspases lors de la différenciation érythroïde. Spi-1/Pu.1 est également clivé par la caspase-3 au cours de l'apoptose induite par les rayons UV de cellules

leucémiques. Puisque la caspase-3 est activée au cours de la différenciation macrophagique, HSP70 pourrait aussi protéger Spi-1/Pu.1 de son clivage à l'instar de son rôle dans la différenciation rouge.

HSP70 et Spi-1/Pu.1 sont tous deux fortement induits au cours de la différenciation macrophagique. Lors d'un stress, l'augmentation rapide de l'expression de HSP70 est le résultat de l'activation des facteurs de transcription HSF. Bien que HSF2 ait été décrit comme étant plus particulièrement impliqué dans le développement et la différenciation cellulaire, ce facteur de transcription ne semble pas être activé au cours de la différenciation macrophagique puisque nous n'observons pas sa présence dans le noyau. HSF1 est quant à lui transloqué dans le noyau au moment où l'expression de HSP70 et de Spi-1/Pu.1 commence à augmenter et semble être activé au cours de la différenciation macrophagique. L'état de trimerisation et de phosphorylation de HSF1 sera déterminé afin de confirmer l'activation de ce facteur de transcription.

L'étude du promoteur de Spi-1/Pu.1 a révélé la présence d'une séquence ressemblant fortement aux éléments de réponse classiques sur lesquels se fixe HSF1. Cet élément, situé 700 pb en amont du site d'initiation de la transcription, est en effet constitué de répétitions du motif GAA et TTC rappelant la structure d'un HSE. Nous montrons que HSF1 est capable de se fixer au niveau de cette séquence au moment où il est présent dans le noyau et où l'expression de Spi-1/Pu.1 augmente. Nous confirmerons la fixation de HSF1 sur ce nouvel HSE et identifierons plus précisément la séquence de cet HSE par des expériences de retard sur gel (EMSA) en utilisant des oligonucléotides comportant des mutations de cet HSE.

Nous montrons donc que HSF1 est capable de se fixer sur le promoteur de Spi-1/Pu.1 mais nous ignorons encore exactement le rôle de HSF1 sur l'expression de Spi-1/Pu.1. Le fait que HSF1 soit présent dans le noyau au moment où l'expression de Spi-1/Pu.1 commence à augmenter et que l'inhibition de HSF1 à l'aide de la quercétine ou du triptolide bloque l'expression de Spi-1/Pu.1 nous amène à penser que HSF1 serait un régulateur positif de l'expression de Spi-1/Pu.1. Ces inhibiteurs ne sont cependant pas spécifiques de HSF1 et pourraient peut-être cibler d'autres facteurs de transcription impliqués dans l'expression de

Spi-1/Pu.1. L'utilisation de siRNA dirigés contre HSF1 et de test d'activité luciférase (en utilisant le promoteur de Spi-1/pu.1 couplé au gène de la luciférase en présence ou non de HSF1) permettrait également d'évaluer plus spécifiquement le rôle de HSF1 dans le contrôle de l'expression de Spi-1/Pu.1.

HSF1, en plus de son rôle majeur dans la réponse au choc thermique, contrôle l'expression de protéines autres que les HSPs. Le stress cellulaire est un événement critique pour la cellule. La transcription de nombreux gènes considérés comme non-essentiels est ainsi inhibée afin de favoriser la survie de la cellule et HSF1 agit alors comme répresseur de l'expression de ces gènes. Ainsi dans les macrophages, HSF1 réprime l'expression des gènes du TNF $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$ , *c-fos* ou *c-fms* lors d'un choc thermique ; HSF1 régule également l'expression de gènes en dehors d'un stress. Ainsi HSF1 est nécessaire à l'induction de l'expression de l'IL-6 en réponse au LPS. HSF1 régule l'expression de l'IL-6 en permettant le recrutement de co-activateurs tels que NF- $\kappa$ B sur le promoteur de ce gène. HSF1 modifie l'acétylation de l'histone H3 et favorise l'ouverture de la chromatine. On peut penser que HSF1 joue un rôle semblable au niveau du promoteur de Spi-1/Pu.1 au cours de la différenciation macrophagique. HSF1 en se fixant sur ce promoteur permettrait le recrutement des facteurs de transcription responsables de l'induction de Spi-1/Pu1 comme NF- $\kappa$ B ou Spi-1/Pu.1 lui-même.

Lorsque le niveau des HSPs est suffisamment élevé, une partie de ces protéines entre dans le noyau. Ces HSPs provoquent le démantèlement des trimères de HSF1 et l'arrêt de son activité transcriptionnelle, permettant ainsi un retro-contrôle très fin de la réponse au choc thermique. On pourrait envisager un rôle semblable pour la différenciation : HSP70, qui est fortement induite, pourrait stopper l'activité transcriptionnelle de HSF1 et l'induction de Spi-1/Pu.1.

# Perspectives

---

Plusieurs travaux restent encore à effectuer afin de compléter cette étude :

- **Poursuivre l'étude de HSP70 dans la différenciation macrophagique.** Afin de mieux comprendre l'importance de HSP70 dans ce processus, nous utiliserons des siRNA dirigés spécifiquement contre HSP70 afin de diminuer l'expression de cette dernière puis nous analyserons l'état de différenciation de ces cellules ainsi que l'expression de Spi-1/Pu.1. Nous utiliserons également d'autres inhibiteurs de HSP70, notamment ceux développés par mon équipe, les aptamères peptidiques. Nous déterminerons également si Spi-1/Pu.1 est clivé au cours de la différenciation macrophagique et si HSP70 le protège.
- **Confirmer l'activation de HSF1** en étudiant son statut de phosphorylation (par immuno-empreinte et immuno-fluorescence) ainsi que son état d'oligomérisation (par immuno-empreinte après séparation des complexes suivant leur taille par chromatographie d'exclusion). Il serait également très intéressant de relier l'activation du récepteur au M-CSF avec celle de HSF1. La fixation du M-CSF sur son récepteur pourrait en effet entraîner l'activation de kinases qui phosphoryleraient HSF1. Nous utiliserons différents inhibiteurs de kinases (PI3k ...) avant de déclencher la différenciation des monocytes puis nous analyserons l'état de phosphorylation de HSF1.
- **Approfondir l'étude de la fixation de HSF1 sur le promoteur de Spi-1/Pu.1** par des expériences de gel retard (EMSA) en utilisant des oligonucléotides correspondant à la séquence sauvage ou mutée de l'HSE retrouvée dans le promoteur de Spi-1/Pu.1.
- **Définir le rôle de HSF1 sur le contrôle de l'expression de Spi-1/Pu.1** : HSF1 est-il un facteur de transcription ou plutôt un co-activateur pour Spi-1/Pu.1 ? nous étudierons son rôle par des tests de l'activité luciférase après transfection par un plasmide comprenant le promoteur de Spi-1/Pu.1 fusionné au gène rapporteur de la luciférase dans des cellules exprimant ou non HSF1.

- Déterminer plus précisément le rôle de HSF1 dans la différenciation macrophagique à l'aide de siRNA dirigés contre HSF1. Nous étudierons leurs effets sur la différenciation et sur l'expression de Spi-1/Pu.1. Nous utiliserons des souris invalidées pour HSF1 afin d'étudier les conséquences de son absence sur la différenciation macrophagique. Nous déterminerons enfin s'il existe un contrôle de l'arrêt de l'activité transcriptionnelle de HSF1 lorsque le niveau de HSP70 est élevé.

Comme pour HSP90, nous étudierons l'état de HSP70 et de HSF1 dans un contexte de différenciation pathologique (leucémie aiguë et leucémie myélo-monocytaire chronique).

Puisque HSF1 joue un rôle dans l'expression de Spi-1/Pu.1, il est probable que ce facteur de transcription contrôle l'expression d'autres gènes. Une approche plus générale par CHIP-sequencing après immunoprécipitation de HSF1 et séquençage de l'ADN précipité nous permettra de déterminer si HSF1 se fixe sur le promoteur des gènes autre que les HSPs et Spi-1/Pu.1.

*Discussion générale :*

*La différenciation cellulaire est-elle un  
stress cellulaire ?*

Les différents résultats que j'ai obtenus lors de mon doctorat ainsi que les données de la littérature montrent que les protéines de choc thermique et les facteurs de transcription responsables de leur induction, habituellement associés à la réponse au stress cellulaire, sont fortement impliqués dans le processus de différenciation. La différenciation cellulaire serait-elle alors une forme de stress cellulaire ?

La réponse au stress cellulaire comporte trois grandes parties :

- Le déclenchement de la réponse : le déclenchement de la réponse au stress cellulaire correspond à la rupture de l'équilibre au sein de la cellule : l'arrivée d'un stimulus, d'un signal, va bouleverser l'état d'origine de la cellule et va entraîner une réponse de la part de celle-ci dans le but de pouvoir retourner à un nouvel état d'équilibre. Dans le cas de la réponse suite à un stress cellulaire, le stimulus correspond au stress cellulaire lui-même. Il peut être de nature physique (température, les rayons UV ...) ou chimique (radicaux libres, métaux lourds ...). Ces différents stress ont en commun de perturber l'équilibre cellulaire en modifiant la fluidité membranaire, la conformation des protéines, l'intégrité de l'ADN et constituent un danger pour la cellule. Celle-ci est alors capable de détecter ce danger même si l'on ne sait pas encore vraiment comment. Un de ces mécanismes fait intervenir les HSPs. Lors d'un stress cellulaire, la conformation tridimensionnelle des protéines est altérée et celles-ci exposent alors à leur surface des parties hydrophobes normalement cachées à l'intérieur de leur structure. Les HSPs présentes dans la cellule et normalement associées aux Heat Shock Factors vont alors se détacher des HSFs et se lier à ces parties hydrophobes. Les HSFs ainsi libérés entrent dans le noyau et induisent la synthèse massive de HSPs.

- La réponse de la cellule : « le triage cellulaire ». Il consiste à arrêter la synthèse des protéines devenant inutiles, à éliminer les protéines anormales ou également inutiles déjà présentes et à protéger les protéines essentielles à la survie. C'est le rôle principal des HSPs lors d'un stress : elles favorisent le repliement des protéines, empêchent la formation d'agrégats et permettent la dégradation des protéines altérées ou inutiles.

- Le retour à l'équilibre : une fois ce triage effectué, la synthèse des HSPs s'arrête suite à l'arrêt de l'activité transcriptionnelle de HSF1. La synthèse des protéines retrouve peu à peu son activité normale.

Dans le cas de la différenciation cellulaire et notamment pour la différenciation macrophagique on retrouve ces trois grandes étapes :

Le déclenchement correspond souvent à l'arrivée d'une cytokine, d'un facteur de croissance sur son récepteur. La fixation de ces protéines va alors déclencher une cascade de signalisation impliquant par exemple des protéines kinases aboutissant à l'activation des gènes permettant l'expression de protéines nécessaires à l'acquisition de nouvelles fonctions pour la cellule. Les HSFs sont également impliqués dans cette première phase. Ils induisent l'expression des HSPs telles que HSP70 ou d'autres gènes tels que Spi-1/Pu.1.

Il existe également une forme de triage lors de la différenciation cellulaire : les protéines devenant inutiles sont éliminées (des données personnelles montrent que l'activité du protéasome augmente fortement lors de la différenciation). Les HSPs sont également fortement induites et assurent leur activité de chaperon (transport de protéines comme c-IAP1 ...) permettant à la cellule de retrouver un nouvel état d'équilibre

A mon sens ces deux processus sont très proches. Bien que les réponses en elle-même soient assez différentes (nature du stimulus : les cellules se différenciant ne sont pas réellement en danger de mort contrairement aux cellules subissant un stress, les voies de signalisation différent également), ce sont tous deux des phénomènes transitoires qui font intervenir certains acteurs communs (les HSFs et les HSPs) afin d'assurer la transition d'un état d'équilibre à un autre. On peut donc penser au final que le véritable rôle des HSPs est en fait d'adapter la cellule face à une situation inédite afin d'assurer sa survie.

## *Bibliographie*

- Akagawa, K.S. (2002). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *International journal of hematology* **76**, 27-34.
- Alberti, S., Esser, C., and Hohfeld, J. (2003). BAG-1--a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell stress & chaperones* **8**, 225-231.
- Amaravadi, L., and Klemsz, M.J. (1999). DNA methylation and chromatin structure regulate PU.1 expression. *DNA and cell biology* **18**, 875-884.
- Amin, J., Ananthan, J., and Voellmy, R. (1988). Key features of heat shock regulatory elements. *Molecular and cellular biology* **8**, 3761-3769.
- Andreasson, C., Fiaux, J., Rampelt, H., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2008). Hsp110 is a nucleotide-activated exchange factor for Hsp70. *The Journal of biological chemistry* **283**, 8877-8884.
- Antonoff, M.B., Chugh, R., Borja-Cacho, D., Dudeja, V., Clawson, K.A., Skube, S.J., Sorenson, B.S., Saltzman, D.A., Vickers, S.M., and Saluja, A.K. (2009). Triptolide therapy for neuroblastoma decreases cell viability in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Surgery* **146**, 282-290.
- Arrigo, A.P., Virost, S., Chaufour, S., Firdaus, W., Kretz-Remy, C., and Diaz-Latoud, C. (2005). Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal* **7**, 414-422.
- Ashburner, M. (1970). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses to environmental treatments. *Chromosoma* **31**, 356-376.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* **27**, 669-692.
- Back, J., Dierich, A., Bronn, C., Kastner, P., and Chan, S. (2004). PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. *Blood* **103**, 3615-3623.
- Bae, J., Mitsiades, C., Tai, Y.T., Bertheau, R., Shammas, M., Batchu, R.B., Li, C., Catley, L., Prabhala, R., Anderson, K.C., *et al.* (2007). Phenotypic and functional effects of heat shock protein 90 inhibition on dendritic cell. *J Immunol* **178**, 7730-7737.
- Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., *et al.* (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *The Journal of biological chemistry* **280**, 26729-26734.
- Baltathakis, I., Alcantara, O., and Boldt, D.H. (2001). Expression of different NF-kappaB pathway genes in dendritic cells (DCs) or macrophages assessed by gene expression profiling. *Journal of cellular biochemistry* **83**, 281-290.
- Barginear, M.F., Van Poznak, C., Rosen, N., Modi, S., Hudis, C.A., and Budman, D.R. (2008). The heat shock protein 90 chaperone complex: an evolving therapeutic target. *Current cancer drug targets* **8**, 522-532.

Barreda, D.R., Hanington, P.C., and Belosevic, M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental and comparative immunology* **28**, 509-554.

Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., and Green, D.R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature cell biology* **2**, 469-475.

Bektas, M., and Rubenstein, D.S. (2010). What's in a name?: Heat shock protein 27 and keratinocyte differentiation. *The Journal of investigative dermatology* **130**, 10-12.

Berendes, H.D. (1965). The induction of changes in chromosomal activity in different polytene types of cell in *Drosophila hydei*. *Developmental biology* **11**, 371-384.

Bertrand, M.J., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., and Barker, P.A. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Molecular cell* **30**, 689-700.

Bevers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W., and Zwaal, R.F. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* **1439**, 317-330.

Bierkamp, C., Luxey, M., Metchat, A., Audouard, C., Dumollard, R., and Christians, E. (2010). Lack of maternal Heat Shock Factor 1 results in multiple cellular and developmental defects, including mitochondrial damage and altered redox homeostasis, and leads to reduced survival of mammalian oocytes and embryos. *Developmental biology* **339**, 338-353.

Blankenship, J.W., Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A.V., Kirkpatrick, D.S., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Arnott, D., Aghajan, M., Zobel, K., *et al.* (2009). Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *The Biochemical journal* **417**, 149-160.

Bonadies, N., Neururer, C., Steege, A., Vallabhapurapu, S., Pabst, T., and Mueller, B.U. (2009). PU.1 is regulated by NF-kappaB through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene* **29**, 1062-1072.

Bonnycastle, L.L., Yu, C.E., Hunt, C.R., Trask, B.J., Clancy, K.P., Weber, J.L., Patterson, D., and Schellenberg, G.D. (1994). Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics* **23**, 85-93.

Buey, J.M., Paul, C., Fromentin, A., Hilpert, S., Arrigo, A.P., Solary, E., and Garrido, C. (2000). Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene* **19**, 4855-4863.

Brunet Simioni, M., De Thonel, A., Hammann, A., Joly, A.L., Bossis, G., Fourmaux, E., Bouchot, A., Landry, J., Piechaczyk, M., and Garrido, C. (2009). Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene* **28**, 3332-3344.

Burel, C., Mezger, V., Pinto, M., Rallu, M., Trigon, S., and Morange, M. (1992). Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia* **48**, 629-634.

- Bush, K.T., Goldberg, A.L., and Nigam, S.K. (1997). Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *The Journal of biological chemistry* **272**, 9086-9092.
- Cagan, R.L. (2003). Spermatogenesis: borrowing the apoptotic machinery. *Curr Biol* **13**, R600-602.
- Cai, J., Kirilin, W.G., Chen, Y., Yan, X., Jones, D.P., and Sartorelli, A.C. (2006). Overexpression of heat shock factor 1 inhibits butyrate-induced differentiation in colon cancer cells. *Cell stress & chaperones* **11**, 199-207.
- Chadli, A., Felts, S.J., and Toft, D.O. (2008). GCUNC45 is the first Hsp90 co-chaperone to show alpha/beta isoform specificity. *The Journal of biological chemistry* **283**, 9509-9512.
- Chaufour, S., Mehlen, P., and Arrigo, A.P. (1996). Transient accumulation, phosphorylation and changes in the oligomerization of Hsp27 during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells: possible role in the control of cellular growth and differentiation. *Cell stress & chaperones* **1**, 225-235.
- Chen, B., Piel, W.H., Gui, L., Bruford, E., and Monteiro, A. (2005). The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* **86**, 627-637.
- Chen, H., Ray-Gallet, D., Zhang, P., Hetherington, C.J., Gonzalez, D.A., Zhang, D.E., Moreau-Gachelin, F., and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* **11**, 1549-1560.
- Chen, H., Zhang, P., Radomska, H.S., Hetherington, C.J., Zhang, D.E., and Tenen, D.G. (1996). Octamer binding factors and their coactivator can activate the murine PU.1 (spi-1) promoter. *The Journal of biological chemistry* **271**, 15743-15752.
- Choi, Y.E., Butterworth, M., Malladi, S., Duckett, C.S., Cohen, G.M., and Bratton, S.B. (2009). The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *The Journal of biological chemistry* **284**, 12772-12782.
- Chou, S.T., Khandros, E., Bailey, L.C., Nichols, K.E., Vakoc, C.R., Yao, Y., Huang, Z., Crispino, J.D., Hardison, R.C., Blobel, G.A., et al. (2009). Graded repression of PU.1/Sfp1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood* **114**, 983-994.
- Christians, E., Davis, A.A., Thomas, S.D., and Benjamin, I.J. (2000). Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* **407**, 693-694.
- Conde, R., Belak, Z.R., Nair, M., O'Carroll, R.F., and Ovsenek, N. (2009). Modulation of Hsf1 activity by novobiocin and geldanamycin. *Biochem Cell Biol* **87**, 845-851.
- Conze, D.B., Albert, L., Ferrick, D.A., Goeddel, D.V., Yeh, W.C., Mak, T., and Ashwell, J.D. (2005). Posttranscriptional downregulation of c-IAP2 by the ubiquitin protein ligase c-IAP1 in vivo. *Molecular and cellular biology* **25**, 3348-3356.
- Crook, N.E., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of virology* **67**, 2168-2174.

- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., and Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics* **79**, 129-168.
- Csomos, R.A., Brady, G.F., and Duckett, C.S. (2009). Enhanced cytoprotective effects of the inhibitor of apoptosis protein cellular IAP1 through stabilization with TRAF2. *The Journal of biological chemistry* **284**, 20531-20539.
- Cuesta, R., Laroia, G., and Schneider, R.J. (2000). Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes & development* **14**, 1460-1470.
- Czar, M.J., Welsh, M.J., and Pratt, W.B. (1996). Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *European journal of cell biology* **70**, 322-330.
- Dakic, A., Metcalf, D., Di Rago, L., Mifsud, S., Wu, L., and Nutt, S.L. (2005). PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1487-1502.
- Daugaard, M., Rohde, M., and Jaattela, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS letters* **581**, 3702-3710.
- Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Joly, A.L., De Thonel, A., Chiosis, G., and Garrido, C. (2007). Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Current medicinal chemistry* **14**, 2839-2847.
- Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A., and Garrido, C. (2006). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handbook of experimental pharmacology*, 171-198.
- Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Mori, C., Nakamura, N., Poorman-Allen, P., Goulding, E.H., and Eddy, E.M. (1996). Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3264-3268.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Dupoux, A., Cartier, J., Cathelin, S., Filomenko, R., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2009). cIAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand. *Blood* **113**, 175-185.
- Ebralidze, A.K., Guibal, F.C., Steidl, U., Zhang, P., Lee, S., Bartholdy, B., Jorda, M.A., Petkova, V., Rosenbauer, F., Huang, G., *et al.* (2008). PU.1 expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs regulated by a shared cis-regulatory element. *Genes & development* **22**, 2085-2092.
- Eckelman, B.P., and Salvesen, G.S. (2006). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *The Journal of biological chemistry* **281**, 3254-3260.

- Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M., and Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO journal* **16**, 221-229.
- Eichbaum, Q., Heney, D., Raveh, D., Chung, M., Davidson, M., Epstein, J., and Ezekowitz, R.A. (1997). Murine macrophage mannose receptor promoter is regulated by the transcription factors PU.1 and SP1. *Blood* **90**, 4135-4143.
- Eisenberg, E., and Greene, L.E. (2007). Multiple roles of auxilin and hsc70 in clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* **8**, 640-646.
- Evans, T.G., Belak, Z., Ovsenek, N., and Krone, P.H. (2007). Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **146**, 131-140.
- Felts, S.J., Owen, B.A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D.B., and Toft, D.O. (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *The Journal of biological chemistry* **275**, 3305-3312.
- Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S., and Megeney, L.A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11025-11030.
- Fiorenza, M.T., Farkas, T., Dissing, M., Kolding, D., and Zimarino, V. (1995). Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res* **23**, 467-474.
- Fischer, U., Janicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation* **10**, 76-100.
- Fisher, R.C., Olson, M.C., Pongubala, J.M., Perkel, J.M., Atchison, M.L., Scott, E.W., and Simon, M.C. (1998). Normal myeloid development requires both the glutamine-rich transactivation domain and the PEST region of transcription factor PU.1 but not the potent acidic transactivation domain. *Molecular and cellular biology* **18**, 4347-4357.
- Fixe, P., and Praloran, V. (1998). M-CSF: haematopoietic growth factor or inflammatory cytokine? *Cytokine* **10**, 32-37.
- Florin, L., Becker, K.A., Sapp, C., Lambert, C., Sirma, H., Muller, M., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2004). Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *Journal of virology* **78**, 5546-5553.
- Flygare, J.A., and Fairbrother, W.J. (2010). Small-molecule pan-IAP antagonists: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* **20**, 251-267.
- Friedman, A.D. (2002a). Runx1, c-Myb, and C/EBPalpha couple differentiation to proliferation or growth arrest during hematopoiesis. *Journal of cellular biochemistry* **86**, 624-629.
- Friedman, A.D. (2002b). Transcriptional regulation of myelopoiesis. *International journal of hematology* **75**, 466-472.

- Fritah, S., Col, E., Boyault, C., Govin, J., Sadoul, K., Chiocca, S., Christians, E., Khochbin, S., Jolly, C., and Vourc'h, C. (2009). Heat-shock factor 1 controls genome-wide acetylation in heat-shocked cells. *Molecular biology of the cell* **20**, 4976-4984.
- Fujimoto, M., Hayashida, N., Katoh, T., Oshima, K., Shinkawa, T., Prakasam, R., Tan, K., Inouye, S., Takii, R., and Nakai, A. (2009). A novel mouse HSF3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock. *Molecular biology of the cell* **21**, 106-116.
- Fujimoto, M., Izu, H., Seki, K., Fukuda, K., Nishida, T., Yamada, S., Kato, K., Yonemura, S., Inouye, S., and Nakai, A. (2004). HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *The EMBO journal* **23**, 4297-4306.
- Galloway, J.L., Wingert, R.A., Thisse, C., Thisse, B., and Zon, L.I. (2005). Loss of gata1 but not gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos. *Developmental cell* **8**, 109-116.
- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., and Kroemer, G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* **5**, 2592-2601.
- Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A.P., Mehlen, P., and Solary, E. (1998). Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer research* **58**, 5495-5499.
- Gething, M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Seminars in cell & developmental biology* **10**, 465-472.
- Gorlich, D. (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *The EMBO journal* **17**, 2721-2727.
- Govin, J., Caron, C., Escoffier, E., Ferro, M., Kuhn, L., Rousseaux, S., Eddy, E.M., Garin, J., and Khochbin, S. (2006). Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *The Journal of biological chemistry* **281**, 37888-37892.
- Grebenova, D., Kuzelova, K., Pluskalova, M., Peslova, G., Halada, P., and Hrkal, Z. (2006). The proteomic study of sodium butyrate antiproliferative/cytodifferentiation effects on K562 cells. *Blood cells, molecules & diseases* **37**, 210-217.
- Green, M., Schuetz, T.J., Sullivan, E.K., and Kingston, R.E. (1995). A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Molecular and cellular biology* **15**, 3354-3362.
- Grondin, B., Lefrancois, M., Tremblay, M., Saint-Denis, M., Haman, A., Waga, K., Bedard, A., Tenen, D.G., and Hoang, T. (2007). c-Jun homodimers can function as a context-specific coactivator. *Molecular and cellular biology* **27**, 2919-2933.
- Gunther, E., and Walter, L. (1994). Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia* **50**, 987-1001.
- Guo, F., Sigua, C., Bali, P., George, P., Fiskus, W., Scuto, A., Annavarapu, S., Mouttaki, A., Sondarva, G., Wei, S., et al. (2005). Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* **105**, 1246-1255.

- Gupta, R.S. (1995). Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Molecular biology and evolution* **12**, 1063-1073.
- Guzhova, I., and Margulis, B. (2006). Hsp70 chaperone as a survival factor in cell pathology. *Int Rev Cytol* **254**, 101-149.
- Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M.M., Zender, L., Xue, W., Tenev, T., da Fonseca, P.C., Zvelebil, M., Bujnicki, J.M., *et al.* (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nature cell biology* **10**, 1309-1317.
- Hallier, M., Tavitian, A., and Moreau-Gachelin, F. (1996). The transcription factor Spi-1/PU.1 binds RNA and interferes with the RNA-binding protein p54nrb. *The Journal of biological chemistry* **271**, 11177-11181.
- Hansen, R.K., Oesterreich, S., Lemieux, P., Sarge, K.D., and Fuqua, S.A. (1997). Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **239**, 851-856.
- Harrison, C.J., Bohm, A.A., and Nelson, H.C. (1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science (New York, NY)* **263**, 224-227.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 574-581.
- Heckl, S., Sturzu, A., Regenbogen, M., Beck, A., Feil, G., Gharabaghi, A., and Echner, H. (2008). A novel polyarginine containing Smac peptide conjugate that mediates cell death in tumor and healthy cells. *Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))* **4**, 348-354.
- Henkel, G.W., McKercher, S.R., Yamamoto, H., Anderson, K.L., Oshima, R.G., and Maki, R.A. (1996). PU.1 but not ets-2 is essential for macrophage development from embryonic stem cells. *Blood* **88**, 2917-2926.
- Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E., and Blatch, G.L. (2005). Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci* **14**, 1697-1709.
- Hohfeld, J., Cyr, D.M., and Patterson, C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep* **2**, 885-890.
- Hoj, A., and Jakobsen, B.K. (1994). A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *The EMBO journal* **13**, 2617-2624.
- Huang, G., Zhang, P., Hirai, H., Elf, S., Yan, X., Chen, Z., Koschmieder, S., Okuno, Y., Dayaram, T., Gowney, J.D., *et al.* (2008). PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nature genetics* **40**, 51-60.

Huang, W., Horvath, E., and Eklund, E.A. (2007). PU.1, interferon regulatory factor (IRF) 2, and the interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF8) cooperate to activate NF1 transcription in differentiating myeloid cells. *The Journal of biological chemistry* **282**, 6629-6643.

Hunt, C., and Morimoto, R.I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 6455-6459.

Huo, X., and Zhang, J. (2005). Important roles of reversible acetylation in the function of hematopoietic transcription factors. *Journal of cellular and molecular medicine* **9**, 103-112.

Ingolia, T.D., and Craig, E.A. (1982). Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 2360-2364.

Inoue, T., Hirata, K., Kuwana, Y., Fujita, M., Miwa, J., Roy, R., and Yamaguchi, Y. (2006). Cell cycle control by daf-21/Hsp90 at the first meiotic prophase/metaphase boundary during oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Development, growth & differentiation* **48**, 25-32.

Inouye, S., Fujimoto, M., Nakamura, T., Takaki, E., Hayashida, N., Hai, T., and Nakai, A. (2007). Heat shock transcription factor 1 opens chromatin structure of interleukin-6 promoter to facilitate binding of an activator or a repressor. *The Journal of biological chemistry* **282**, 33210-33217.

Ito, H., Kamei, K., Iwamoto, I., Inaguma, Y., and Kato, K. (2001). Regulation of the levels of small heat-shock proteins during differentiation of C2C12 cells. *Experimental cell research* **266**, 213-221.

Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., *et al.* (2005). Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**, 1590-1600.

Jacquel, A., Benikhlef, N., Paggetti, J., Lalaoui, N., Guery, L., Dufour, E.K., Ciudad, M., Racœur, C., Micheau, O., Delva, L., *et al.* (2009). Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages. *Blood* **114**, 3633-3641.

Jakobsen, B.K., and Pelham, H.R. (1988). Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Molecular and cellular biology* **8**, 5040-5042.

Jameel, A., Skilton, R.A., Campbell, T.A., Chander, S.K., Coombes, R.C., and Luqmani, Y.A. (1992). Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer. *International journal of cancer* **50**, 409-415.

Jang, B.C., Jung, T.Y., Paik, J.H., Kwon, Y.K., Shin, S.W., Kim, S.P., Ha, J.S., Suh, M.H., and Suh, S.I. (2005). Tetradecanoyl phorbol acetate induces expression of Toll-like receptor 2 in U937 cells: involvement of PKC, ERK, and NF-kappaB. *Biochemical and biophysical research communications* **328**, 70-77.

Jurivich, D.A., Sistonen, L., Kroes, R.A., and Morimoto, R.I. (1992). Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science (New York, NY)* **255**, 1243-1245.

Kaarniranta, K., Ryhanen, T., Sironen, R.K., Suuronen, T., Elo, M.A., Karjalainen, H.M., Lammi, M.J., Terasvirta, M., Uusitalo, H., and Salminen, A. (2005). Geldanamycin activates Hsp70 response and attenuates okadaic acid-induced cytotoxicity in human retinal pigment epithelial cells. *Brain Res Mol Brain Res* **137**, 126-131.

Kallio, M., Chang, Y., Manuel, M., Alastalo, T.P., Rallu, M., Gitton, Y., Pirkkala, L., Loones, M.T., Paslaru, L., Larney, S., *et al.* (2002). Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *The EMBO journal* **21**, 2591-2601.

Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M.F., Fritz, L.C., and Burrows, F.J. (2003). A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **425**, 407-410.

Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., and Hightower, L.E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell stress & chaperones* **14**, 105-111.

Karin, M., and Gallagher, E. (2009). TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunological reviews* **228**, 225-240.

Klemsz, M.J., and Maki, R.A. (1996). Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains. *Molecular and cellular biology* **16**, 390-397.

Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C., and Maki, R.A. (1990). The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* **61**, 113-124.

Kodama, H., Yamasaki, A., Nose, M., Niida, S., Ohgame, Y., Abe, M., Kumegawa, M., and Suda, T. (1991). Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (op/op) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* **173**, 269-272.

Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., and Yao, T.P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Molecular cell* **18**, 601-607.

Kozuma, Y., Yuki, S., Ninomiya, H., Nagasawa, T., and Kojima, H. (2009). Caspase activation is involved in early megakaryocyte differentiation but not in platelet production from megakaryocytes. *Leukemia* **23**, 1080-1086.

Krieser, R.J., and White, K. (2002). Engulfment mechanism of apoptotic cells. *Current opinion in cell biology* **14**, 734-738.

Krone, P.H., Evans, T.G., and Blechinger, S.R. (2003). Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* **14**, 267-274.

Krysinska, H., Hoogenkamp, M., Ingram, R., Wilson, N., Tagoh, H., Laslo, P., Singh, H., and Bonifer, C. (2007). A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the c-fms gene. *Molecular and cellular biology* **27**, 878-887.

Kulesa, H., Frampton, J., and Graf, T. (1995). GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes & development* **9**, 1250-1262.

Kwak, H.J., Jun, C.D., Pae, H.O., Yoo, J.C., Park, Y.C., Choi, B.M., Na, Y.G., Park, R.K., Chung, H.T., Chung, H.Y., *et al.* (1998). The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation, and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. *Cellular immunology* **187**, 1-12.

LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., and MacKenzie, A.E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247-3259.

Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., and Garrido, C. (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of cellular and molecular medicine* **12**, 743-761.

Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C., and Garrido, C. (2007). Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* **1**, 53-60.

Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C. (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* **24**, 5137-5148.

Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., and Vierling, E. (1997). A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *The EMBO journal* **16**, 659-671.

Lee, J.H., Hubel, A., and Schoffl, F. (1995). Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant J* **8**, 603-612.

Leu, J.I., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M.E., and George, D.L. (2009). A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Molecular cell* **36**, 15-27.

Li, G.C., and Werb, Z. (1982). Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 3218-3222.

Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J.D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* **416**, 345-347.

Li, Y., Okuno, Y., Zhang, P., Radomska, H.S., Chen, H., Iwasaki, H., Akashi, K., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A., *et al.* (2001). Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood* **98**, 2958-2965.

Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics* **22**, 631-677.

Lloberas, J., Soler, C., and Celada, A. (1999). The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunology today* **20**, 184-189.

Loones, M.T., and Morange, M. (1998). Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo. *Cell stress & chaperones* **3**, 237-244.

- Lu, M., Sohn, K.J., Kim, S.W., Li, C.R., Kim, S., Kim, D.K., and Park, J.S. (2009). Alpha-helix 1 in the DNA-binding domain of heat shock factor 1 regulates its heat-induced trimerization and DNA-binding. *Biochemical and biophysical research communications* **385**, 612-617.
- Lui, J.C., and Kong, S.K. (2007). Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. *FEBS letters* **581**, 109-117.
- Luo, S., Mao, C., Lee, B., and Lee, A.S. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and cellular biology* **26**, 5688-5697.
- Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Mrad, R.L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., Arora, V., Mak, T.W., Lacasse, E.C., Waring, J., *et al.* (2008). Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 11778-11783.
- Maki, R.G., Old, L.J., and Srivastava, P.K. (1990). Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 5658-5662.
- Mao, L., and Shelden, E.A. (2006). Developmentally regulated gene expression of the small heat shock protein Hsp27 in zebrafish embryos. *Gene Expr Patterns* **6**, 127-133.
- Martin, C.A., Kurkowski, D.L., Valentino, A.M., and Santiago-Schwarz, F. (2009). Increased intracellular, cell surface, and secreted inducible heat shock protein 70 responses are triggered during the monocyte to dendritic cell (DC) transition by cytokines independently of heat stress and infection and may positively regulate DC growth. *J Immunol* **183**, 388-399.
- Martinez-Ruiz, A., Villanueva, L., Gonzalez de Orduna, C., Lopez-Ferrer, D., Higuera, M.A., Tarin, C., Rodriguez-Crespo, I., Vazquez, J., and Lamas, S. (2005). S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8525-8530.
- Massey, A.J., Williamson, D.S., Browne, H., Murray, J.B., Dokurno, P., Shaw, T., Macias, A.T., Daniels, Z., Geoffroy, S., Dopson, M., *et al.* (2009). A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Matsui, H., Asou, H., and Inaba, T. (2007). Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Molecular cell* **25**, 99-112.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., *et al.* (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO journal* **15**, 5647-5658.
- McMillan, D.R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K., and Benjamin, I.J. (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **273**, 7523-7528.

- Metchat, A., Akerfelt, M., Bierkamp, C., Delsinne, V., Sistonen, L., Alexandre, H., and Christians, E.S. (2009). Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates Hsp90alpha expression. *The Journal of biological chemistry* **284**, 9521-9528.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**, 181-190.
- Miller, L.K. (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in cell biology* **9**, 323-328.
- Miller, M.J., Xuong, N.H., and Geiduschek, E.P. (1979). A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 5222-5225.
- Millson, S.H., Truman, A.W., Racz, A., Hu, B., Panaretou, B., Nuttall, J., Mollapour, M., Soti, C., and Piper, P.W. (2007). Expressed as the sole Hsp90 of yeast, the alpha and beta isoforms of human Hsp90 differ with regard to their capacities for activation of certain client proteins, whereas only Hsp90beta generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *The FEBS journal* **274**, 4453-4463.
- Milner, C.M., and Campbell, R.D. (1990). Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* **32**, 242-251.
- Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Yahara, I. (1994). The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Molecular and cellular biology* **14**, 1459-1464.
- Mizzen, L.A., Chang, C., Garrels, J.I., and Welch, W.J. (1989). Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the hsp 70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein. *The Journal of biological chemistry* **264**, 20664-20675.
- Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A., and Tambourin, P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* **331**, 277-280.
- Moroianu, J. (1998). Distinct nuclear import and export pathways mediated by members of the karyopherin beta family. *Journal of cellular biochemistry* **70**, 231-239.
- Mosser, D.D., Kotzbauer, P.T., Sarge, K.D., and Morimoto, R.I. (1990). In vitro activation of heat shock transcription factor DNA-binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 3748-3752.
- Multhoff, G. (2006). Heat shock proteins in immunity. *Handbook of experimental pharmacology*, 279-304.
- Munro, S., and Pelham, H.R. (1986). An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**, 291-300.

Murphy, P.J., Morishima, Y., Kovacs, J.J., Yao, T.P., and Pratt, W.B. (2005). Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *The Journal of biological chemistry* **280**, 33792-33799.

Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *Journal of biochemistry and molecular biology* **40**, 1-6.

Nagai, N., Nakai, A., and Nagata, K. (1995). Quercetin suppresses heat shock response by down regulation of HSF1. *Biochemical and biophysical research communications* **208**, 1099-1105.

Nakai, A. (1999). New aspects in the vertebrate heat shock factor system: Hsf3 and Hsf4. *Cell stress & chaperones* **4**, 86-93.

Nakai, A., and Morimoto, R.I. (1993). Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Molecular and cellular biology* **13**, 1983-1997.

Neckers, L., and Neckers, K. (2002). Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Expert opinion on emerging drugs* **7**, 277-288.

Nerlov, C., Querfurth, E., Kulessa, H., and Graf, T. (2000). GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* **95**, 2543-2551.

Neuhaus, E.M., Mashukova, A., Zhang, W., Barbour, J., and Hatt, H. (2006). A specific heat shock protein enhances the expression of mammalian olfactory receptor proteins. *Chem Senses* **31**, 445-452.

Nguyen, V.T., Morange, M., and Bensaude, O. (1989). Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells. *The Journal of biological chemistry* **264**, 10487-10492.

Nieto-Sotelo, J., Wiederrecht, G., Okuda, A., and Parker, C.S. (1990). The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* **62**, 807-817.

Nimmanapalli, R., O'Bryan, E., and Bhalla, K. (2001). Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer research* **61**, 1799-1804.

Nishiyama, C., Nishiyama, M., Ito, T., Masaki, S., Masuoka, N., Yamane, H., Kitamura, T., Ogawa, H., and Okumura, K. (2004). Functional analysis of PU.1 domains in monocyte-specific gene regulation. *FEBS letters* **561**, 63-68.

Nobuhisa, T., Naomoto, Y., Okawa, T., Takaoka, M., Gunduz, M., Motoki, T., Nagatsuka, H., Tsujigiwa, H., Shirakawa, Y., Yamatsuji, T., et al. (2007). Translocation of heparanase into nucleus results in cell differentiation. *Cancer science* **98**, 535-540.

Nover, L., Scharf, K.D., Gagliardi, D., Vergne, P., Czarnecka-Verner, E., and Gurley, W.B. (1996). The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell stress & chaperones* **1**, 215-223.

Numazawa, S., Watabe, M., Nishimura, S., Kurosawa, M., Izuno, M., and Yoshida, T. (2003). Regulation of ERK-mediated signal transduction by p38 MAP kinase in human monocytic THP-1 cells. *Journal of biochemistry* **133**, 599-605.

Okuno, Y., Huang, G., Rosenbauer, F., Evans, E.K., Radomska, H.S., Iwasaki, H., Akashi, K., Moreau-Gachelin, F., Li, Y., Zhang, P., *et al.* (2005). Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Molecular and cellular biology* **25**, 2832-2845.

Ostermann, J., Voos, W., Kang, P.J., Craig, E.A., Neupert, W., and Pfanner, N. (1990). Precursor proteins in transit through mitochondrial contact sites interact with hsp70 in the matrix. *FEBS letters* **277**, 281-284.

Ostling, P., Bjork, J.K., Roos-Mattjus, P., Mezger, V., and Sistonen, L. (2007). Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *The Journal of biological chemistry* **282**, 7077-7086.

Oza, J., Yang, J., Chen, K.Y., and Liu, A.Y. (2008). Changes in the regulation of heat shock gene expression in neuronal cell differentiation. *Cell stress & chaperones* **13**, 73-84.

Pahl, H.L., Scheibe, R.J., Zhang, D.E., Chen, H.M., Galson, D.L., Maki, R.A., and Tenen, D.G. (1993). The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *The Journal of biological chemistry* **268**, 5014-5020.

Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Khochbin, S., Solary, E., *et al.* (2006). HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *Faseb J* **20**, 1179-1181.

Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., Seigneurin-Berny, D., Pance, A., Chantome, A., Plenchette, S., Khochbin, S., Solary, E., and Garrido, C. (2003). HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Molecular and cellular biology* **23**, 5790-5802.

Paul, C., Simon, S., Gibert, B., Virost, S., Manero, F., and Arrigo, A.P. (2010). Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27). *Experimental cell research*.

Pearl, L.H., and Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual review of biochemistry* **75**, 271-294.

Pennington, K.N., Taylor, J.A., Bren, G.D., and Paya, C.V. (2001). I-kappaB kinase-dependent chronic activation of NF-kappaB is necessary for p21(WAF1/Cip1) inhibition of differentiation-induced apoptosis of monocytes. *Molecular and cellular biology* **21**, 1930-1941.

Petersen, S.L., Wang, L., Yalcin-Chin, A., Li, L., Peyton, M., Minna, J., Harran, P., and Wang, X. (2007). Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer cell* **12**, 445-456.

Pham, T.H., Langmann, S., Schwarzfischer, L., El Chartouni, C., Lichtinger, M., Klug, M., Krause, S.W., and Rehli, M. (2007). CCAAT enhancer-binding protein beta regulates constitutive gene expression during late stages of monocyte to macrophage differentiation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 21924-21933.

Phillips, P.A., Dudeja, V., McCarroll, J.A., Borja-Cacho, D., Dawra, R.K., Grizzle, W.E., Vickers, S.M., and Saluja, A.K. (2007). Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70. *Cancer research* **67**, 9407-9416.

Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S., and Yamamoto, K.R. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* **348**, 166-168.

Pirkkala, L., Nykanen, P., and Sistonen, L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J* **15**, 1118-1131.

Pixley, F.J., and Stanley, E.R. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in cell biology* **14**, 628-638.

Plenchette, S., Cathelin, S., Rebe, C., Launay, S., Ladoire, S., Sordet, O., Ponnelle, T., Debili, N., Phan, T.H., Padua, R.A., *et al.* (2004). Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal-mediated event. *Blood* **104**, 2035-2043.

Powers, M.V., Jones, K., Barillari, C., Westwood, I., van Montfort, R.L., and Workman, P. (2010). Targeting HSP70: The second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell Cycle* **9**.

Powers, M.V., and Workman, P. (2006). Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocrine-related cancer* **13 Suppl 1**, S125-135.

Pratt, W.B. (1992). Control of steroid receptor function and cytoplasmic-nuclear transport by heat shock proteins. *Bioessays* **14**, 841-848.

Pratt, W.B., and Toft, D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* **228**, 111-133.

Queitsch, C., Sangster, T.A., and Lindquist, S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* **417**, 618-624.

Rabindran, S.K., Haroun, R.I., Clos, J., Wisniewski, J., and Wu, C. (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science (New York, NY)* **259**, 230-234.

Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., *et al.* (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature cell biology* **3**, 839-843.

Rebe, C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Prevotat, L., L'Ollivier, C., Gyan, E., Micheau, O., Grant, S., Dubart-Kupperschmitt, A., *et al.* (2007). Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* **109**, 1442-1450.

Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T., and Skoultchi, A.I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes & development* **13**, 1398-1411.

Ribeil, J.A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., *et al.* (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102-105.

Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573.

Robert, J., Menoret, A., and Cohen, N. (1999). Cell surface expression of the endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is phylogenetically conserved. *J Immunol* **163**, 4133-4139.

Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., *et al.* (1999). Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 18947-18956.

Rohde, M., Daugaard, M., Jensen, M.H., Helin, K., Nylandsted, J., and Jaattela, M. (2005). Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes & development* **19**, 570-582.

Rosenbauer, F., Owens, B.M., Yu, L., Tumang, J.R., Steidl, U., Kutok, J.L., Clayton, L.K., Wagner, K., Scheller, M., Iwasaki, H., *et al.* (2006). Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. *Nature genetics* **38**, 27-37.

Rosenbauer, F., and Tenen, D.G. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nature reviews* **7**, 105-117.

Rosenbauer, F., Wagner, K., Kutok, J.L., Iwasaki, H., Le Beau, M.M., Okuno, Y., Akashi, K., Fiering, S., and Tenen, D.G. (2004). Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nature genetics* **36**, 624-630.

Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., and Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**, 1243-1252.

Sakurai, H., and Takemori, Y. (2007). Interaction between heat shock transcription factors (HSFs) and divergent binding sequences: binding specificities of yeast HSFs and human HSF1. *The Journal of biological chemistry* **282**, 13334-13341.

Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 401-410.

Samuel, T., Okada, K., Hyer, M., Welsh, K., Zapata, J.M., and Reed, J.C. (2005). cIAP1 Localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. *Cancer research* **65**, 210-218.

Samuel, T., Welsh, K., Lober, T., Togo, S.H., Zapata, J.M., and Reed, J.C. (2006). Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases. *The Journal of biological chemistry* **281**, 1080-1090.

Sandqvist, A., Bjork, J.K., Akerfelt, M., Chitikova, Z., Grichine, A., Vourc'h, C., Jolly, C., Salminen, T.A., Nymalm, Y., and Sistonen, L. (2009). Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Molecular biology of the cell* **20**, 1340-1347.

Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10832-10837.

Schimmer, A.D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research* **64**, 7183-7190.

Schleicher, U., Hesse, A., and Bogdan, C. (2005). Minute numbers of contaminant CD8+ T cells or CD11b+CD11c+ NK cells are the source of IFN-gamma in IL-12/IL-18-stimulated mouse macrophage populations. *Blood* **105**, 1319-1328.

Schmitt, E., Maingret, L., Puig, P.E., Rerole, A.L., Ghiringhelli, F., Hammann, A., Solary, E., Kroemer, G., and Garrido, C. (2006). Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer research* **66**, 4191-4197.

Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science (New York, NY)* **265**, 1573-1577.

Shakoori, A.R., Oberdorf, A.M., Owen, T.A., Weber, L.A., Hickey, E., Stein, J.L., Lian, J.B., and Stein, G.S. (1992). Expression of heat shock genes during differentiation of mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *Journal of cellular biochemistry* **48**, 277-287.

Shashidharamurthy, R., Koteiche, H.A., Dong, J., and McHaourab, H.S. (2005). Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme. *The Journal of biological chemistry* **280**, 5281-5289.

Sistonen, L., Sarge, K.D., and Morimoto, R.I. (1994). Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Molecular and cellular biology* **14**, 2087-2099.

Sistonen, L., Sarge, K.D., Phillips, B., Abravaya, K., and Morimoto, R.I. (1992). Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Molecular and cellular biology* **12**, 4104-4111.

Son, W.Y., Han, C.T., Hwang, S.H., Lee, J.H., Kim, S., and Kim, Y.C. (2000). Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* **73**, 1138-1144.

Sordet, O., Rebe, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* **100**, 4446-4453.

Sorger, P.K., and Nelson, H.C. (1989). Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* **59**, 807-813.

Sorger, P.K., and Pelham, H.R. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* **54**, 855-864.

Soti, C., Racz, A., and Csermely, P. (2002). A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmask a C-terminal binding pocket. *The Journal of biological chemistry* **277**, 7066-7075.

Spector, N.L., Mehlen, P., Ryan, C., Hardy, L., Samson, W., Levine, H., Nadler, L.M., Fabre, N., and Arrigo, A.P. (1994). Regulation of the 28 kDa heat shock protein by retinoic acid during differentiation of human leukemic HL-60 cells. *FEBS letters* **337**, 184-188.

Sreedhar, A.S., Kalmar, E., Csermely, P., and Shen, Y.F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters* **562**, 11-15.

Srinivasula, S.M., and Ashwell, J.D. (2008). IAPs: what's in a name? *Molecular cell* **30**, 123-135.

Stankiewicz, A.R., Lachapelle, G., Foo, C.P., Radicioni, S.M., and Mosser, D.D. (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 38729-38739.

Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P., and Gaestel, M. (1992). Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS letters* **313**, 307-313.

Strom, E., Sathe, S., Komarov, P.G., Chernova, O.B., Pavlovskaya, I., Shyshynova, I., Borykh, D.A., Burdelya, L.G., Macklis, R.M., Skaliter, R., *et al.* (2006). Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol* **2**, 474-479.

Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A.H., Meadows, R.P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S.C., *et al.* (1999). NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* **401**, 818-822.

Sun, C., Cai, M., Meadows, R.P., Xu, N., Gunasekera, A.H., Herrmann, J., Wu, J.C., and Fesik, S.W. (2000). NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *The Journal of biological chemistry* **275**, 33777-33781.

Taira, T., Narita, T., Iguchi-Arigo, S.M., and Ariga, H. (1997). A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene. *Nucleic Acids Res* **25**, 1975-1983.

Takaki, E., Fujimoto, M., Sugahara, K., Nakahari, T., Yonemura, S., Tanaka, Y., Hayashida, N., Inouye, S., Takemoto, T., Yamashita, H., *et al.* (2006). Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. *The Journal of biological chemistry* **281**, 4931-4937.

Takemori, Y., Enoki, Y., Yamamoto, N., Fukai, Y., Adachi, K., and Sakurai, H. (2009). Mutational analysis of human heat-shock transcription factor 1 reveals a regulatory role for oligomerization in DNA-binding specificity. *The Biochemical journal* **424**, 253-261.

Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., and Kishimoto, T. (1995). Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* **80**, 353-361.

- Tang, E.D., Wang, C.Y., Xiong, Y., and Guan, K.L. (2003). A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry* **278**, 37297-37305.
- Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D., and Zhang, D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**, 489-519.
- Testori, A., Richards, J., Whitman, E., Mann, G.B., Lutzky, J., Camacho, L., Parmiani, G., Tosti, G., Kirkwood, J.M., Hoos, A., *et al.* (2008). Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 Study Group. *J Clin Oncol* **26**, 955-962.
- Theriault, J.R., Lambert, H., Chavez-Zobel, A.T., Charest, G., Lavigne, P., and Landry, J. (2004). Essential role of the NH2-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *The Journal of biological chemistry* **279**, 23463-23471.
- Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* **84**, 389-398.
- Trinklein, N.D., Chen, W.C., Kingston, R.E., and Myers, R.M. (2004). Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation. *Cell stress & chaperones* **9**, 21-28.
- Tsiftoglou, A.S., Pappas, I.S., and Vizirianakis, I.S. (2003). Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacology & therapeutics* **100**, 257-290.
- Tsukiyama, T., Becker, P.B., and Wu, C. (1994). ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* **367**, 525-532.
- Tsunekawa, N., Matsumoto, M., Tone, S., Nishida, T., and Fujimoto, H. (1999). The Hsp70 homolog gene, Hsc70t, is expressed under translational control during mouse spermiogenesis. *Mol Reprod Dev* **52**, 383-391.
- Uren, A.G., Pakusch, M., Hawkins, C.J., Puls, K.L., and Vaux, D.L. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 4974-4978.
- Usmani, S.Z., Bona, R., and Li, Z. (2009). 17 AAG for HSP90 inhibition in cancer--from bench to bedside. *Current molecular medicine* **9**, 654-664.
- Valledor, A.F., Borrás, F.E., Cullell-Young, M., and Celada, A. (1998). Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *Journal of leukocyte biology* **63**, 405-417.
- Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J.N., Elliott, L.O., Wallweber, H.J., *et al.* (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669-681.
- Vaux, D.L., and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 287-297.

- Velazquez, J.M., and Lindquist, S. (1984). hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* **36**, 655-662.
- Verdecia, M.A., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D.A., Hunter, T., and Noel, J.P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nature structural biology* **7**, 602-608.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
- Vince, J.E., Pantaki, D., Feltham, R., Mace, P.D., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Davidson, A.J., Callus, B.A., Wong, W.W., Gentle, I.E., *et al.* (2009). TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf- $\kappa$ b and to prevent tnf-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **284**, 35906-35915.
- Vince, J.E., Wong, W.W., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A.U., Benetatos, C.A., Chunduru, S.K., Condon, S.M., McKinlay, M., *et al.* (2007). IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. *Cell* **131**, 682-693.
- Voellmy, R. (2006). Feedback regulation of the heat shock response. *Handbook of experimental pharmacology*, 43-68.
- Voellmy, R., and Boellmann, F. (2007). Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv Exp Med Biol* **594**, 89-99.
- Voss, A.K., Thomas, T., and Gruss, P. (2000). Mice lacking HSP90 $\beta$  fail to develop a placental labyrinth. *Development (Cambridge, England)* **127**, 1-11.
- Vuister, G.W., Kim, S.J., Orosz, A., Marquardt, J., Wu, C., and Bax, A. (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of Drosophila heat shock transcription factor. *Nature structural biology* **1**, 605-614.
- Wandinger, S.K., Richter, K., and Buchner, J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *The Journal of biological chemistry* **283**, 18473-18477.
- Wang, C., and Youle, R.J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis\*. *Annual review of genetics* **43**, 95-118.
- Welch, W.J., and Suhan, J.P. (1986). Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* **103**, 2035-2052.
- Westerheide, S.D., Ankar, J., Stevens, S.M., Jr., Sistonen, L., and Morimoto, R.I. (2009). Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science (New York, NY)* **323**, 1063-1066.
- Westerheide, S.D., Kawahara, T.L., Orton, K., and Morimoto, R.I. (2006). Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *The Journal of biological chemistry* **281**, 9616-9622.

- Whitesell, L., and Lindquist, S. (2009). Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin Ther Targets* **13**, 469-478.
- Wiederrecht, G., Seto, D., and Parker, C.S. (1988). Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* **54**, 841-853.
- Wilkerson, D.C., Murphy, L.A., and Sarge, K.D. (2008). Interaction of HSF1 and HSF2 with the Hspa1b promoter in mouse epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* **79**, 283-288.
- Williamson, D.S., Borgognoni, J., Clay, A., Daniels, Z., Dokurno, P., Drysdale, M.J., Foloppe, N., Francis, G.L., Graham, C.J., Howes, R., *et al.* (2009). Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design. *Journal of medicinal chemistry* **52**, 1510-1513.
- Wu, C. (1980). The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature* **286**, 854-860.
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 441-469.
- Xiao, X., Zuo, X., Davis, A.A., McMillan, D.R., Curry, B.B., Richardson, J.A., and Benjamin, I.J. (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *The EMBO journal* **18**, 5943-5952.
- Xie, L.P., Fu, W.X., Jin, C., Dong, X.Y., and Chen, W.F. (2002). Negative regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by a mouse estrogen-enhanced transcript. *European journal of immunology* **32**, 2837-2846.
- Xu, D., Zalmas, L.P., and La Thangue, N.B. (2008). A transcription cofactor required for the heat-shock response. *EMBO Rep* **9**, 662-669.
- Yamamoto, N., Takemori, Y., Sakurai, M., Sugiyama, K., and Sakurai, H. (2009). Differential recognition of heat shock elements by members of the heat shock transcription factor family. *The FEBS journal* **276**, 1962-1974.
- Yang, Y., and Li, Z. (2005). Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Molecules and cells* **20**, 173-182.
- Yang, Y.L., and Li, X.M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell research* **10**, 169-177.
- Yang, Z., Wara-Aswapati, N., Chen, C., Tsukada, J., and Auron, P.E. (2000). NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether. *The Journal of biological chemistry* **275**, 21272-21277.
- Yokota, S., Kitahara, M., and Nagata, K. (2000). Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells. *Cancer research* **60**, 2942-2948.
- Yoshima, T., Yura, T., and Yanagi, H. (1998). Heat shock factor 1 mediates hemin-induced hsp70 gene transcription in K562 erythroleukemia cells. *The Journal of biological chemistry* **273**, 25466-25471.

- Yu, W., Rao, Q., Wang, M., Tian, Z., Lin, D., Liu, X., and Wang, J. (2006). The Hsp90 inhibitor 17-allylamide-17-demethoxygeldanamycin induces apoptosis and differentiation of Kasumi-1 harboring the Asn822Lys KIT mutation and down-regulates KIT protein level. *Leukemia research* **30**, 575-582.
- Yue, L., Karr, T.L., Nathan, D.F., Swift, H., Srinivasan, S., and Lindquist, S. (1999). Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in Drosophila spermatogenesis. *Genetics* **151**, 1065-1079.
- Yufu, Y., Nishimura, J., and Nawata, H. (1992). High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells. *Leukemia research* **16**, 597-605.
- Yun, B.G., and Matts, R.L. (2005). Hsp90 functions to balance the phosphorylation state of Akt during C2C12 myoblast differentiation. *Cellular signalling* **17**, 1477-1485.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *The Journal of experimental medicine* **193**, 247-254.
- Zhang, D.E., Fujioka, K., Hetherington, C.J., Shapiro, L.H., Chen, H.M., Look, A.T., and Tenen, D.G. (1994). Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Molecular and cellular biology* **14**, 8085-8095.
- Zhao, Y., Conze, D.B., Hanover, J.A., and Ashwell, J.D. (2007). Tumor necrosis factor receptor 2 signaling induces selective c-IAP1-dependent ASK1 ubiquitination and terminates mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of biological chemistry* **282**, 7777-7782.
- Zhong, M., Orosz, A., and Wu, C. (1998). Direct sensing of heat and oxidation by Drosophila heat shock transcription factor. *Molecular cell* **2**, 101-108.
- Zhu, J., and Emerson, S.G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* **21**, 3295-3313.
- Zobel, K., Wang, L., Varfolomeev, E., Franklin, M.C., Elliott, L.O., Wallweber, H.J., Okawa, D.C., Flygare, J.A., Vucic, D., Fairbrother, W.J., et al. (2006). Design, synthesis, and biological activity of a potent Smac mimetic that sensitizes cancer cells to apoptosis by antagonizing IAPs. *ACS chemical biology* **1**, 525-533.
- Zuo, J., Baler, R., Dahl, G., and Voellmy, R. (1994). Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Molecular and cellular biology* **14**, 7557-7568.

## Liste des publications

## Publications originales :

- *c-FLIP cooperates with Dcr2 to inhibit drug-mediated sensitization to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis.*

Morizot M, Mérino D, Lalaoui N, Jacquemin G, Granci V, Lessi E, Lanneau D, Bouyer F, Solary E, Chauffert B, Saas P, Garrido C, Micheau O. **JNCI** (soumis).

- *Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anti-cancer chemotherapy.*

Rérole AL, Gobbo J, Schmitt E, Pais de Barros JP, **Lanneau D**, De Thonel A, Hammann A, Fourmaux E, Deminov O, Micheau O, Lagrost L, Colas P, Kroemer G, Garrido. **Cancer Res** (soumis).

- *HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation.*

De Thonel A °, Vandekerckhove J° , **Lanneau D**, Selvakumar S, Courtois G, Hazoume A, Brunet M, Maurel S, Hammann A, Ribeil JA, Zermati Y, Gabet AS, Boyes J, Solary E, Hermine O\*, Garrido C\*. **Blood** (Sous presse).

- *Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells.*

Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, Boireau W, Rouleau A, Simon B, **Lanneau D**, De Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin F, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Borg C, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. **J Clin Invest.** 2010 Feb;120(2):457-71. doi: 10.1172/JCI40483. Epub 2010 Jan 19.

- *Interaction of heat-shock protein 90 beta isoform (HSP90 beta) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation.*

**Lanneau D**, Didelot C°, Brunet M, Bouchot A, Cartier J, Jacquel A, Ducoroy P, Cathelin S, Decolonne N, Chiosis G, Dubrez-Daloz L, Solary E, Garrido C. **Cell Death Differ.** 2008 May;15(5):859-66. Epub 2008 Feb 1.

°Both authors contributed equally to this work, \* both authors shared the direction of the work.

## Articles de synthèse :

- *Heat shock proteins: cell protection through protein triage.*

**Lanneau D**, Wettstein G, Bonniaud P, Garrido, C. **Scientific World Journal** (sous presse)

- *Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation.*

**Lanneau D**, Brunet M, Frison E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. **J Cell Mol Med**. 2008 Jun;12(3):743-61. Epub 2008 Feb 8.

- *Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins.*

Didelot C, **Lanneau D**, Brunet M, Joli AL, De Thonel A, Chiosis G, Garrido, C. **Curr Med Chem**. 2007;14(27):2839-47.

- *Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27.*

**Lanneau D**, De Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. **Prion**. 2007 Jan;1(1):53-60. Epub 2007 Jan 24.

*Annexe I :*

*Heat shock proteins: cell protection  
through protein triage*

## Heat shock proteins: cell protection through protein triage

David Lanneau<sup>1,2</sup>, Guillaume Wettstein<sup>1,2</sup>, Philippe Bonniaud<sup>1,2,3</sup>, Carmen Garrido<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U866, <sup>2</sup> Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21000, France. <sup>3</sup> CHU Dijon BP1542, Dijon, France.

\*Corresponding author: Carmen Garrido

INSERM U866

Faculty of Medicine & Pharmacy

7, boulevard Jeanne d'Arc

21033 Dijon, France

Phone : 33 3 80 39 32 84 , Fax : 33 3 80 39 34 34

email : [cgarrido@u-bourgogne.fr](mailto:cgarrido@u-bourgogne.fr)

*Running title: Heat shock proteins, proteasome, ubiquitination process, cell stress*

### Abstract

Stress-inducible heat shock proteins (HSPs) are chaperones that catalyze the proper folding of misfolded proteins. The ubiquitin-proteasome system is an error-checking system that directs improperly folded proteins for destruction. A coordinated interaction between the HSPs (renaturation) and the proteasome (degradation) must exist to assure protein quality control mechanisms. Although it remains still unknown how the decision folding versus degradation is taken, many pieces of evidence demonstrate that HSPs interact directly or indirectly with the proteasome assuring quite selectively the proteasomal degradation of certain proteins under stress conditions. In this review we will describe the different data that demonstrate a role for HSP90, HSP70, HSP27 and  $\alpha$ B-crystallin in the partitioning of proteins to either one of these pathways, referred as protein triage.

*Annexe II :*

*Heat Shock Proteins: essential proteins  
for apoptosis regulation*

## Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation

D. Lanneau<sup>a, b</sup>, M. Brunet<sup>a, b</sup>, E. Frisan<sup>c, d, e, f</sup>, E. Solary<sup>a, b</sup>, M. Fontenay<sup>c, d, e, f</sup>,  
C. Garrido<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> Inserm, UMR866, Dijon, France

<sup>b</sup> University of Burgundy, Faculty of Medicine, Dijon, France

<sup>c</sup> Cochin Institute, Hematology Department, Paris

<sup>d</sup> Inserm UMR567, Paris, France

<sup>e</sup> CNRS UMR8104, Paris, France

<sup>f</sup> René Descartes University, Faculty of Medicine, Paris, France

Received: November 16, 2007; Accepted: January 28, 2008

- Introduction
- Main HSPs
- HSPs, cell signalling and apoptosis
  - HSPs' targets in upstream signalling pathways
  - HSPs' targets at the mitochondrial level
  - HSPs' targets at the post-mitochondrial level
  - HSPs and the extrinsic death receptor pathway
- HSPs and alternatives, caspase-independent, apoptosis-like pathways
- What directs the interaction of a HSP with a given apoptotic partner?
- Role of HSPs in haematological malignancies
- HSPs inhibitors: drugs of the future?

### Abstract

Many different external and intrinsic apoptotic stimuli induce the accumulation in the cells of a set of proteins known as stress or heat shock proteins (HSPs). HSPs are conserved proteins present in both prokaryotes and eukaryotes. These proteins play an essential role as molecular chaperones by assisting the correct folding of nascent and stress-accumulated misfolded proteins, and by preventing their aggregation. HSPs have a protective function, that is they allow the cells to survive to otherwise lethal conditions. Various mechanisms have been proposed to account for the cytoprotective functions of HSPs. Several of these proteins have demonstrated to directly interact with components of the cell signalling pathways, for example those of the tightly regulated caspase-dependent programmed cell death machinery, upstream, downstream and at the mitochondrial level. HSPs can also affect caspase-independent apoptosis-like process by interacting with apoptogenic factors such as apoptosis-inducing factor (AIF) or by acting at the lysosome level. This review will describe the different key apoptotic proteins interacting with HSPs and the consequences of these interactions in cell survival, proliferation and apoptotic processes. Our purpose will be illustrated by emerging strategies in targeting these protective proteins to treat haematological malignancies.

**Keywords:** heat shock proteins • apoptosis • caspases • mitochondria • lysosomes • death receptors • cell signalling • haematopoietic malignancies • emerging chemotherapeutic treatments

\*Correspondence to: Carmen GARRIDO, PhD,  
Inserm, UMR866, University of Burgundy,  
Faculty of Medicine, F-21000, Dijon, France.

Tel.: +33 3 80 39 32 84  
Fax: +33 3 80 39 34 34  
E-mail: cgarrido@u-bourgogne.fr

## Introduction

Heat shock proteins (HSPs), also called stress proteins, are highly conserved proteins whose expression is induced by different kinds of stresses [1]. HSPs have strong cytoprotective effects and behave as molecular chaperones for other cellular proteins. Inappropriate activation of signalling pathways occurs during acute or chronic stress as a result of protein misfolding, protein aggregation or disruption of regulatory complexes. The action of chaperones, through their properties in protein homeostasis, is thought to restore the balance. Mammalian HSPs have been classified in two groups according to their size: high molecular weight HSPs and small molecular weight HSPs. The first group includes three major families: HSP90, HSP70 and HSP60. Some of them are expressed constitutively; whereas, expression of the others is induced by stressful conditions. These proteins can be targeted to different subcellular compartments. High molecular weight HSPs are adenosine-5'-triphosphate (ATP)-dependent chaperones and require co-chaperones to modulate their conformation and ATP binding. In contrast, small HSPs, such as HSP27, are ATP-independent chaperones [2]. Among the different HSPs, HSP27 and HSP70 are the most strongly induced after stresses such as anticancer drugs, oxidative stress or irradiation. While hardly expressed in non-transformed cells, both HSP27 and HSP70 are abundantly expressed in cancer cells and therefore have been suggested as important prognostic factors in malignant diseases [1].

Apoptosis is a programmed cell death induced by stimuli-like growth factor withdrawal, hypoxia, DNA damage or cytotoxic drugs. Interestingly, these same stimuli induce the expression and accumulation of HSPs, demonstrating that a death stimulus can elicit a protective response in the cell. Many data accumulated in the last 10 years clearly demonstrated that HSPs have essential anti-apoptotic properties. HSPs associate with key stress signalling and apoptotic molecules, thereby blocking cell death and promoting survival, proliferation or differentiation. In this review, we will discuss the role of the main HSPs (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ ) in the different apoptotic pathways. As defaults in apoptosis and cell proliferation are at the basis of tumour development, the pathophysiological functions of HSPs in haematological malignancies will be developed as an example.

## Main HSPs

Small HSPs are a group of proteins that vary in size from 15 to 30 kD and share sequence homologies and biochemical properties such as phosphorylation and oligomerization. HSP27, probably the most studied member of this family, is an ATP-independent chaperone whose main function is protection against protein aggregation [2]. HSP27 can form oligomers up to 1000 kD. The HSP27 dimer might be the building block for the multimeric complexes. HSP27 oligomerization is a dynamic process that depends on the phosphorylation status of the protein and exposure to stress [3]. Human HSP27 can be phosphorylated at three serine residues and its dephosphorylation enhances oligomerization. This phosphorylation is a reversible process catalysed by the MAPKAP kinases 2 and 3 in response to a variety of stresses including differentiating agents, mitogens, inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), hydrogen peroxide and other oxidants. HSP27 is expressed in many cell types and tissues, at specific stages of development and differentiation [3]. It is a late inducible HSP that accumulates in the cells after several different stresses such as oxidative stress, serum deprivation, anticancer drugs or radiation. In cancer cells, the basal expression of HSP27 is abnormally high and associates with cell resistance to anticancer therapy.

Mammalian HSP60, also called chaperonin, is mostly contained within the mitochondrial matrix, although it can also be detected in extra-mitochondrial sites including the cytosol [4, 5]. HSP60 is a constitutively expressed HSP, although its expression can slightly increase after certain stresses, mainly heat [6]. HSP60 participates in the folding of mitochondrial proteins and facilitates the proteolytic degradation of misfolded or denatured proteins in an ATP-dependent manner. The chaperone function of HSP60 is regulated by HSP10, which binds to HSP60 and regulates its substrate binding and ATPase activity. In the presence of ADP, two HSP10 molecules bind to one HSP60 molecule. HSP60 and HSP10 do not always act as a single functional unit: only newly mitochondria imported proteins are severely affected by inactivation of HSP10 [7].

The HSP70 family constitutes the most conserved and best-studied class of HSPs. It encompasses proteins ranging from 66 to 78 kD that are encoded by a

multi-gene family consisting of at least 11 genes in humans. Some have mainly a cytosolic localization like the major inducible HSP70 (called simply HSP70 or HSP72) or the constitutively expressed HSC70, one is located into the mitochondria (mtHSP70) and one in the endoplasmic reticulum (GRP78/Bip) [8]. Eukaryotic HSP70s contain two functional domains: the NH<sub>2</sub>-terminal ATP-binding domain (ABD) and the COOH-terminal peptide-binding domain (PBD). Under normal conditions, HSP70 proteins function as ATP-dependent molecular chaperones by assisting the folding of newly synthesized polypeptides, the assembly of multi-protein complexes and the transport of proteins across cellular membranes [9]. Proteins like HSP40, CHIP, HOP, HIP, BAG-1 and BAG-3 are HSP70 co-chaperones. They can bind either the PBD or the ABD of HSP70, thereby modulating the chaperone activity of the protein. A range of stimuli, including anticancer agents, rapidly induces the synthesis of stress-inducible HSP70. Gene ablation studies show that inducible HSP70 plays an important role in apoptosis. Mouse embryonic cells lacking the two genes that encode for inducible HSP70, *hsp70.1* and *hsp70.3*, are very sensitive to apoptosis induced by a wide range of lethal stimuli [10]. Further, disruption of the testis specific isoform of HSP70 (*hsp70.2*) results in germ cell apoptosis [11].

Prominent members of the HSP90 family of proteins are HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  [12]. These two HSP90 isoforms are essential for the viability of eukaryotic cells. They are constitutively abundant, make up 1–2% of cytosolic proteins, and can be further stimulated in their expression level by stress. HSP90 associates with a number of signalling proteins including ligand-dependent transcription factors, such as steroid receptor [13], ligand-independent transcription factors, such as MyoD [14], tyrosine kinases, such as v-Src [15], and serine/threonine kinases, such as Raf-1 [16]. The stability of these HSP90-binding proteins, called HSP90 client proteins, is ensured by HSP90. The inhibition of the chaperone induces their degradation by the proteasome. HSP90 binds ATP and undergoes a conformational change upon ATP binding that is needed for its chaperone function. Co-chaperones of HSP90 include Cdc37, p23, Aha1, PP5, HOP and CHIP.

## HSPs, cell signalling and apoptosis

Apoptosis, or programmed cell death, is a type of death essential during embryogenesis and, latter on

in the organism, to assure cell homeostasis. Apoptosis is also a very frequent type of cell death observed after treatment with cytotoxic drugs [17]. Two pathways characterize apoptotic processes, both mediated by a family of cysteine proteases known as caspases: the intrinsic or mitochondrial pathway and the extrinsic or death receptors pathway. The two signal-transducing cascades converge at the level of caspase-3, an effector caspase that leads to the typical morphologic and biochemical changes of the apoptotic cell.

The intrinsic pathway involves the production or activation of pro-apoptotic molecules upon intracellular stress signals. These molecules converge on the mitochondria to trigger the release of mitochondrial apoptogenic molecules under control of the Bcl-2 (B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene) family of proteins. Bcl-2 proteins include anti-apoptotic members such as Bcl-2 and Bcl-xL, multi-domain pro-apoptotic members mainly Bax and Bak [18, 19] and a series of BH3 domain-only pro-apoptotic proteins, such as Bid [20], that function upstream of Bax and Bak [21]. One of the released mitochondrial molecule is cytochrome *c*, which interacts with cytosolic apoptotic protease activation factor-1 (Apaf-1) and pro-caspase-9 to form the apoptosome, the caspase-3 activation complex [22]. Two other mitochondrial proteins, Smac/Diablo and Htra2/Omi, activate apoptosis by neutralizing the inhibitory activity of the inhibitory apoptotic proteins (IAPs) that associate with and inhibit some of the activated caspases [23].

The extrinsic pathway is triggered through plasma membrane proteins of the TNF receptor family known as death receptors and leads to the direct activation of the receptor-proximal caspase-8 or caspase-10 in the death-inducing signalling complex (DISC). Caspase-8 either directly activates the downstream cascade of caspases or cleaves Bid into an active truncated form named tBid that connects the extrinsic to the intrinsic apoptotic pathways through mitochondria permeabilization [24].

HSPs have been shown to block apoptosis by interfering with caspase activation. Overexpression of either HSP27, HSP70, HSP60 or HSP90, inhibits apoptosis and prevents caspase activation in many different cellular models upon a variety of cellular stresses, including accumulation of misfolded proteins, reactive oxygen species (ROS) or DNA damage [1, 25, 26, 27]. On the contrary, depletion of HSP27, HSP60, HSP70 or HSP90, either by anti-sense constructions or siRNA strategies, increases the cells' sensitivity to

apoptotic stimuli [28, 29–31]. In some cellular contexts, HSP70 depletion is sufficient to trigger apoptosis through caspase-3 activation, in the absence of any additional stressful stimulus [32, 33]. Therefore, HSPs are involved, either directly or indirectly, in the modulation of caspase activities. HSPs can block both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways through the interaction with key proteins at three levels: (i) upstream the mitochondria, thereby modulating signalling pathways; (ii) at the mitochondrial level, controlling the release of apoptogenic molecules (iii) and at the post-mitochondrial level, by blocking apoptosis from a later phase than any known survival enhancing drug or protein.

### HSPs' targets in upstream signalling pathways

Growth factors, such as nerve growth factor or platelet-derived growth factor, induce cell survival by activating the phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3-K). Activated PI3-K phosphorylates inositol lipids in the plasma membrane that attract the serine/threonine kinase Akt/PKB, a protein that generates a survival signal in response to growth factor stimulation. Akt targets multiple proteins of the apoptotic machinery [34, 35], including Bad [36] and caspase-9 [37]. HSP27 has been described to have pro-survival effects through its interaction with the protein kinase Akt, an association that is necessary for Akt activation in stressed cells (Fig. 1A). In turn, Akt can phosphorylate HSP27, thus leading to the disruption of HSP27-Akt complexes [38]. HSP27 can also bind to F-actin and prevent the disruption of the cytoskeleton resulting either from heat shock, cytochalasin D or from other stresses. This has been reported to affect mitochondria membrane structure and thereby the release of mitochondrial apoptogenic molecules such as cytochrome c [39]. Recently, we have demonstrated that HSP27 protection to apoptosis induced by etoposide or TNF- $\alpha$  in different cancer cell lines can result from an increase in the activity of the survival transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B is involved in the expression of several anti-apoptotic proteins, such as Bcl-2, Bcl-xL and c-IAPs. HSP27 effect on NF- $\kappa$ B results from an increase in the ubiquitination and proteasomal degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor I- $\kappa$ B $\alpha$  [40] (Fig. 1B). HSP27 also increases the ubiquitination and

proteasomal degradation of the cell cycle protein p27<sup>kip1</sup> under stress conditions. As a consequence, cell proliferation, once the stress conditions are over, is facilitated [41] (Fig. 1B).

HSP70 also inhibits stress-activated kinases, such as apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask1), for example HSP70 down-regulation facilitates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Ask1 activation and subsequent apoptosis in NIH3T3 cells [42] (Fig. 1B). HSP70 also binds to c-Jun N-terminal kinase (JNK), which does not require its ATPase domain [26, 43] and prevents its activation [44] (Fig. 1A). For example, MEF *hsp70.1*<sup>-/-</sup> resist to JNK-mediated apoptosis induced by hyperosmolarity [45]; whereas, AEG3482, a promising novel compound, inhibits JNK activity through increased expression of HSP70 [46]. HSP70 also negatively interferes with p38 kinase activity [47].

HSP70 binds to non-phosphorylated protein kinase C (PKC) *via* the kinase's unphosphorylated carboxyl-terminus, priming the kinase for re-phosphorylation and stabilizing the protein [48]. HSP70 also binds and stabilizes protein kinase B or Akt [48] (Fig. 1A). Interestingly, the endothelial-specific HSPA12B, a distant member of HSP70 family that is required for zebrafish vasculature development, is involved in endothelial cell migration and tube formation through sustaining Akt activity [49]. Thus, HSP70 family members could play a role both in the control of cell survival and differentiation.

HSP70 has also been shown to affect some transcription factors involved in the expression of Bcl-2 proteins. Bcl-2 and Bax are transcriptional targets of the tumour suppressor protein p53: the transcription of Bcl-2 is repressed by p53 whereas that of Bax is induced. As a consequence, p53 expression induces apoptosis in response to DNA damage. Many tumour cells have a mutated p53 and either HSP70 or HSC70 could form stable complexes with this mutant protein. HSP70 could also mask the nuclear localization sequence (NLS) of p53, thus preventing its nuclear import [50, 51].

The role of HSP70 in regulating NF- $\kappa$ B function is more controversial. Cytosolic HSP70 could inhibit NF- $\kappa$ B while plasma membrane-associated HSP70 could activate this transcription factor [52, 53], but both cytosolic and membrane-associated HSP70 usually accumulate together upon stressful stimuli [54]. Anyway, in endothelial cells, elevation of HSP70 to a significant level favours TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis *via* inhibition of the NF- $\kappa$ B survival pathway [55].

HSP70 could block NF- $\kappa$ B activation through inhibition of both I- $\kappa$ B $\alpha$  Kinase (IKK) activation and subsequent degradation of I- $\kappa$ B $\alpha$  [56, 57]. This effect could mediate a function of HSP70 in promoting elimination of cells with damaged DNA. Inhibitors of growth (ING) proteins, which are tumour suppressors whose expression is down-regulated in a variety of human cancers, transduce stress signals after DNA damage and bind histones, thus regulating chromatin structure and p53 activity. These proteins induce HSP70 that in turn promotes TNF- $\alpha$  receptor-mediated apoptosis by binding I- $\kappa$ B $\alpha$  Kinase (IKK) and impairing NF- $\kappa$ B survival signalling [58] (Fig. 1B).

HSP90 regulates the activity and stability of many transcription factors and kinases implicated in apoptosis such as NF- $\kappa$ B, p53, Akt, Raf-1 and JNK [59]. HSP90 can affect NF- $\kappa$ B survival activity *via* the IKK complex, which is composed of two catalytic and one regulatory subunits (Fig. 1B). HSP90 and Cdc37 are also present, association mediated through the kinase domain of the catalytic subunits [60]. HSP90 associates to mutated p53 and stabilizes the protein. In chronic leukaemia cells, inhibition of HSP90 by geldanamycin down-regulates mutated p53 protein while up-regulating wild-type p53 [61]. On the other hand, p53 could repress HSP90 $\alpha$  gene expression in UV irradiated cells [62]. Other transcription factors whose function could be modulated by HSP90 include Her2 and HIF1 $\alpha$  [63, 64].

HSP90 interacts with and stabilizes phosphorylated Akt (Fig. 1A). In turn, phosphorylated Akt can phosphorylate the pro-apoptotic Bcl-2 family protein Bad and the caspase-9 [37], leading to their inactivation and to cell survival. Akt has also been shown to phosphorylate the I- $\kappa$ B kinase, which results in promotion of NF- $\kappa$ B-mediated cell survival [35]. HSP90 also interacts with Raf-1 and the dissociation of this complex results in apoptosis in mast cells [65] and in B-lymphocytes [66]. JNK is another client protein of HSP90. Finally, several cytokines, such as IL-6 and type I and II interferons, could up-regulate HSP90 expression, leading to a survival loop. IL-6 transgenic mice exhibit a transcriptional up-regulation of HSP90 mRNA. The transcription factors STAT3 and CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ), which are under the control of the IL-6 receptor and the MAPK pathway, co-operatively bind and activate the HSP90 $\beta$  promoter [67, 68].

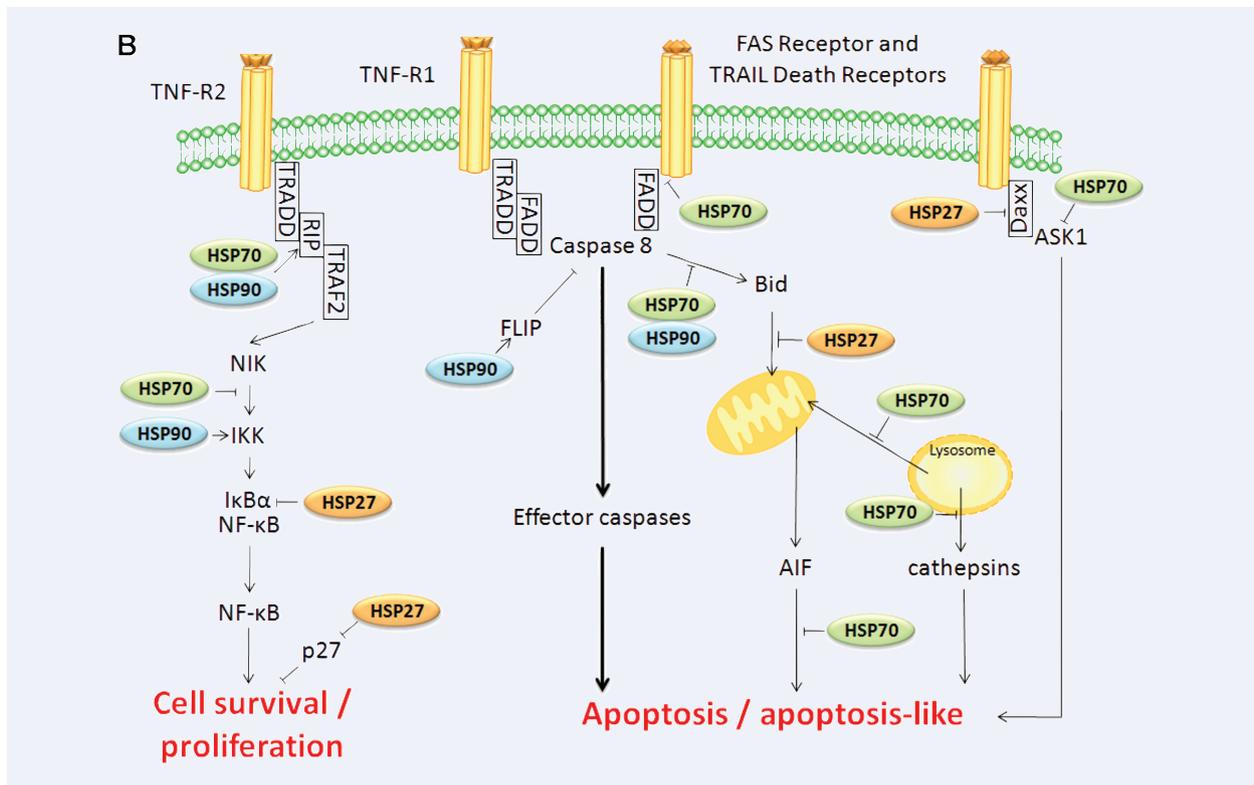
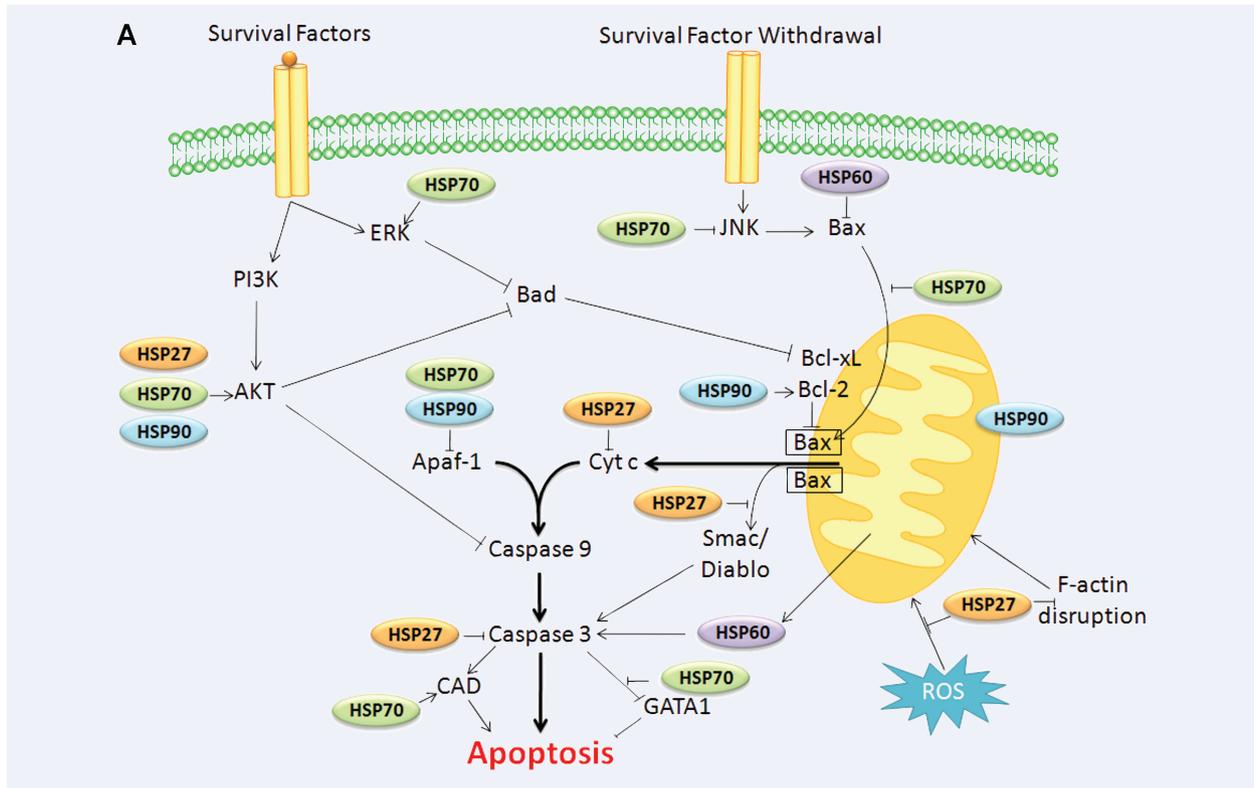
## HSPs' targets at the mitochondrial level

HSP27, in L929 murine fibrosarcoma cells exposed to cytochalasin D or staurosporine, prevents the cytoskeletal disruption and Bid re-distribution to the mitochondria that precedes cytochrome c release [39]. HSP27 has also been shown to inhibit the mitochondrial release of Smac and thereby to confer resistance of multiple myeloma cells to dexamethasone [69] (Fig. 1A).

HSP70, coupled to HSP40, blocks Bax translocation preventing mitochondrial outer membrane permeabilization and thereby inhibiting the release of cytochrome c and that of other mitochondrial apoptogenic molecules such as apoptosis inducing factor (AIF) [70]. This HSP70 function depends on both its chaperone and its ATP hydrolytic domains [71] (Fig. 1A).

Cytosolic HSP60 could form a complex with the pro-apoptotic protein Bax [72]. Under hypoxic conditions HSP60 and Bax dissociate, whereupon Bax translocates to the mitochondria and induces apoptosis. The interaction of HSP60 and Bax may therefore prevent apoptosis. Accordingly, recent studies show that reducing HSP60 expression with antisense oligonucleotides in cardiomyocytes correlated with an increase in Bax and a reduction in Bcl-2 and resulted in induction of apoptosis [73, 74]. In neuroblastoma cells, mitochondrial HSP60 has been shown to protect mitochondrial normal oxidative phosphorylation functions by selectively acting at the complex IV activity level, thereby preserving ATP generation and decreasing cytochrome c release [75] (Fig. 1A).

In tumour cells, HSP90 is present in the mitochondria in combination with its related molecule TRAP-1. This mitochondria-located HSP90 regulates mitochondrial membrane permeabilization and cytochrome c release. Its inhibition by the peptidomimetic Shepherdin (which contains a cell-penetrating sequence) provokes a depolarisation of the mitochondrial membrane and a dose-dependent release of cytochrome c. This might have important consequences in cancer therapy since HSP90 chaperone was identified in tumour cells' mitochondria, not in mitochondria from normal tissues [76]. Some reports describe the formation of a Bcl-2/HSP90 $\beta$  complex that could prevent the release of cytochrome c from mitochondria and caspase-3 activation in mast cells [77]. This effect was recently





**Fig. 1** Schematic representation of HSPs regulatory function in the intrinsic (A), extrinsic and caspase independent pathways to death (B). (A) HSPs can block the mitochondrial intrinsic pathway of apoptosis by interacting with key proteins at three levels: (i) upstream the mitochondria, thereby modulating signalling pathways (HSP70 modulates the activation of stress-activated kinases such as Akt, JNK or ERK); (ii) at the mitochondrial level, controlling the release of cytochrome c (HSP27 by its interaction with the actin, HSP70 or HSP60 with Bax, and HSP90 with Bcl2) and (iii) at the post-mitochondrial level, by blocking apoptosis by their interaction with cytochrome c (HSP27), Apaf-1 (HSP70 or HSP90) or caspase-3 (HSP27). (B) At the death receptors level, HSP70 and HSP90 can interact with RIP favoring cell survival. HSP70 (through TRAIL and FADD recruitment) and HSP90 (through FLIP) block caspase 8 activation. HSP90 and HSP70 inhibit Bid cleavage while HSP27 affects Bid mitochondrial re-distribution. At the caspase-independent pathways level, HSP70 neutralizes AIF and inhibits cathepsins release from lysosomes. AKS1 pathway is affected directly by HSP70 or through Daxx by HSP27. Inhibition:  $\neg$ , activation:  $\rightarrow$ .

confirmed in monocytes/macrophages and dendritic cells treated with an unmethylated CpG motif of bacterial DNA and radicicol can inhibit this association [78] (Fig. 1A).

### HSPs' targets at the post-mitochondrial level

We, and other groups, have demonstrated that HSP27 can prevent the activation of caspases by directly sequestering cytochrome c when released from the mitochondria into the cytosol [79, 80] (Fig. 1A). The heme group of cytochrome c is necessary but not sufficient for this interaction that involves amino acids 51 and 141 of HSP27 and requires dimerization of the stress protein. In human monocytes undergoing spontaneous apoptosis, HSP27 has been shown to associate to and block active caspase-3 [81]. HSP27 can also increase the anti-oxidant defence of cells by decreasing ROS cell content [82] and neutralizes the toxic effects of oxidized proteins [83]. This latter effect may occur more specifically in neuronal cells and involves phosphorylated HSP27 [84]. HSP27 may also affect membrane blebs formation, one of the morphological changes that take place on the late phase of apoptosis. The actin–myosin system has been proposed as a source of contractile force for bleb formation [85] and HSP27 is a cap-binding protein that plays a role in F-actin re-organization [86] (Fig. 1A).

Li *et al.* [87] found HSP70-inhibited apoptosis downstream of the release of cytochrome c and upstream of the activation of caspase-3. Indeed, HSP70 has been demonstrated to directly bind to Apaf-1, thereby preventing the recruitment of procaspase-9 to the apoptosome [88]. The ATPase domain

of HSP70 was described to be necessary for this interaction [89]. In TNF-induced apoptosis, HSP70 does not preclude the activation of caspase-3 but prevents downstream morphological changes that are characteristic of dying cells like activation of phospholipase A2 and changes in nuclear morphology [8]. During the final phases of apoptosis, chromosomal DNA is digested by the DNase CAD (Caspase Activated DNase) following activation by caspase-3. The enzymatic activity and proper folding of CAD has been reported to be regulated by HSP70, its co-chaperone HSP40 and ICAD, the inhibitor of CAD. ICAD recognizes an intermediate folding state conferred by HSP70-HSP40 [90]. It has also been reported in T cell receptor (TCR)-stimulated T cells that HSP70 binds CAD and enhances its activity [91]. Another final target of caspase-3 is the transcription factor GATA-1. We have demonstrated in human primary erythroid precursors that HSP70 can protect GATA-1 from caspase-3 cleavage. As a consequence, erythroid cells do not die by apoptosis but instead differentiate [92] (Fig. 1A).

HSP90 could negatively affect Apaf-1 function in apoptosis. HSP90 directly binds Apaf-1 and inhibits its oligomerization and further recruitment of procaspase-9 [93]. Vimentin, a major component of intermediate filament, is degraded in response to apoptotic inducers. The cleavage of vimentin by caspases probably results in disrupting of its filamentous structure which may facilitate nuclear condensation and subsequent fragmentation. HSP90 binds to vimentin and protects it from apoptotic cleavage [94] (Fig. 1A).

A pro-apoptotic role for HSP60 and HSP10 has been demonstrated by two independent groups. In both HeLa and Jurkat cells, activation of caspase-3 by camptothecin or staurosporine was observed to occur simultaneously with HSP60 and HSP10

release from the mitochondria (Fig. 1). The authors demonstrated *in vivo* and *in vitro* that HSP60 and HSP10 associated to procaspase-3 and favoured its activation by cytochrome c in an ATP-dependent manner, suggesting that the chaperone function of HSP60 was involved in this process [95, 96] (Fig. 1A).

## HSPs and the extrinsic death receptor pathway

HSP27 inhibits Fas-induced apoptosis [97]. The phosphorylated form of HSP27 directly interacts with Daxx. This latter protein connects Fas signalling to the protein kinase Ask1 that mediates a caspase-independent cell death [98] (Fig. 1B).

HSP70 inhibits TNF- $\alpha$ -induced cell death and this protective effect is lost in Bid homozygous-deleted mouse embryonic fibroblast (MEF) cells [99]. HSP70 can block the cleavage of Bid by activated caspase-8 [99]. Exposure of haematopoietic cells to TNF- $\alpha$  induces the activity of the pro-apoptotic double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). An inhibitor of PKR is the Fanconi anaemia complementation group C gene product (FANCC). HSP70 interacts with the FANCC protein *via* its ATPase domain and, together with HSP40, inhibits TNF-induced apoptosis through the ternary complex HSP70, FANCC and PKR [100, 101].

In human chronic myeloid leukaemia (CML) cells, HSP70 can mediate Bcr-Abl-induced resistance to TNF- $\alpha$ -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by preventing the formation of DISCs involving DR4 and DR5 [102]. The role of HSP70 in Fas-mediated apoptosis is more controversial with opposite effects that depend on the cell context [103, 104] (Fig. 1B).

A key regulator in apoptosis induced by TRAIL is FLIP. It has been shown in glioma cells that HSP90 $\alpha$  associates with FLIP(S) in a manner dependent on the ATP-binding NH<sub>2</sub>-terminal domain of the chaperone. Following TRAIL exposure, HSP90 $\alpha$  and its client protein FLIP(S) are recruited to the DISC. HSP90 $\alpha$  depletion blocked the recruitment of FLIP(S) to the DISC and thereby sensitized resistant glioma cells to TRAIL-induced apoptosis [105]. HSP90 has also been shown to interact with and stabilize the Receptor Interacting protein (RIP). Upon ligation of tumor necrosis factor receptor (TNFR)-1, receptor interacting protein (RIP)-1 is recruited to the receptor and promotes the activation of NF- $\kappa$ B and

JNK. Degradation of RIP-1 in the absence of HSP90 precludes activation of NF- $\kappa$ B mediated by TNF- $\alpha$  and sensitizes cells to apoptosis [106]. Finally, in NIH3T3 fibroblasts, HSP90 has been shown to suppress TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by directly associating to Bid, thereby preventing its cleavage [107] (Fig. 1B).

## HSPs and alternatives, caspase-independent, apoptosis-like pathways

Upon activation of the intrinsic pathway not only cytochrome c is released from the mitochondria. AIF and endonuclease G (EndoG) are also released upon an apoptotic stimulus. These two mitochondria intermembrane proteins translocate to the nucleus and triggers caspase-independent nuclear changes [108].

HSP70 has been shown to prevent cell death in conditions in which caspase activation does not occur, due to the addition of exogenous caspase inhibitors [109], or in cells in which Apaf-1 or caspase-9 were genetically inactivated [110], indicating that the cytochrome c/Apaf-1/caspase was not the sole pathway of the anti-apoptotic action of HSP70. Indeed, HSP70 directly binds to AIF and inhibits AIF-induced chromatin condensation. HSP70 neutralizes the apoptogenic effects of AIF in cell-free systems, in intact cells microinjected with recombinant HSP70 and/or AIF protein, as well as in cells transiently transfected with AIF cDNA. Of note, endogenous levels of HSP70 seem to be sufficiently high to control AIF-mediated apoptosis since down-regulation of HSP70 by an anti-sense construct sensitized the cells to serum withdrawal and AIF [110]. This protective effect of HSP70 might be physiologically relevant as AIF sequestration by HSP70 reduces neonatal hypoxic/ischaemic brain injury [111]. In addition, HSP70 inhibits erythroblast apoptosis by blocking AIF nuclear import [112]. HSP70 associates also with EndoG to prevent DNA fragmentation [113], but this association could involve AIF as a molecular bridge (Fig. 1B).

Lysosomes also functions as integrators of cell death signals in many different cell death scenarios [114]. Lysosomal proteases, of which the most studied are the cathepsins, translocate from the lysosomal lumen to the cytosol in response to a wide variety of apoptotic stimuli, such as TNF- $\alpha$  [115, 116], Fas [117], microtubule stabilizing agents [118], staurosporine [119], p53 activation [120], oxidative stress

[117, 121], growth factor deprivation [117] and lysosomotropic agents [121, 122]. Upon release to the cytosol, cathepsins can trigger mitochondrial outer membrane permeabilization [115, 119, 120, 122, 123]. Cathepsins release can also ensue an apoptotic morphology that is independent of the mitochondria release of cytochrome c or AIF [116, 124]. HSP70 is found in the endolysosomal membranes of many tumours and stressed cells where it inhibits the release of lysosomal cathepsins into the cytosol [125, 126]. Lysosomes positive for HSP70 display an increased size and resistance against chemical and physical membrane destabilization [125] (Fig. 1B).

HSP90 $\beta$  is involved in signalling prolactin-induced apoptosis during spermatogenesis. Prolactin receptor is a client protein of HSP90 $\beta$  and its inhibition promotes spermatogonial apoptosis [127] by a still unknown mechanism.

## What directs the interaction of a HSP with a given apoptotic partner?

HSPs are strong cytoprotective proteins that can associate to multiple apoptotic partners and thereby can block apoptosis at different levels. The cellular survival needs, which depend on the experimental conditions (*i.e.* apoptotic stimulus and experimental model), might dictate which are the apoptotic targets that must be inactivated by the chaperones. HSPs post-translational modifications and/or their presence in a given cellular compartment are important variables in determining the interaction of a HSP with a given apoptotic partner. In this way HSP27 seems to modulate its different protective properties by changing its oligomerization pattern, which is regulated by the phosphorylation status of the protein. We have demonstrated *in vitro* and *in vivo* that HSP27-mediated inhibition of caspase-dependent apoptosis involved large non-phosphorylated oligomers of HSP27 [128]. In contrast, the phosphorylated form of the protein directly interacts with Daxx [98]. These results suggest that the oligomerization/phosphorylation of the protein alters HSP27 conformation and hence determine its capacity to interact with different apoptotic proteins. The essential HSP27 anti-apoptotic function seems to take place in the cytosol [79]. Accordingly, leptomycin B,

which is an inhibitor of the nuclear export of proteins, triggers nuclear accumulation of HSP27, which prevents its protective functions [129].

In contrast to HSP27, little is known about HSP70 post-translational modifications. HSP70 is one of the most powerful anti-apoptotic proteins since it blocks almost all identified cell death pathways. Interaction of HSP70 with a given partner may be determined by HSP70 co-chaperones and its cellular localization. For example, the presence of HSP70 in the lysosomal membrane is necessary for inhibiting the lysosomal pathway to death. During red blood cell formation, HSP70 migrates into the nucleus where it interacts with the transcription factor GATA-1 to prevent its cleavage by caspase-3, whose activation is required for the erythroid differentiation process. Thereby, the migration of HSP70 in the nucleus is essential to determine whether an erythroblast is going to die by apoptosis or to differentiate into a red blood cell [92]. In tumour cells, HSP70 expression at the plasma membrane facilitates their clearance by the immune system. Membranary HSP70 facilitates granzyme B penetration in a perforin-independent way and ensures cytotoxic T lymphocytes killing through FasL/Fas-mediated contact [54, 130].

HSP90 anti-apoptotic function can be explained because some of its client proteins, to whom HSP90 assure their stability, are anti-apoptotic proteins. The first explanation of why HSP90 associates to a given partner can be found in the different isoforms of HSP90, the  $\alpha$  and  $\beta$  that most studies unfortunately do not differentiate. Evidence accumulates that these isoforms may have different functions in the cell. For instance, HSP90 $\beta$  isoform has a function in cell differentiation that the  $\alpha$  isoform does not have [131]. The  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms might also have a different function in the regulation of apoptosis. Post-translational modifications of HSP90 could also account for the differential affinity of the chaperone for its multiple partners. HSP90 $\alpha$  can be acetylated on its lysine 294, which inhibits its binding to several client proteins. HSP90 $\beta$  can be phosphorylated on Ser 254, which favours tumour regression and tumour immunogenicity [132]. However, how the acetylation or phosphorylation of HSP90 isoforms affect their interaction with different protein partners, and how these events affect their anti-apoptotic functions remain to be determined. HSP90 is the only chaperone targeted in cancer therapy to sensitize tumour cells to chemotherapy-induced death. Geldanamycin derivatives [133]

bind the ATP pocket of HSP90 to inhibit their chaperone function. In turn, HSP90 'client' proteins are not anymore stabilized by HSP90 and are degraded by the proteasome. These inhibitors equally block HSP90  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms which precludes their experimental use to determine the relative contribution of each of them in apoptosis control.

HSP60 role in apoptosis is rather contradictory. Overexpression of HSP60 and/or HSP10 increases the survival rate of cardiac myocytes undergoing ischaemia/reperfusion injury [134]; whereas, reduction in HSP60 level is sufficient to precipitate apoptosis in myocytes [73]. Nevertheless, expression of HSP60 was identified as a good prognostic indicator in human oesophageal squamous cell carcinoma, reflecting the ambiguous role of this chaperone in tumour cell death process [135]. HSP60 can be pro-apoptotic by facilitating caspase-3 activation or anti-apoptotic through inhibiting Bax. These controversial results might be re-counciled on the basis on HSP60 localization and experimental variables. Cytosolic HSP60 might have a protective function whereas mitochondrial HSP60, released to the cytosol upon an apoptotic stimulus (in other words, in cells already committed to apoptosis and that can not be anymore recuperated), facilitates cell death. Thus, interaction of cytosolic HSP60 with active caspase-3 could dictate its effect on cell death [136]. HSP60 can also be found in the plasma membrane where its expression correlates with increased apoptosis in adult cardiac myocytes [137]. These opposite HSP60 chaperone functions and/or its cellular localization could be regulated by the phosphorylation/dephosphorylation of the protein [5].

## Role of HSPs in haematological malignancies

In contrast to normal, non-transformed, cells and tissues where the expression of stress-inducible HSPs is, at the basal level, rather low or non-existent, HSPs are abundantly expressed in most cancer cells, in particular in several haematological malignancies, including lymphoid diseases and chronic or acute myeloid leukaemias. Overexpression of HSP27, HSP70 and HSP90 correlates with a poor prognosis in acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes [138, 139]. In acute myeloid leukaemia

cells, HSP27 prevents drug-induced apoptosis [140]. In multiple myeloma cells, down-regulation of HSP27 can restore the apoptotic response to dexamethasone through activation of the intrinsic, caspase-dependent pathway [69].

Importantly, up-regulated HSP70 or HSP90 could stimulate cell proliferation through the control of tyrosine kinase functions. In CML cells, Bcr-Abl tyrosine kinase activity results in the phosphorylation and activation of Akt, which inactivates Bad, caspase-9 and FOXO3, and in the phosphorylation and DNA-binding activity of STAT5, which results in increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL. Increased expression of HSP70 results in up-regulation of STAT5 level and activity. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase activity with imatinib or inhibition of PI-3K activity with wortmannin, both result in a decreased HSP70 expression and a down-regulation of STAT5 activity [102]. Thus, uncontrolled cell signalling may result in the transcriptional up-regulation of HSP70.

Targeting HSP90 also provides evidence for the role of HSP90 in the control of haematopoietic malignant cell apoptosis, survival and proliferation. In mantle cell lymphomas, the HSP90 inhibitor, 17-allylamino-demethoxygeldanamycin (17-AAG), induces cell cycle arrest and apoptosis by activating caspase-9 [141]. In HTLV1-associated adult T cell leukaemias, HSP90 inhibition abrogates cell cycle progression and induces apoptosis through inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway [142]. In malignant mast cells, 17-AAG inhibits the constitutive activity of the receptor tyrosine kinase c-kit and downstream signalling molecules Akt and STAT3 [143]. In acute myeloid leukaemia cell lines, 17-AAG reduces the level of the constitutively activated tyrosine kinase FLT-3 with internal tandem repeat mutation and downstream STAT5 activity [144]. HSP90 also functions as a chaperone for ZAP-70 (Zeta-associated of 70 kD), a protein that is abnormally expressed in patients with aggressive chronic lymphocytic leukaemia (CLL), and its inhibition leads to ZAP-70 degradation and leukaemic cell death [145, 146].

Recently, a novel HSP90 inhibitor, IPI-504, was tested in mice with Bcr-Abl leukaemias that resist to the tyrosine kinase inhibitor imatinib because of a T315I mutation in the fusion gene. The combination of IPI-405 and imatinib increases mice survival and appears to eliminate leukaemic stem cells [147]. A combination of 17-AAG and cytarabine also renders acute myeloid leukaemia cells more sensitive to death [148].

In multiple myeloma, HSP90 demonstrated dual functions. First, inhibition of Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  with siRNA or 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), an analogue of 17-AAG, both induce apoptosis in IL6-independent and dependent myeloma cell lines as well as in primary CD138<sup>+</sup> multiple myeloma cells co-cultured with their bone marrow microenvironment. 17-DMAG attenuates the level of STAT3 and phospho-extracellular signal regulated kinase (ERK), which inhibits cell survival [149]. Secondly, the anti-leukaemic activity of bortezomib, a proteasome inhibitor, in multiple myeloma was shown to involve the exposure of HSP90 at the cell surface of dead cells, which facilitates contacts with dendritic cells and stimulates the antitumour immune response. In such a situation, the combined use of bortezomib and a HSP90 inhibitor abrogates myeloma cell immunogenicity and could be deleterious [150].

The expression level of HSPs may not be the only parameter that modulates their oncogenic function. Histone deacetylase 6 (HDAC6) controls HSP90 deacetylation [151] and inhibitors of HDAC (HDACi) capable of inhibiting HDAC6 induce the hyperacetylation of HSP90. In turn, proteins such as Akt, Bcr-Abl or Flt-3 could be degraded by the proteasome in acute and CML cells [152, 153]. For example, siRNA-mediated knockdown of HDAC6 in Bcr-Abl-positive, K562 leukaemic cells results in HSP90 hyperacetylation, loss of its chaperone function and degradation of Bcr-Abl, Akt and c-Raf. However, the effects of this strategy on tumour cell growth and survival remains limited [154], suggesting that a combination of HDAC inhibitors with specific tyrosine kinase inhibitors might be necessary. A combination of 17-AAG and HDAC6i (LBH589) is also efficient in inducing cell death in various leukaemic cell lines and primary leukaemic cells through functional inhibition and degradation of HSP90, leading to proteasomal degradation of client Bcr-Abl and/or Flt-3 [155]. In leukaemic cells in response to the antitumour drug alkyl-lysophospholipid analogue edelfosine, JNK and HSP90 are recruited in lipid rafts. Inhibition of HSP90 decreases edelfosine-induced JNK activation which is Ask1 independent [156].

## **HSPs inhibitors: drugs of the future?**

Because of their anti-apoptotic and tumourigenic properties, HSPs are interesting targets in cancer

therapy. The receptor tyrosine kinase FLT3 involved in acute myeloid leukaemias, the chimeric proteins Bcr-Abl and NPM-ALK involved in CML and anaplastic large-cell lymphomas respectively, are client proteins for HSP90 [157, 158]. HSP90 inhibitory agents, currently under clinical investigations, are therefore promising drugs in these diseases. These agents include natural products such as benzoquinone ansamycins (such as the geldamycin derivatives 17-AAG and 17-DMAG, already in phase II clinical trials) and many emerging synthetic compounds. Interestingly, HSP90 inhibitors seem specific for cancer cells. The molecular basis for the selective antitumour activity of the HSP90 inhibitors might be the conformation of the HSP90 complex, as HSP90 isolated from tumour cells has a 20 to 200 times higher binding affinity for the inhibitors than HSP90 isolated from normal cells [159–161].

Studies in Bcr-Abl human leukaemia cells suggest that HSP70 is also a promising therapeutic target for reversing drug resistance, probably due to its ability to inhibit death pathways both upstream and downstream of the mitochondrial signalling [102, 162]. An inhibitor of HSP70 would be very useful alone and in combination with other drugs since most of them, including the already mentioned inhibitors of HSP90, enhance HSP70 expression in malignant cells, which it is believed to reduce the drug efficacy [163]. Unfortunately, thus far, no small or soluble molecule that would selectively inhibit HSP70 is available. Some inhibitors of the heat shock response, acting at the level of the heat shock transcription factor 1 (HSF1) to block the transcription of HSPs genes, have been experimentally tested. These include the flavonoid quercetin [30] and the diterpene triepoxide, triptolide [164] but these molecules are rather unspecific. We, and others, have extensively reported that HSP70 anti-sense constructs demonstrated chemosensitizing properties and even killed cancer cell lines in the absence of additional stimulus [32, 165]. The cytotoxic effect of HSP70 down-modulation is particularly strong in transformed cells whereas the targeted protein is undetectable in normal cells [10]. The selective efficacy of HSP70 depletion could be related to the constitutively stressed phenotype of tumour cells, as compared to normal cells, with an enhanced dependency on the cytoprotective action of HSP70 [33, 166].

We have recently demonstrated that rationally engineered decoy targets of HSP70 derived from the

protein AIF, called ADD70 (for AIF Derived Decoy for HSP70), can sensitize cancer cells to apoptosis induction by neutralizing HSP70 function. These all peptides carry the AIF region from aa 150 to aa 228, previously defined as required for HSP70 binding [167]. These constructs bind to HSP70 but lack an apoptotic function. Experiments using different malignant cell types demonstrate that some of these AIF derivatives inhibitors of HSP70 strongly increased the sensitivity of cancer cells to chemotherapy *in vitro*. This effect was merely related to their ability to neutralize endogenous HSP70 since this pro-apoptotic activity was lost in HSP70-negative cells [10]. *In vivo*, in a syngeneic rat colon cancer cell model and in a syngeneic mouse melanoma model (B16F10), ADD70 decreased the size of the tumours or at least delayed in their growth. In addition, ADD70 sensitized both the rat colon cancer cells and the mouse melanoma cells to the chemotherapeutic agent cisplatin. This ADD70 antitumorigenic effect was not observed in immunodeficient animals and were associated with an increase in tumour-infiltrating cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells [163]. Therefore a positive strategy aimed at interfering with HSP70, as opposed to negative strategies based on anti-sense constructs or RNA interference, is feasible for chemosensitization, at least *in vitro* and *in vivo* in experimental models. Future will tell whether these peptides can be permeated (*i.e.* by its fusion with a membrane translocation domain) and directly injected in the tumour. That could open new perspectives in their use as local chemosensitizing agents in HSP70-expressing human tumours.

HSP27 is undoubtedly also an interesting target in cancer therapy, as HSP27 depletion experiments in cancer cells demonstrate [28, 29, 168]. However, the structural complexity of this molecule makes difficult the search for therapeutic molecules that could neutralize it [3].

Although the repercussions at the long term of HSPs inhibition deserves to be evaluated (for instance the genome stability for HSP90 [169]) or the evolution of neuronal degenerative diseases for HSP27 [84, 170], they might be relevant drugs in the future, not only in malignant diseases but also in other pathologies in which a high level of HSPs is observed. For example, our unpublished results show that HSP70 and HSP90 are abundant in the extracellular medium of animals that develop a graft *versus* host disease and demonstrate an immuno-

genic function. These HSPs could be a *danger signal* that increases the T cell-dependent immune response, which would open a new future for HSPs inhibitors in the setting of haematopoietic stem cell transplantation.

## Acknowledgements

Our work is supported by the INSERM and grants from the 'Ligue Nationale Contre le Cancer' (and its Nièvre committee) and 'Conseil Régional de Bourgogne'. DL and MB are recipients of a post-doctoral fellowship from the 'Ministère de la Education Nationale'.

## References

1. **Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G.** Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*. 2006; 5: 2592–601.
2. **Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C.** Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 304: 505–12.
3. **Garrido C.** Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ*. 2002; 9: 483–5.
4. **Ellis RJ.** Molecular chaperones: pathways and networks. *Curr Biol*. 1999; 9: R137–9.
5. **Khan IU, Wallin R, Gupta RS, Kammer GM.** Protein kinase A-catalyzed phosphorylation of heat shock protein 60 chaperone regulates its attachment to histone 2B in the T lymphocyte plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 10425–30.
6. **Vargas-Parada L, Solis CF, Lacleste JP.** Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology*. 2001; 122: 583–8.
7. **Bukau B, Horwich AL.** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 1998; 92: 351–66.
8. **Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M.** Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J*. 1998; 17: 6124–34.
9. **Shi Y, Thomas JO.** The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol*. 1992; 12: 2186–92.
10. **Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, Cande C, Hammann A, Morales MC, Hunt CR, Dix DJ, Kroemer RT, Giordanetto F, Jaattela M, Penninger JM, Pance A, Kroemer G, Garrido C.** Chemo-

- sensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res.* 2003; 63: 8233–40.
11. **Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM.** Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 3264–8.
  12. **Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF.** Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 2004; 562: 11–5.
  13. **Nathan DF, Lindquist S.** Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 3917–25.
  14. **Shaknovich R, Shue G, Kohtz DS.** Conformational activation of a basic helix-loop-helix protein (MyoD1) by the C-terminal region of murine HSP90 (HSP84). *Mol Cell Biol.* 1992; 12: 5059–68.
  15. **Hartson SD, Matts RL.** Association of Hsp90 with cellular Src-family kinases in a cell-free system correlates with altered kinase structure and function. *Biochemistry.* 1994; 33: 8912–20.
  16. **Wartmann M, Davis RJ.** The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem.* 1994; 269: 6695–701.
  17. **Solary E, Droin N, Bettaieb A, Corcos L, Dimanche-Boitrel MT, Garrido C.** Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia.* 2000; 14: 1833–49.
  18. **Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ.** Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001; 292: 727–30.
  19. **Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB.** BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 2001; 15: 1481–6.
  20. **Breckenridge DG, Xue D.** Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16: 647–52.
  21. **Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ.** BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 2001; 8: 705–11.
  22. **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997; 91: 479–89.
  23. **Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X.** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000; 102: 33–42.
  24. **Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998; 94: 481–90.
  25. **Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E.** HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J.* 1999; 13: 2061–70.
  26. **Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B.** The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 7146–59.
  27. **Mosser DD, Morimoto RI.** Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene.* 2004; 23: 2907–18.
  28. **Kamada M, So A, Muramaki M, Rocchi P, Beraldi E, Gleave M.** Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 299–308.
  29. **Choi DH, Ha JS, Lee WH, Song JK, Kim GY, Park JH, Cha HJ, Lee BJ, Park JW.** Heat shock protein 27 is associated with irinotecan resistance in human colorectal cancer cells. *FEBS Lett.* 2007; 581: 1649–56.
  30. **Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, Lerch MM, Saluja A.** Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2007; 67: 616–25.
  31. **Compton SA, Elmore LW, Haydu K, Jackson-Cook CK, Holt SE.** Induction of nitric oxide synthase-dependent telomere shortening after functional inhibition of Hsp90 in human tumor cells. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 1452–62.
  32. **Gurbuxani S, Bruey JM, Fromentin A, Larmonier N, Parcellier A, Jaattela M, Martin F, Solary E, Garrido C.** Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene.* 2001; 20: 7478–85.
  33. **Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Eiling F, Jaattela M.** Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 7871–6.
  34. **Biggs WH 3<sup>rd</sup>, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC.** Protein kinase B/Akt-mediated

- phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 7421–6.
35. **Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB.** NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999; 401: 82–5.
  36. **Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME.** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997; 91: 231–41.
  37. **Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC.** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998; 282: 1318–21.
  38. **Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB.** Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem*. 2003; 278: 27828–35.
  39. **Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S, Arrigo AP.** Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 816–34.
  40. **Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C.** HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 5790–802.
  41. **Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A, Nakayama K, Nakayama KI, Khochbin S, Solary E, Garrido C.** HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J*. 2006; 20: 1179–81.
  42. **Park HS, Cho SG, Kim CK, Hwang HS, Noh KT, Kim MS, Huh SH, Kim MJ, Ryoo K, Kim EK, Kang WJ, Lee JS, Seo JS, Ko YG, Kim S, Choi EJ.** Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 7721–30.
  43. **Meriin AB, Yaglom JA, Gabai VL, Zon L, Ganiatsas S, Mosser DD, Sherman MY.** Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 2547–55.
  44. **Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ.** Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J*. 2001; 20: 446–56.
  45. **Lee JS, Lee JJ, Seo JS.** HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005; 280: 6634–41.
  46. **Salehi AH, Morris SJ, Ho WC, Dickson KM, Doucet G, Milutinovic S, Durkin J, Gillard JW, Barker PA, AEG3482** is an antiapoptotic compound that inhibits Jun kinase activity and cell death through induced expression of heat shock protein 70. *Chem Biol*. 2006; 13: 213–23.
  47. **Gabai VL, Yaglom JA, Volloch V, Meriin AB, Force T, Koutroumanis M, Massie B, Mosser DD, Sherman MY.** Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Mol Cell Biol*. 2000; 20: 6826–36.
  48. **Gao T, Newton AC.** The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem*. 2002; 277: 31585–92.
  49. **Hu G, Tang J, Zhang B, Lin Y, Hanai J, Galloway J, Bedell V, Bahary N, Han Z, Ramchandran R, Thisse B, Thisse C, Zon LI, Sukhatme VP.** A novel endothelial-specific heat shock protein HspA12B is required in both zebrafish development and endothelial functions in vitro. *J Cell Sci*. 2006; 119: 4117–26.
  50. **Akakura S, Yoshida M, Yoneda Y, Horinouchi S.** A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Val-135). *J Biol Chem*. 2001; 276: 14649–57.
  51. **Zylicz M, King FW, Wawrzynow A.** Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J*. 2001; 20: 4634–8.
  52. **Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK.** Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002; 277: 15028–34.
  53. **Mijatovic T, Mathieu V, Gaussin JF, De Neve N, Ribaucour F, Van Quaquebeke E, Dumont P, Darro F, Kiss R.** Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia*. 2006; 8: 402–12.
  54. **Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C.** Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*. 2007; 81: 15–27.
  55. **Ran R, Lu A, Zhang L, Tang Y, Zhu H, Xu H, Feng Y, Han C, Zhou G, Rigby AC, Sharp FR.** Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev*. 2004; 18: 1466–81.
  56. **Shanley TP, Ryan MA, Eaves-Pyles T, Wong HR.** Heat shock inhibits phosphorylation of I-kappaBalpha. *Shock*. 2000; 14: 447–50.
  57. **Yoo CG, Lee S, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS.** Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I kappa B alpha through preventing I kappa B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Immunol*. 2000; 164: 5416–23.

58. **Feng X, Bonni S, Riabowol K.** HSP70 induction by ING proteins sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 9244–55.
59. **Zhang H, Burrows F.** Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J Mol Med.* 2004; 82: 488–99.
60. **Chen G, Cao P, Goeddel DV.** TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell.* 2002; 9: 401–10.
61. **Lin K, Rockliffe N, Johnson GG, Sherrington PD, Pettitt AR.** Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene.* 2008; 27: 2445–55.
62. **Zhang Y, Wang JS, Chen LL, Cheng XK, Heng FY, Wu NH, Shen YF.** Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 42545–51.
63. **Munster PN, Marchion DC, Basso AD, Rosen N.** Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer Res.* 2002; 62: 3132–7.
64. **Hur E, Kim HH, Choi SM, Kim JH, Yim S, Kwon HJ, Choi Y, Kim DK, Lee MO, Park H.** Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1alpha/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Mol Pharmacol.* 2002; 62: 975–82.
65. **Cissel DS, Beaven MA.** Disruption of Raf-1/heat shock protein 90 complex and Raf signaling by dexamethasone in mast cells. *J Biol Chem.* 2000; 275: 7066–70.
66. **Piatelli MJ, Doughty C, Chiles TC.** Requirement for a hsp90 chaperone-dependent MEK1/2-ERK pathway for B cell antigen receptor-induced cyclin D2 expression in mature B lymphocytes. *J Biol Chem.* 2002; 277: 12144–50.
67. **Sato N, Yamamoto T, Sekine Y, Yumioka T, Junicho A, Fuse H, Matsuda T.** Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 300: 847–52.
68. **Kalvakolanu DV, Roy SK.** CCAAT/enhancer binding proteins and interferon signaling pathways. *J Interferon Cytokine Res.* 2005; 25: 757–69.
69. **Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Catley L, Tai YT, Hayashi T, Shringarpure R, Burger R, Munshi N, Ohtake Y, Saxena S, Anderson KC.** Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood.* 2003; 102: 3379–86.
70. **Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD.** Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.* 2005; 280: 38729–39.
71. **Ruchalski K, Mao H, Li Z, Wang Z, Gillers S, Wang Y, Mosser DD, Gabai V, Schwartz JH, Borkan SC.** Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *J Biol Chem.* 2006; 281: 7873–80.
72. **Gupta S, Knowlton AA.** Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation.* 2002; 106: 2727–33.
73. **Kirchhoff SR, Gupta S, Knowlton AA.** Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation.* 2002; 105: 2899–904.
74. **Shan YX, Liu TJ, Su HF, Samsamshariat A, Mestril R, Wang PH.** Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35: 1135–43.
75. **Veereshwarayya V, Kumar P, Rosen KM, Mestril R, Querfurth HW.** Differential effects of mitochondrial heat shock protein 60 and related molecular chaperones to prevent intracellular beta-amyloid-induced inhibition of complex IV and limit apoptosis. *J Biol Chem.* 2006; 281: 29468–78.
76. **Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC.** Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific hsp90 chaperone network. *Cell.* 2007; 131: 257–70.
77. **Cohen-Saidon C, Carmi I, Keren A, Razin E.** Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90beta. *Blood.* 2006; 107: 1413–20.
78. **Kuo CC, Liang CM, Lai CY, Liang SM.** Involvement of heat shock protein (Hsp)90 beta but not Hsp90 alpha in antiapoptotic effect of CpG-B oligodeoxynucleotide. *J Immunol.* 2007; 178: 6100–8.
79. **Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C.** Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 645–52.
80. **Samali A, Robertson JD, Peterson E, Manero F, van Zeijl L, Paul C, Cotgreave IA, Arrigo AP, Orrenius S.** Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperones.* 2001; 6: 49–58.
81. **Voss OH, Batra S, Kolattukudy SJ, Gonzalez-Mejia ME, Smith JB, Doseff AI.** Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation. *J Biol Chem.* 2007; 282: 25088–99.
82. **Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP.** Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human

- alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J.* 1996; 15: 2695–706.
83. **Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M.** Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999; 274: 18947–56.
  84. **Wytenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo AP, Rubinsztein DC.** Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet.* 2002; 11: 1137–51.
  85. **Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF.** Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 339–45.
  86. **Pivovarova AV, Chebotareva NA, Chernik IS, Gusev NB, Levitsky DI.** Small heat shock protein Hsp27 prevents heat-induced aggregation of F-actin by forming soluble complexes with denatured actin. *FEBS J.* 2007; 274: 5937–48.
  87. **Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS.** Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 2000; 275: 25665–71.
  88. **Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR.** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 469–75.
  89. **Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES.** Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 476–83.
  90. **Sakahira H, Nagata S.** Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem.* 2002; 277: 3364–70.
  91. **Liu QL, Kishi H, Ohtsuka K, Muraguchi A.** Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells. *Blood.* 2003; 102: 1788–96.
  92. **Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Moura IC, Zeuner A, Kirkegaard-Sorensen T, Varet B, Solary E, Garrido C, Hermine O.** Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 2007; 445: 102–5.
  93. **Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S.** Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 2000; 19: 4310–22.
  94. **Zhang MH, Lee JS, Kim HJ, Jin DI, Kim JI, Lee KJ, Seo JS.** HSP90 protects apoptotic cleavage of vimentin in geldanamycin-induced apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2006; 281: 111–21.
  95. **Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S.** Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.* 1999; 18: 2040–8.
  96. **Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassidy R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, Nicholson DW.** Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J.* 1999; 18: 2049–56.
  97. **Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP.** Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem.* 1996; 271: 16510–4.
  98. **Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J.** Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 7602–12.
  99. **Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY.** Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 3415–24.
  100. **Pang Q, Keeble W, Christianson TA, Faulkner GR, Bagby GC.** FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *EMBO J.* 2001; 20: 4478–89.
  101. **Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Koretsky T, Bagby GC.** The anti-apoptotic function of Hsp70 in the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. *J Biol Chem.* 2002; 277: 49638–43.
  102. **Guo F, Sigua C, Bali P, George P, Fiskus W, Scuto A, Annavarapu S, Mouttaki A, Sondarva G, Wei S, Wu J, Djeu J, Bhalla K.** Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood.* 2005; 105: 1246–55.
  103. **Schett G, Steiner CW, Groger M, Winkler S, Graninger W, Smolen J, Xu Q, Steiner G.** Activation of Fas inhibits heat-induced activation of HSF1 and up-regulation of hsp70. *FASEB J.* 1999; 13: 833–42.
  104. **Liossis SN, Ding XZ, Kiang JG, Tsokos GC.** Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J Immunol.* 1997; 158: 5668–75.
  105. **Panner A, Murray JC, Berger MS, Pieper RO.** Heat shock protein 90alpha recruits FLIPs to the

- death-inducing signaling complex and contributes to TRAIL resistance in human glioma. *Cancer Res.* 2007; 67: 9482–9.
106. **Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, Liu ZG.** Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem.* 2000; 275: 10519–26.
  107. **Zhao C, Wang E.** Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Signal.* 2004; 16: 313–21.
  108. **Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G.** Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 591–5.
  109. **Creagh EM, Carmody RJ, Cotter TG.** Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res.* 2000; 257: 58–66.
  110. **Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G.** Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 839–43.
  111. **Matsumori Y, Hong SM, Aoyama K, Fan Y, Kayama T, Sheldon RA, Vexler ZS, Ferriero DM, Weinstein PR, Liu J.** Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25: 899–910.
  112. **Lui JC, Kong SK.** Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. *FEBS Lett.* 2007; 581: 109–17.
  113. **Kalinowska M, Garncarz W, Pietrowska M, Garrard WT, Widlak P.** Regulation of the human apoptotic DNase/RNase Endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis.* 2005; 10: 821–30.
  114. **Jaattela M, Tschopp J.** Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2003; 4: 416–23.
  115. **Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH, Gores GJ.** Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest.* 2000; 106: 1127–37.
  116. **Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jaattela M.** Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol.* 2001; 153: 999–1010.
  117. **Brunk UT, Svensson I.** Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Rep.* 1999; 4: 3–11.
  118. **Broker LE, Huisman C, Span SW, Rodriguez JA, Kruyt FA, Giacccone G.** Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 27–30.
  119. **Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A.** Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem.* 2003; 278: 31401–11.
  120. **Yuan XM, Li W, Dalen H, Lotem J, Kama R, Sachs L, Brunk UT.** Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 6286–91.
  121. **Brunk UT, Dalen H, Roberg K, Hellquist HB.** Photooxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23: 616–26.
  122. **Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, Vieira HL, Roumier T, Perfettini JL, Kroemer G.** Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene.* 2003; 22: 3927–36.
  123. **Roberg K, Kagedal K, Ollinger K.** Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol.* 2002; 161: 89–96.
  124. **Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, Sterling A, Fiers W, Vandenaabeele P, Grooten J.** Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett.* 1998; 438: 150–8.
  125. **Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jaattela M.** Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med.* 2004; 200: 425–35.
  126. **Bivik C, Rosdahl I, Ollinger K.** Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis.* 2007; 28: 537–44.
  127. **Saribek B, Jin Y, Saigo M, Eto K, Abe S.** HSP90beta is involved in signaling prolactin-induced apoptosis in newt testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 349: 1190–7.
  128. **Bruey JM, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo AP, Solary E, Garrido C.** Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene.* 2000; 19: 4855–63.
  129. **Tsuchiya A, Tashiro E, Yoshida M, Imoto M.** Involvement of nuclear accumulation of heat shock protein 27 in leptomycin B-induced apoptosis in HeLa cells. *J Antibiot.* 2005; 58: 810–6.
  130. **Sashchenko LP, Dukhanina EA, Shatalov YV, Yashin DV, Lukyanova TI, Kabanova OD, Romanova EA, Khaidukov SV, Galkin AV,**

- Gnuchev NV, Georgiev GP.** Cytotoxic T lymphocytes carrying a pattern recognition protein Tag7 can detect evasive, HLA-negative but Hsp70-exposing tumor cells, thereby ensuring FasL/Fas-mediated contact killing. *Blood*. 2007; 110: 1997–2004.
131. **Voss AK, Thomas T, Gruss P.** Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*. 2000; 127: 1–11.
  132. **Negróni L, Samson M, Guignon JM, Rossi B, Pierrefite-Carle V, Baudoin C.** Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6: 2747–56.
  133. **Chiosis G, Caldas Lopes E, Solit D.** Heat shock protein-90 inhibitors: a chronicle from geldanamycin to today's agents. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006; 7: 534–41.
  134. **Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestrlil R, Scheffler IE, Dillmann WH.** Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation*. 2001; 103: 1787–92.
  135. **Faried A, Sohda M, Nakajima M, Miyazaki T, Kato H, Kuwano H.** Expression of heat-shock protein Hsp60 correlated with the apoptotic index and patient prognosis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 2804–11.
  136. **Chandra D, Choy G, Tang DG.** Cytosolic Accumulation of HSP60 during Apoptosis with or without Apparent Mitochondrial Release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *J Biol Chem*. 2007; 282: 31289–301.
  137. **Lin L, Kim SC, Wang Y, Gupta S, Davis B, Simon SI, Torre-Amione G, Knowlton AA.** HSP60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: H2238–47.
  138. **Thomas X, Campos L, Mounier C, Cornillon J, Flandrin P, Le QH, Piselli S, Guyotat D.** Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2005; 29: 1049–58.
  139. **Duval A, Oлару D, Campos L, Flandrin P, Nadal N, Guyotat D.** Expression and prognostic significance of heat-shock proteins in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2006; 91: 713–4.
  140. **Schepers H, Geugien M, van der Toorn M, Bryantsev AL, Kampinga HH, Eggen BJ, Vellenga E.** HSP27 protects AML cells against VP-16-induced apoptosis through modulation of p38 and c-Jun. *Exp Hematol*. 2005; 33: 660–70.
  141. **Georgakis GV, Li Y, Younes A.** The heat shock protein 90 inhibitor 17-AAG induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cell lines by depleting cyclin D1, Akt, Bid and activating caspase 9. *Br J Haematol*. 2006; 135: 68–71.
  142. **Kawakami H, Tomita M, Okudaira T, Ishikawa C, Matsuda T, Tanaka Y, Nakazato T, Taira N, Ohshiro K, Mori N.** Inhibition of heat shock protein-90 modulates multiple functions required for survival of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines and adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer*. 2007; 120: 1811–20.
  143. **Fumo G, Akin C, Metcalfe DD, Neckers L.** 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) is effective in down-regulating mutated, constitutively activated KIT protein in human mast cells. *Blood*. 2004; 103: 1078–84.
  144. **Yao Q, Nishiuchi R, Kitamura T, Kersey JH.** Human leukemias with mutated FLT3 kinase are synergistically sensitive to FLT3 and Hsp90 inhibitors: the key role of the STAT5 signal transduction pathway. *Leukemia*. 2005; 19: 1605–12.
  145. **Castro JE, Prada CE, Loria O, Kamal A, Chen L, Burrows FJ, Kipps TJ.** ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005; 106: 2506–12.
  146. **Jones DT, Addison E, North JM, Lowdell MW, Hoffbrand AV, Mehta AB, Ganeshaguru K, Folarin NI, Wickremasinghe RG.** Geldanamycin and herbimycin A induce apoptotic killing of B chronic lymphocytic leukemia cells and augment the cells' sensitivity to cytotoxic drugs. *Blood*. 2004; 103: 1855–61.
  147. **Peng C, Brain J, Hu Y, Goodrich A, Kong L, Grayzel D, Pak R, Read M, Li S.** Inhibition of heat shock protein 90 prolongs survival of mice with BCR-ABL-T3151-induced leukemia and suppresses leukemic stem cells. *Blood*. 2007; 110: 678–85.
  148. **Mesa RA, Loegering D, Powell HL, Flatten K, Arlander SJ, Dai NT, Heldebrandt MP, Vroman BT, Smith BD, Karp JE, Eyck CJ, Erlichman C, Kaufmann SH, Karnitz LM.** Heat shock protein 90 inhibition sensitizes acute myelogenous leukemia cells to cytarabine. *Blood*. 2005; 106: 318–27.
  149. **Chatterjee M, Jain S, Stuhmer T, Andrulis M, Ungethum U, Kuban RJ, Lorentz H, Bommert K, Topp M, Kramer D, Muller-Hermelink HK, Einsele H, Greiner A, Bargou RC.** STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood*. 2007; 109: 720–8.
  150. **Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV.** Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood*. 2007; 109: 4839–45.

151. **Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP.** HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell.* 2005; 18: 601–7.
152. **Nimmanapalli R, Fuino L, Bali P, Gasparetto M, Glozak M, Tao J, Moscinski L, Smith C, Wu J, Jove R, Atadja P, Bhalla K.** Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 5126–35.
153. **Bali P, George P, Cohen P, Tao J, Guo F, Sigua C, Vishvanath A, Scuto A, Annavarapu S, Fiskus W, Moscinski L, Atadja P, Bhalla K.** Superior activity of the combination of histone deacetylase inhibitor LAQ824 and the FLT-3 kinase inhibitor PKC412 against human acute myelogenous leukemia cells with mutant FLT-3. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 4991–7.
154. **Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, Seto E, Bhalla K.** Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem.* 2005; 280: 26729–34.
155. **George P, Bali P, Annavarapu S, Scuto A, Fiskus W, Guo F, Sigua C, Sondarva G, Moscinski L, Atadja P, Bhalla K.** Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood.* 2005; 105: 1768–76.
156. **Nieto-Miguel T, Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F.** Proapoptotic role of Hsp90 by its interaction with c-Jun N-terminal kinase in lipid rafts in edelfosine-mediated antileukemic therapy. *Oncogene.* 2008; 27: 1779–87.
157. **Yao Q, Nishiuchi R, Li Q, Kumar AR, Hudson WA, Kersey JH.** FLT3 expressing leukemias are selectively sensitive to inhibitors of the molecular chaperone heat shock protein 90 through destabilization of signal transduction-associated kinases. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4483–93.
158. **Nimmanapalli R, O'Bryan E, Bhalla K.** Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Res.* 2001; 61: 1799–804.
159. **Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ.** A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature.* 2003; 425: 407–10.
160. **Workman P.** Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Lett.* 2004; 206: 149–57.
161. **Vilenchik M, Solit D, Basso A, Huezio H, Lucas B, He H, Rosen N, Spampinato C, Modrich P, Chiosis G.** Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FCI, a specific inhibitor of tumor Hsp90. *Chem Biol.* 2004; 11: 787–97.
162. **Ray S, Lu Y, Kaufmann SH, Gustafson WC, Karp JE, Boldogh I, Fields AP, Brasier AR.** Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2004; 279: 35604–15.
163. **Schmitt E, Maingret L, Puig PE, Rerole AL, Ghiringhelli F, Hammann A, Solary E, Kroemer G, Garrido C.** Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer Res.* 2006; 66: 4191–7.
164. **Westerheide SD, Kawahara TL, Orton K, Morimoto RI.** Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *J Biol Chem.* 2006; 281: 9616–22.
165. **Zhao ZG, Shen WL.** Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 73–8.
166. **Jaattela M.** Heat shock proteins as cellular life-guards. *Ann Med.* 1999; 31: 261–71.
167. **Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, Kouranti I, Spahr C, Pance A, Kroemer G, Garrido C.** Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene.* 2003; 22: 6669–78.
168. **Rocchi P, Jugpal P, So A, Sinneman S, Ettinger S, Fazli L, Nelson C, Gleave M.** Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation *in vitro*. *BJU Int.* 2006; 98: 1082–9.
169. **Sangster TA, Bahrami A, Wilczek A, Watanabe E, Schellenberg K, McLellan C, Kelley A, Kong SW, Queitsch C, Lindquist S.** Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels. *PLoS ONE.* 2007; 2: e648.
170. **Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C, Vicart P.** Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett.* 2007; 581: 3665–74.

*Annexe III :*

*Apoptosis versus Cell Differentiation  
Role of Heat Shock Proteins HSP90,  
HSP70 and HSP27*

## Mini-Review

# Apoptosis Versus Cell Differentiation

## Role of Heat Shock Proteins HSP90, HSP70 and HSP27

David Lanneau

Aurelie de Thonel

Sebastien Maurel

Celine Didelot

Carmen Garrido\*

INSERM UMR866; Faculty of Medicine; Dijon, France

\*Correspondence to: Carmen Garrido; INSERM UMR 866; Faculty of Medicine; 7 Boulevard Jeanne D'Arc; Dijon 21033 France; Tel.: 33.3.80.39.32.84; Fax: 33.3.80.30.34.34; Email: cgarrido@u bourgogne.fr

Original manuscript submitted: 02/09/07

Revised manuscript submitted: 02/23/07

Manuscript accepted: 02/24/07

Previously published online as a *Prion* E-publication:

<http://www.landesbioscience.com/journals/Prion/abstract.php?id=4059>

### KEY WORDS

apoptosis, differentiation, heat shock proteins, chaperones, cancer cells, anticancer drugs

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Ligue contre le Cancer (Nièvre) for financial support. Celine Didelot has fellowship from la Fondation France contre la Leucémie, David Lanneau from the Ministère de l'Éducation, and Aurelie de Thonel from l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

### ABSTRACT

Heat shock proteins HSP27, HSP70 and HSP90 are molecular chaperones whose expression is increased after many different types of stress. They have a protective function helping the cell to cope with lethal conditions. The cytoprotective function of HSPs is largely explained by their anti-apoptotic function. HSPs have been shown to interact with different key apoptotic proteins. As a result, HSPs can block essentially all apoptotic pathways, most of them involving the activation of cystein proteases called caspases. Apoptosis and differentiation are physiological processes that share many common features, for instance, chromatin condensation and the activation of caspases are frequently observed. It is, therefore, not surprising that many recent reports imply HSPs in the differentiation process. This review will comment on the role of HSP90, HSP70 and HSP27 in apoptosis and cell differentiation. HSPs may determine the fate of the cells by orchestrating the decision of apoptosis versus differentiation.

### INTRODUCTION

Stress or heat shock proteins (HSPs) were first discovered in 1962<sup>1</sup> as a set of highly conserved proteins whose expression was induced by different kinds of stress. It has subsequently been shown that most HSPs have strong cytoprotective effects and behave as molecular chaperones for other cellular proteins. HSPs are also induced at specific stages of development, differentiation and during oncogenesis.<sup>2</sup> Mammalian HSPs have been classified into five families according to their molecular size: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 and the small HSPs. Each family of HSPs is composed of members expressed either constitutively or regulated inducibly, and/or targeted to different sub-cellular compartments. The most studied HSPs are HSP90, the inducible HSP70 (also called HSP72) and the small heat shock protein HSP27.

HSP90 is a constitutively abundant chaperone that makes up 1–2% of cytosolic proteins. It is an ATP-dependent chaperone that accounts for the maturation and functional stability of a plethora of proteins termed HSP90 client proteins. In mammals, HSP90 comprises 2 homologue proteins (HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ ) encoded by separated but highly conserved genes that arose through duplication during evolution.<sup>3</sup> Most studies do not differentiate between the two isoforms because for a long time they have been considered as having the same function in the cells. However, recent data and notably out-of-function experiments indicate that at least some functions of the beta isoform are not overlapped by HSP90 $\alpha$ 's functions.<sup>4</sup> HSP70, like HSP90, binds ATP and undergoes a conformational change upon ATP binding, needed to facilitate the refolding of denatured proteins. The chaperone function of HSP70 is to assist the folding of newly synthesized polypeptides or misfolded proteins, the assembly of multi-protein complexes and the transport of proteins across cellular membranes.<sup>5,6</sup> HSP90 and HSP70 chaperone activity is regulated by co-chaperones like Hip, CHIP or Bag-1 that increase or decrease their affinity for substrates through the stabilization of the ADP or ATP bound state. In contrast to HSP90 and HSP70, HSP27 is an ATP-independent chaperone, its main chaperone function being protection against protein aggregation.<sup>7</sup> HSP27 can form oligomers of more than 1000 Kda. The chaperone role of HSP27 seems modulated by its state of oligomerization, the multimer being the chaperone competent state.<sup>8</sup> This oligomerization is a very dynamic process modulated by the phosphorylation of the protein that favors the formation of small oligomers. Cell-cell contact and methylglyoxal can also modulate the oligomerization of the protein.<sup>9</sup>

It is now well accepted that HSPs are important modulators of the apoptotic pathway. Apoptosis, or programmed cell death, is a type of death essential during embryogenesis and, latter on in the organism, to assure cell homeostasis. Apoptosis is also a very frequent type of cell death observed after treatment with cytotoxic drugs.<sup>10</sup> Mainly, two pathways of apoptosis can be distinguished, although cross-talk between the two signal transducing cascades exists (Fig. 1). The extrinsic pathway is triggered through plasma membrane proteins of the tumor necrosis factor (TNF) receptor family known as death receptors, and leads to the direct activation of the proteases called caspases, starting with the receptor-proximal caspase-8. The intrinsic pathway involves intracellular stress signals that provoke the permeabilization of the outer mitochondrial membrane, resulting in the release of pro-apoptotic molecules normally confined to the inter-membrane space. Such proteins translocate from mitochondria to the cytosol in a reaction that is controlled by Bcl-2 and Bcl-2-related proteins.<sup>11</sup> One of them is the cytochrome c, which interacts with cytosolic apoptosis protease-activating factor-1 (Apaf-1) and pro-caspase-9 to form the apoptosome, the caspase-3 activation complex.<sup>12</sup> Apoptosis inducing factor (AIF) and the Dnase, EndoG, are other mitochondria intermembrane proteins released upon an apoptotic stimulus. They translocate to the nucleus and trigger caspase-independent nuclear changes.<sup>13,14</sup> Two additional released mitochondrial proteins, Smac/Diablo and Htra2/Omi, activate apoptosis by neutralizing the inhibitory activity of the inhibitory apoptotic proteins (IAPs) that associate with and inhibit caspases<sup>15</sup> (Fig. 1).

Apoptosis and differentiation are two physiological processes that share different features like chromatin condensation or the need of caspase activity.<sup>16</sup> It has been demonstrated in many differentiation models that the activation of caspases is preceded by a mitochondrial membrane depolarization and release of mitochondria apoptogenic molecules.<sup>17,18</sup> This suggests that the mitochondrial-caspase dependent apoptotic pathway is a common intermediate for conveying apoptosis and differentiation. Timing, intensity and cellular compartmentalization might determine whether a cell is to die or differentiate. HSPs might be essential to orchestrate this decision. This review will describe the role of HSP90, HSP70 and HSP27 in apoptosis and cell differentiation.

## HSP27, HSP70 AND HSP90 ARE ANTI-APOPTOTIC PROTEINS

Overexpression of HSP27, HSP70 or HSP90 prevents apoptosis triggered by various stimuli, including hyperthermia, oxidative stress, staurosporine, ligation of the Fas/Apo-1/CD95 death receptor or anticancer drugs.<sup>2,19-21</sup> Downregulation or inhibition of HSP27, HSP70 or HSP90 have been shown to be enough to sensitize a cell to apoptosis, proving that endogenous levels of those chaperones seem to be sufficiently high to control apoptosis.<sup>22-24</sup> It is now known that these chaperones can interact with key proteins of the apoptotic signaling pathways (Fig. 1).

**HSP90: A survival protein through its client proteins.** HSP90 client proteins include a number of signaling proteins like ligand-dependent transcription factors and signal transducing kinases that play a role in the apoptotic process. Upon binding and hydrolysis of ATP, the conformation of HSP90 changes and the client protein, which is no longer chaperoned, is ubiquitinated and degraded by the proteasome.<sup>25</sup>

A function for HSP90 in the serine/threonine protein kinase Akt pathway was first suggested by studies using an HSP90 inhibitor that

promoted apoptosis in HEK293T and resulted in suppressed Akt activity.<sup>26</sup> A direct interaction between Akt and HSP90 was reported later.<sup>27</sup> Binding of HSP90 protects Akt from protein phosphatase 2A (PP2A)-mediated dephosphorylation.<sup>26</sup> Phosphorylated Akt can then phosphorylate the Bcl-2 family protein Bad and caspase-9 leading to their inactivation and to cell survival.<sup>28,29</sup> But Akt has been also shown to phosphorylate I $\kappa$ B kinase, which results in promotion of NF $\kappa$ B-mediated inhibition of apoptosis.<sup>30</sup> When the interaction HSP90/Akt was prevented by HSP90 inhibitors, Akt was dephosphorylated and destabilized and the likelihood of apoptosis increased.<sup>27</sup> Additional studies showed that another chaperone participates in the Akt-HSP90 complex, namely Cdc37.<sup>26</sup> Together this complex protects Akt from proteasome degradation. In human endothelial cells during high glucose exposure, apoptosis can be prevented by HSP90 through augmentation of the protein interaction between eNOS and HSP90 and recruitment of the activated Akt.<sup>31</sup> HSP90 has also been shown to interact with and stabilize the receptor interacting protein (RIP). Upon ligation of TNFR-1, RIP-1 is recruited to the receptor and promotes the activation of NF $\kappa$ B and JNK. Degradation of RIP-1 in the absence of HSP90 precludes activation of NF $\kappa$ B mediated by TNF $\alpha$  and sensitizes cells to apoptosis.<sup>32</sup> Another route by which HSP90 can affect NF $\kappa$ B survival activity is via the IKK complex.<sup>33</sup> The HSP90 inhibitor geldanamycin prevents TNF-induced activation of IKK, highlighting the role of HSP90 in NF $\kappa$ B activation. Some other HSP90 client proteins through which this chaperone could participate in cell survival are p53<sup>34</sup> and the transcription factors Her2 and Hif1 $\alpha$ .<sup>35,36</sup>

But the anti-apoptotic role of HSP90 can also be explained by its effect and interaction with proteins not defined as HSP90 client proteins (i.e., whose stability is not regulated by HSP90). HSP90 overexpression in human leukemic U937 cells can prevent the activation of caspases in cytosolic extracts treated with cytochrome c probably because HSP90 can bind to Apaf-1 and inhibit its oligomerization and further recruitment of procaspase-9.<sup>37</sup>

Unfortunately, most studies do not differentiate between HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ . It has recently been demonstrated in multiple myeloma, in which an over expression of HSP90 is necessary for cell survival, that depletion of HSP90 $\beta$  by siRNA is sufficient to induce apoptosis. This effect is strongly increased when also HSP90 $\alpha$  is also depleted,<sup>23</sup> suggesting different and cooperating anti-apoptotic properties for HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ . Confirming this assumption, in mast cells, HSP90 $\beta$  has been shown to associate with the anti-apoptotic protein Bcl-2. Depletion of HSP90 $\beta$  with a siRNA or inhibition of HSP90 with geldanamycin inhibits HSP90 $\beta$  interaction with Bcl-2 and results in cytochrome c release, caspase activation and apoptosis.<sup>38</sup>

In conclusion, HSP90 anti-apoptotic functions can largely be explained by its chaperone role assuring the stability of different proteins. Recent studies suggest that the two homologue proteins, HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ , might have different survival properties. It would be interesting to determine whether HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  bind to different client proteins or bind with different affinity.

**HSP70: A quintessential inhibitor of apoptosis.** HSP70 loss-of-function studies demonstrated the important role of HSP70 in apoptosis. Cells lacking *hsp70.1* and *hsp70.3*, the two genes that code for inductive HSP70, are very sensitive to apoptosis induced by a wide range of lethal stimuli.<sup>39</sup> Further, the testis specific isoform of HSP70 (*hsp70.2*) when ablated, results in germ cell apoptosis.<sup>40</sup> In cancer cells, depletion of HSP70 results in spontaneous apoptosis.<sup>41</sup>

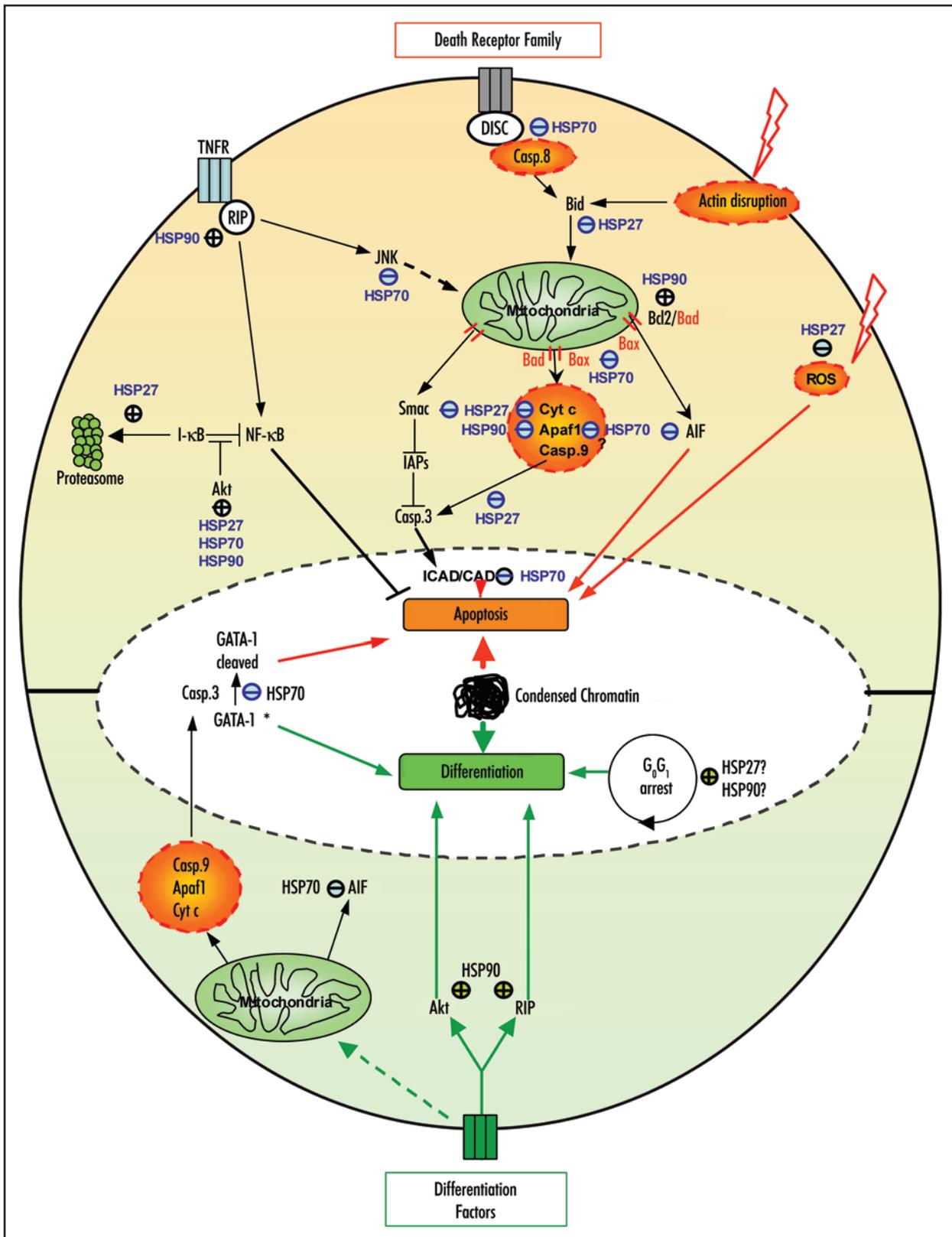


Figure 1. Modulation of apoptosis and differentiation by HSP90, HSP70 and HSP27. In apoptosis (upper part), HSP90 can inhibit caspase (casp.) activation by its interaction with Apaf1. HSP90 stabilizes proteins from the survival signaling including RIP, Akt and Bcl-2. HSP70 can block apoptosis by inhibiting JNK, Bax mitochondrial translocation, by interacting with AIF and/or Apaf-1 or by protecting essential nuclear proteins from caspase-3 cleavage. HSP27 can block caspase activation through its action on F-actin, Bid, ROS or cytochrome c. HSP27 also favors the proteasomal degradation of proteins like I-κBα. During differentiation (lower part), HSP90 stabilizes proteins involved in signaling induced by differentiating factors like Akt, RIP as well as Bcl-2. HSP70 prevents the cleavage of GATA-1 by caspase-3 allowing erythroblast to differentiate instead of dying by apoptosis. HSP70 neutralization of AIF contributes also to the survival of the differentiating cells. HSP27 might be involved in the cell cycle arrest (→, stimulation; ⊥, inhibition; \*, in erythroblasts).

HSP70 has been shown to inhibit the apoptotic pathways at different levels (Fig. 1). At the pre-mitochondrial level, HSP70 binds to and blocks c-Jun N-terminal Kinase (JNK1) activity.<sup>42,43</sup> Confirming this result, HSP70 deficiency induces JNK activation and caspase-3 activation<sup>44</sup> in apoptosis induced by hyperosmolarity. HSP70 also has been shown to bind to non-phosphorylated protein kinase C (PKC) and Akt, stabilizing both proteins.<sup>45</sup>

At the mitochondrial level, HSP70 inhibits Bax translocation and insertion into the outer mitochondrial membrane. As a consequence, HSP70 prevents mitochondrial membrane permeabilization and release of cytochrome c and AIF.<sup>46</sup>

At the post-mitochondrial level HSP70 has been demonstrated to bind directly to Apaf-1, thereby preventing the recruitment of procaspase-9 to the apoptosome.<sup>47</sup> However, these results have been contradicted by a study in which the authors demonstrated that HSP70 do not have any direct effect on caspase activation. They explain these contradictory results by showing that it is a high salt concentration and not HSP70 that inhibits caspase activation.<sup>48</sup>

HSP70 also prevents cell death in conditions in which caspase activation does not occur.<sup>49</sup> Indeed, HSP70 binds to AIF, inhibits AIF nuclear translocation and chromatin condensation.<sup>39,50,51</sup> The interaction involves a domain of AIF between aminoacids 150 and 228.<sup>52</sup> AIF sequestration by HSP70 has been shown to reduce neonatal hypoxic/ischemic brain injury.<sup>53</sup> HSP70 has also been shown to associate with EndoG and to prevent DNA fragmentation<sup>54</sup> but since EndoG can form complexes with AIF, its association with HSP70 could involve AIF as a molecular bridge.

HSP70 can also rescue cells from a later phase of apoptosis than any known survival protein, downstream caspase-3 activation.<sup>55</sup> During the final phases of apoptosis, chromosomal DNA is digested by the DNase CAD (caspase activated DNase), following activation by caspase-3. The enzymatic activity and proper folding of CAD has been reported to be regulated by HSP70.<sup>56</sup>

At the death receptors level, HSP70 binds to DR4 and DR5, thereby inhibiting TRAIL-induced assembly and activity of death inducing signaling complex (DISC).<sup>57</sup> Finally, HSP70 has been shown to inhibit lysosomal membrane permeabilization thereby preventing cathepsins release, proteases also implicated in apoptosis.<sup>58,59</sup>

In conclusion, HSP70 is a quintessential regulator of apoptosis that can interfere with all main apoptotic pathways. Interestingly, the ATP binding domain of HSP70 is not always required. For instance, while the ATPase function is needed for the Apaf-1<sup>50</sup> and AIF binding,<sup>51</sup> it is dispensable for JNK<sup>60</sup> or GATA-1<sup>61</sup> binding/protection. In this way, in erythroblasts, in which HSP70 blocks apoptosis by protecting GATA-1 from caspase-3 cleavage, a HSP70 mutant that lacks the ATP binding domain of HSP70 is as efficient as wild type HSP70 in assuring the protection of erythroblasts.<sup>61</sup>

**HSP27: An inhibitor of caspase activation.** HSP27 depletion reports demonstrate that HSP27 essentially blocks caspase-dependent apoptotic pathways. Small interference targeting HSP27 induces apoptosis through caspase-3 activation.<sup>62,63</sup> This may be consequence of the association of HSP27 with cytochrome c in the cytosol, thereby inhibiting the formation of the caspase-3 activation complex as demonstrated in leukemia and colon cancer cells treated with different apoptotic stimuli.<sup>64-66</sup> This interaction involves amino-acids 51 and 141 of HSP27 and do not need the phosphorylation of the protein.<sup>65</sup> In multiple myeloma cells treated with dexamethasone, HSP27 has also been shown to interact with Smac.<sup>67</sup>

HSP27 can also interfere with caspase activation upstream of the mitochondria.<sup>66</sup> This effect seems related to the ability of HSP27 to

interact and regulate actin microfilaments dynamics. In L929 murine fibrosarcoma cells exposed to cytochalasin D or staurosporine, overexpressed HSP27 binds to F-actin<sup>68</sup> preventing the cytoskeletal disruption, Bid intracellular redistribution and cytochrome c release<sup>66</sup> (Fig. 1). HSP27 has also important anti-oxidant properties. This is related to its ability to uphold glutathione in its reduced form,<sup>69</sup> to decrease reactive oxygen species cell content,<sup>19</sup> and to neutralize the toxic effects of oxidized proteins.<sup>70</sup> These anti-oxidant properties of HSP27 seem particularly relevant in HSP27 protective effect in neuronal cells.<sup>71</sup>

HSP27 has been shown to bind to the kinase Akt, an interaction that is necessary for Akt activation in stressed cells. In turn, Akt could phosphorylate HSP27, thus leading to the disruption of HSP27-Akt complexes.<sup>72</sup> HSP27 also affects one downstream event elicited by Fas/CD95. The phosphorylated form of HSP27 directly interacts with Daxx.<sup>73</sup> In LNCaP tumor cells, HSP27 has been shown to induce cell protection through its interaction with the activators of transcription 3 (Stat3).<sup>74</sup> Finally, HSP27 protective effect can also be consequence of its effect favouring the proteasomal degradation of certain proteins under stress conditions. Two of the proteins that HSP27 targets for their ubiquitination/proteasomal degradation are the transcription factor nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  and p27<sup>kip1</sup>. The pronounced degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  induced by HSP27 overexpression increases NF $\kappa$ B dependent cell survival<sup>75</sup> while that of p27<sup>kip1</sup> facilitates the passage of cells to the proliferate phases of the cellular cycle. As a consequence HSP27 allows the cells to rapidly resume proliferation after a stress.<sup>76</sup>

Therefore, HSP27 is able to block apoptosis at different stages because of its interaction with different partners. The capacity of HSP27 to interact with one or another partner seems to be determined by the oligomerization/phosphorylation status of the protein, which, at its turn, might depend on the cellular model/experimental conditions. We have demonstrated in vitro and in vivo that for HSP27 caspase-dependent anti-apoptotic effect, large non-phosphorylated oligomers of HSP27 were the active form of the protein.<sup>77</sup> Confirming these results, it has recently been demonstrated that methylglyoxal modification of HSP27 induces large oligomers formation and increases the anti-apoptotic caspase-inhibitory properties of HSP27.<sup>78</sup> In contrast, for HSP27 interaction with the F-actin and with Daxx, phosphorylated and small oligomers of HSP27 were necessary<sup>73,79</sup> and it is its phosphorylated form that protects against neurotoxicity.<sup>80</sup>

## HSP27, HSP70 AND HSP90 AND CELL DIFFERENTIATION

Under the prescribed context of HSPs as powerful inhibitors of apoptosis, it is reasonable to assume that an increase or decrease in their expression might modulate the differentiation program. The first evidence of the role of HSPs in cell differentiation comes from their tightly regulated expression at different stages of development and cell differentiation. For instance during the process of endochondrial bone formation, they are differentially expressed in a stage-specific manner.<sup>81</sup> In addition, during post-natal development, time at which extensive differentiation takes place, HSPs expression is regulated in neuronal and non-neuronal tissues.<sup>82</sup> In hemin-induced differentiation of human K562 erythroleukemic cells, genes coding for HSPs are induced.<sup>83</sup>

In leukemic cells HSP27 has been described as a pre-differentiation marker<sup>84</sup> because its induction occurs early during differentiation.<sup>85-88</sup> HSP27 expression has also been suggested as a differentiation marker

for skin keratinocytes<sup>89</sup> and for C2C12 muscle cells.<sup>90</sup> This role for HSP27 in cell differentiation might be related to the fact that HSP27 expression increases as cells reach the non proliferative/quiescent phases of the cellular cycle ( $G_0/G_1$ ).<sup>19,76</sup>

Subcellular localization is another mechanism whereby HSPs can determine whether a cell is to die or to differentiate. We, and others, have recently demonstrated the essential function of nuclear HSP70 for erythroid differentiation. During red blood cells' formation, HSP70 and activated caspase-3 accumulate in the nucleus of the erythroblast.<sup>91</sup> HSP70 directly associates with GATA-1 protecting this transcription factor required for erythropoiesis from caspase-3 cleavage. As a result, erythroblasts continue their differentiation process instead of dying by apoptosis.<sup>61</sup> HSP70, during erythropoiesis in TF-1 cells, have been shown to bind to AIF and thereby to block AIF-induced apoptosis, thus allowing the differentiation of erythroblasts to proceed.<sup>18</sup>

HSP90 has been required for erythroid differentiation of leukemia K562 cells induced by sodium butyrate<sup>92</sup> and for DMSO-differentiated HL-60 cells. Regulation of HSP90 isoforms may be a critical event in the differentiation of human embryonic carcinoma cells and may be involved in differentiation into specific cell lineages.<sup>93</sup> This effect of HSP90 in cell differentiation is probably because multiple transduction proteins essential for differentiation are client proteins of HSP90 such as Akt,<sup>94</sup> RIP<sup>32</sup> or Rb.<sup>95</sup> Loss of function studies confirm that HSP90 plays a role in cell differentiation and development. In *Drosophila melanogaster*, point mutations of HSP83 (the drosophila HSP90 gene) are lethal as homozygotes. Heterozygous mutant combinations produce viable adults with the same developmental defect: sterility.<sup>96</sup> In *Caenorhabditis elegans*, DAF-21, the homologue of HSP90, is necessary for oocyte development.<sup>97</sup> In zebrafish, HSP90 is expressed during normal differentiation of triated muscle fibres. Disruption of the activity of the proteins or the genes give rise to failure in proper somatic muscle development.<sup>98</sup> In mice, loss-of-function studies demonstrate that while HSP90 $\alpha$  loss-of-function phenotype appears to be normal, HSP90 $\beta$  is lethal. HSP90 $\beta$  is essential for trophoblasts differentiation and thereby for placenta development and this function can not be performed by HSP90 $\alpha$ .<sup>4</sup>

HSP90 inhibitors have also been used to study the role of HSP90 in cell differentiation. These inhibitors such as the benzoquinone ansamycin geldanamycin or its derivative the 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), bind to the ATP-binding "pocket" of HSP90 with higher affinity than natural nucleotides and thereby HSP90 chaperone activity is impaired and its client proteins are degraded. As could be expected by the reported role of HSP90 in cell differentiation, inhibitors of HSP90 block C2C12 myoblasts differentiation.<sup>99</sup> In cancer cells and human leukemic blasts, 17-AAG induces a retinoblastoma-dependent  $G_1$  block. These  $G_1$  arrested cells do not differentiate but instead die by apoptosis.<sup>100</sup>

However, some reports describe that inhibitors of HSP90 can induce the differentiation process. In acute myeloid leukemia cells, 17-AAG induced apoptosis or differentiation depending on the dose and time of the treatment.<sup>101</sup> Opposite effects on cell differentiation and apoptosis are also obtained with the HSP90 inhibitor geldanamycin: in PC12 cells it induced apoptosis while in murin neuroblastoma N2A cells it induced differentiation.<sup>102</sup> In breast cancer cells, 17-AAG-induced  $G_1$  block is accompanied by differentiation followed by apoptosis.<sup>103</sup> The HSP90 inhibitor PU3, a synthetic purine that like 17-AAG binds with high affinity to the ATP "pocket" of HSP90, caused breast cancer cells arrest in  $G_1$  phase and differentiation.<sup>104</sup>

These contradictory reports concerning the inhibitors of HSP90 and cell differentiation could be explained if we consider that these drugs, depending on the experimental conditions, can have some side effects more or less independent of HSP90. Another possibility is that these studies do not differentiate between the amount of HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  inhibited. It is presently unknown whether HSP90 inhibitors equally block both isoforms, HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ . It is not known neither whether post-translational modifications of HSP90 (acetylation, phosphorylation...) can affect their affinity for the inhibitors. HSP90 $\alpha$  has been reported to be induced by lethal stimuli while the HSP90 $\beta$  can be induced by growth factors or cell differentiating signals.<sup>105</sup> Mouse embryos out-of-function studies clearly show the role of HSP90 $\beta$  in the differentiation process and, at least for HSP90 $\beta$  role in embryo cell differentiation, there is not an overlap with HSP90 $\alpha$  functions. Therefore, we can hypothesized that it can be the degree of inhibition of HSP90 $\beta$  by the HSP90 inhibitors that would determine whether or not there is a blockade of the differentiation process. This degree of inhibition of the different HSP90 isoforms might be conditioned by their cellular localization and their post-translational modifications. It should be noted, however, that the relative relevance of HSP90 $\beta$  in the differentiation process might depend on the differentiation model studied.

To summarize, we can hypothesize that the role in the differentiation process of a chaperone will be determined by its transient expression, subcellular redistribution and/or post-translational modifications induced at a given stage by a differentiation factor. How can HSPs affect the differentiation process? First by their anti-apoptotic role interfering with caspase activity, we and other authors have shown that caspase activity was generally required for cell differentiation.<sup>16,17</sup> Therefore, HSPs by interfering with caspase activity at a given moment, in a specific cellular compartment, may orchestrate the decision differentiation versus apoptosis. In this way, we have recently shown that HSP70 was a key protein to orchestrate this decision in erythroblasts.<sup>61</sup> Second, HSPs may affect the differentiation process by regulating the nuclear/cytosolic shuttling of proteins that take place during differentiation. For instance, c-IAP1 is translocated from the nucleus to the cytosol during differentiation of hematopoietic and epithelial cells, and we have demonstrated that HSP90 is needed for this c-IAP1 nuclear export.<sup>106</sup> It has also been shown that, during erythroblast differentiation, HSP70 is needed to inhibit AIF nuclear translocation.<sup>18</sup> Third, in the case of HSP90, the role in the differentiation process could be through certain of its client proteins, like RIP or Akt, whose stability is assured by the chaperone.

## REPERCUSSIONS AND CONCLUDING REMARKS

The ability of HSPs to modulate the fate of the cells might have important repercussions in pathological situations such as cancer. Apoptosis, differentiation and oncogenesis are very related processes. Defaults in differentiation and/or apoptosis are involved in many cancer cells' aetiology. HSPs are abnormally constitutively high in most cancer cells and, in clinical tumors, they are associated with poor prognosis. In experimental models, HSP27 and HSP70 have been shown to increase cancer cells' tumorigenicity and their depletion can induce a spontaneous regression of the tumors.<sup>24,107</sup> Several components of tumor cell-associated growth and survival pathways are HSP90 client proteins. These qualities have made HSPs targets for anticancer drug development. Today, although many research groups and pharmaceutical companies look for soluble specific

inhibitors of HSP70 and HSP27, only specific soluble inhibitors of HSP90 are available for clinical trials. For some of them (17-AAG) phase II clinical trials are almost finished.<sup>108</sup> However, considering the new role of HSP90 $\beta$  in cell differentiation, it seems essential to re-evaluate the functional consequences of HSP90 blockade.

## References

- Ritossa F. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18:571-3.
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304:505-12.
- Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:761-72.
- Voss AK, Thomas T, Gruss P. Mice lacking *HSP90beta* fail to develop a placental labyrinth. *Development* 2000; 127:1-11.
- Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* 1990; 248:850-4.
- Shi Y, Thomas JO. The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* 1992; 12:2186-92.
- Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, Buchner J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J* 1997; 16:221-9.
- Shashidharamurthy R, Koteiche HA, Dong J, McHaourab HS. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: Dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme. *J Biol Chem* 2005; 280:5281-9.
- Garrido C. Size matters: Of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ* 2002; 9:483-5.
- Solary E, Droin N, Bettaieb A, Corcos L, Dimanche-Boitrel MT, Garrido C. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia* 2000; 14:1833-49.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006; 13:1423-33.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479-89.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410:549-54.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441-6.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102:33-42.
- Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 2005; 24:5137-48.
- Garrido C, Kroemer G. Life's smile, death's grin: Vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:639-46.
- Lui JC, Kong SK. Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. *FEBS Lett* 2007; 581:109-17.
- Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chaffert B, Mehlen P. HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res* 1997; 57:2661-7.
- Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, Hammann A, Assem M, Arrigo AP, Chaffert B. Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells: The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem* 1996; 237:653-9.
- Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF $\alpha$ -induced cell death. *Embo J* 1996; 15:2695-706.
- Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, Brand K, Rohde M, Leist M, Weller M, Jaattela M. Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res* 2002; 62:7139-42.
- Chatterjee M, Jain S, Stuhmer T, Andrusis M, Ungethum U, Kuban RJ, Lorentz H, Bommer K, Topp M, Kramer D, Muller-Hermelink HK, Einsele H, Greiner A, Bargou RC. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90 $\alpha$  and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood* 2007; 109:720-8.
- Gurbuxani S, Bruey JM, Fromentin A, Larmonier N, Parcellier A, Jaattela M, Martin F, Solary E, Garrido C. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene* 2001; 20:7478-85.
- Sreedhar AS, Kalmar E, Cserehely P, Shen YF. Hsp90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 2004; 562:11-5.
- Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tschlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 2002; 277:39858-66.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:10832-7.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91:231-41.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282:1318-21.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; 401:82-5.
- Lin LY, Lin CY, Ho FM, Liao CS. Up-regulation of the association between heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase prevents high glucose-induced apoptosis in human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2005; 94:194-201.
- Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, Liu ZG. Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 2000; 275:10519-26.
- Chen G, Cao P, Goeddel DV. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 2002; 9:401-10.
- Zhang Y, Wang JS, Chen LL, Cheng XK, Heng FY, Wu NH, Shen YF. Repression of *hsp-90beta* gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells. *J Biol Chem* 2004; 279:42545-51.
- Munster PN, Marchion DC, Basso AD, Rosen N. Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer Res* 2002; 62:3132-7.
- Hur E, Kim HH, Choi SM, Kim JH, Yim S, Kwon HJ, Choi Y, Kim DK, Lee MO, Park H. Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Mol Pharmacol* 2002; 62:975-82.
- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbada S. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J* 2000; 19:4310-22.
- Cohen-Saidon C, Carmi I, Keren A, Razin E. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90 $\beta$ . *Blood* 2006; 107:1413-20.
- Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, Cande C, Hammann A, Morales MC, Hunt CR, Dix DJ, Kroemer RT, Giordanetto F, Jaattela M, Penninger JM, Pance A, Kroemer G, Garrido C. Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res* 2003; 63:8233-40.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of *Hsp70-2* results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:3264-8.
- Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses *Bcl-2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:7871-6.
- Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *Embo J* 2001; 20:446-56.
- Gabai VL, Yaglom JA, Volloch V, Meriin AB, Force T, Koutroumanis M, Massie B, Mosser DD, Sherman MY. Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Mol Cell Biol* 2000; 20:6826-36.
- Lee JS, Lee JJ, Seo JS. HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280:6634-41.
- Gao T, Newton AC. The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem* 2002; 277:31585-92.
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 2005; 280:38729-39.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2:469-75.
- Steel R, Doherty JP, Buzzard K, Clemons N, Hawkins CJ, Anderson RL. Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J Biol Chem* 2004; 279:51490-9.
- Creagh EM, Carmody RJ, Cotter TG. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res* 2000; 257:58-66.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3:839-43.
- Ruchalski K, Mao H, Li Z, Wang Z, Gillers S, Wang Y, Mosser DD, Gabai V, Schwartz JH, Borkan SC. Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *J Biol Chem* 2006; 281:7873-80.

52. Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, Kouranti I, Spahr C, Pance A, Kroemer G, Garrido C. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 2003; 22:6669-78.
53. Matsumori Y, Hong SM, Aoyama K, Fan Y, Kayama T, Sheldon RA, Vexler ZS, Ferriero DM, Weinstein PR, Liu J. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25:899-910.
54. Kalinowska M, Garnarcz W, Pietrowska M, Garrard WT, Widlak P. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase Endonuclease G: Involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis* 2005; 10:821-30.
55. Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J* 1998; 17:6124-34.
56. Sakahira H, Nagata S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 2002; 277:3364-70.
57. Guo F, Sigua C, Bali P, George P, Fiskus W, Scuto A, Annavarapu S, Mouttaki A, Sondarva G, Wei S, Wu J, Djeu J, Bhalla K. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* 2005; 105:1246-55.
58. Gyrd-Hansen M, Nylandsted J, Jaattela M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle* 2004; 3.
59. Bivik C, Rosdahl I, Ollinger K. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis* 2006.
60. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20:7146-59.
61. Ribel JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Moura IC, Zeuner A, Kirkegaard-Sorensen T, Varet B, Solary E, Garrido C, Hermine O. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 2007; 445:102-5.
62. Rocchi P, Jugpal P, So A, Sinneman S, Ertinger S, Fazli L, Nelson C, Gleave M. Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation in vitro. *BJU Int* 2006; 98:1082-9.
63. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J* 1999; 13:2061-70.
64. Concannon CG, Orrenius S, Samali A. Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr* 2001; 9:195-201.
65. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2000; 2:645-52.
66. Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Virost S, Arrigo AP. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol* 2002; 22:816-34.
67. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Catley L, Tai YT, Hayashi T, Shringarpure R, Burger R, Munshi N, Ohtake Y, Saxena S, Anderson KC. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 2003; 102:3379-86.
68. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 1997; 110(Pt 3):357-68.
69. Arrigo AP, Virost S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:414-22.
70. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 1999; 274:18947-56.
71. Wyttenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo AP, Rubinsztein DC. Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet* 2002; 11:1137-51.
72. Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem* 2003; 278:27828-35.
73. Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 2000; 20:7602-12.
74. Rocchi P, Beraldi E, Ertinger S, Fazli L, Vessella RL, Nelson C, Gleave M. Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65:11083-93.
75. Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 2003; 23:5790-802.
76. Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A, Nakayama K, Nakayama KI, Khochbin S, Solary E, Garrido C. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *Faseb J* 2006; 20:1179-81.
77. Bruey JM, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo AP, Solary E, Garrido C. Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene* 2000; 19:4855-63.
78. Oya-Ito T, Liu BF, Nagaraj RH. Effect of methylglyoxal modification and phosphorylation on the chaperone and anti-apoptotic properties of heat shock protein 27. *J Cell Biochem* 2006; 99:279-91.
79. Benndorf R, Hayess K, Ryazantsev S, Wieske M, Behlke J, Lutsch G. Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J Biol Chem* 1994; 269:20780-4.
80. Akbar MT, Lundberg AM, Liu K, Vidyadaran S, Wells KE, Dolatshad H, Wynn S, Wells DJ, Latchman DS, de Belleruche J. The neuroprotective effects of heat shock protein 27 overexpression in transgenic animals against kainate-induced seizures and hippocampal cell death. *J Biol Chem* 2003; 278:19956-65.
81. Loones MT, Morange M. Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo. *Cell Stress Chaperones* 1998; 3:237-44.
82. Sarge KD, Cullen KE. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53:191-7.
83. Trinklein ND, Chen WC, Kingston RE, Myers RM. Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation. *Cell Stress Chaperones* 2004; 9:21-8.
84. Mehlen P, Mehlen A, Godet J, Arrigo AP. Hsp27 as a switch between differentiation and apoptosis in murine embryonic stem cells. *J Biol Chem* 1997; 272:31657-65.
85. Shakoory AR, Oberdorf AM, Owen TA, Weber LA, Hickey E, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Expression of heat shock genes during differentiation of mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *J Cell Biochem* 1992; 48:277-87.
86. Spector NL, Ryan C, Samson W, Levine H, Nadler LM, Arrigo AP. Heat shock protein is a unique marker of growth arrest during macrophage differentiation of HL-60 cells. *J Cell Physiol* 1993; 156:619-25.
87. Spector NL, Mehlen P, Ryan C, Hardy L, Samson W, Levine H, Nadler LM, Fabre N, Arrigo AP. Regulation of the 28 kDa heat shock protein by retinoic acid during differentiation of human leukemic HL-60 cells. *FEBS Lett* 1994; 337:184-8.
88. Chaufour S, Mehlen P, Arrigo AP. Transient accumulation, phosphorylation and changes in the oligomerization of Hsp27 during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells: Possible role in the control of cellular growth and differentiation. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1:225-35.
89. Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, Yoshino T, Matsukuma S, Tsuji T. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *J Appl Toxicol* 2007; 27:1-9.
90. Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Kato K. Regulation of the levels of small heat-shock proteins during differentiation of C2C12 cells. *Exp Cell Res* 2001; 266:213-21.
91. Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001; 193:247-54.
92. Grebenova D, Kuzelova K, Pluskalova M, Peslova G, Halada P, Hrkal Z. The proteomic study of sodium butyrate antiproliferative/cytodifferentiation effects on K562 cells. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 37:210-7.
93. Yamada T, Hashiguchi A, Fukushima S, Kakita Y, Umezawa A, Maruyama T, Hata J. Function of 90-kDa heat shock protein in cellular differentiation of human embryonal carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000; 36:139-46.
94. Yun BG, Matts RL. Hsp90 functions to balance the phosphorylation state of Akt during C2C12 myoblast differentiation. *Cell Signal* 2005; 17:1477-85.
95. Chen CF, Chen Y, Dai K, Chen PL, Riley DJ, Lee WH. A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4691-9.
96. Yue L, Karr TL, Nathan DF, Swift H, Srinivasan S, Lindquist S. Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in *Drosophila* spermatogenesis. *Genetics* 1999; 151:1065-79.
97. Inoue T, Hirata K, Kuwana Y, Fujita M, Miwa J, Roy R, Yamaguchi Y. Cell cycle control by daF-21/Hsp90 at the first meiotic prophase/metaphase boundary during oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ* 2006; 48:25-32.
98. Krone PH, Evans TG, Blechinger SR. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2003; 14:267-74.
99. Yun BG, Matts RL. Differential effects of Hsp90 inhibition on protein kinases regulating signal transduction pathways required for myoblast differentiation. *Exp Cell Res* 2005; 307:212-23.
100. Nimmanapalli R, O'Bryan E, Bhalla K. Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Res* 2001; 61:1799-804.
101. Yu W, Rao Q, Wang M, Tian Z, Lin D, Liu X, Wang J. The Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces apoptosis and differentiation of Kasumi-1 harboring the *Asn822Lys KIT* mutation and downregulates KIT protein level. *Leuk Res* 2006; 30:575-82.
102. Lopez-Maderuelo MD, Fernandez-Renart M, Moratilla C, Renart J. Opposite effects of the Hsp90 inhibitor Geldanamycin: Induction of apoptosis in PC12, and differentiation in N2A cells. *FEBS Lett* 2001; 490:23-7.
103. Munster PN, Srethapakdi M, Moasser MM, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function by ansamycins causes the morphological and functional differentiation of breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:2945-52.
104. Chiosis G, Timaul MN, Lucas B, Munster PN, Zheng FF, Sepp-Lorenzino L, Rosen N. A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells. *Chem Biol* 2001; 8:289-99.
105. Cullinan SB, Whitesell L. Heat shock protein 90: A unique chemotherapeutic target. *Semin Oncol* 2006; 33:457-65.

106. Plenchette S, Cathelin S, Rebe C, Launay S, Ladoire S, Sordet O, Ponnelle T, Debili N, Phan TH, Padua RA, Dubrez-Daloz L, Solary E. Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: A nuclear export signal-mediated event. *Blood* 2004; 104:2035-43.
107. Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, Mehlen P, Solary E. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res* 1998; 58:5495-9.
108. Dai C, Whitesell L. HSP90: A rising star on the horizon of anticancer targets. *Future Oncol* 2005; 1:529-40.

*Annexe IV :*

*HSP27 controls GATA-1 protein level  
during erythroid cell differentiation*

## ***HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation***

*Aurelie De Thonel<sup>1,2°</sup>, Julie Vandekerckhove<sup>3°</sup>, David Lanneau<sup>1,2</sup>, Subramaniam Selvakumar<sup>1,2</sup>, Geneviève Courtois<sup>3</sup>, Adonis Hazoume<sup>1,2</sup>, Mathilde Brunet<sup>1,2</sup>, Sebastien Maurel<sup>1,2</sup>, Arlette Hammann<sup>1,2</sup>, Jean Antoine Ribeil<sup>3</sup>, Yael Zermati<sup>3</sup>, Anne Sophie Gabet<sup>3</sup>, Joan Boyes<sup>5</sup>, Eric Solary<sup>1,2, 6</sup>, Olivier Hermine<sup>3,4\*</sup>, Carmen Garrido<sup>1,2, 6\*</sup>*

<sup>1</sup> INSERM U866, <sup>2</sup> Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21000, France. <sup>3</sup> CNRS UMR 8147, <sup>4</sup> Department of Haematology, Faculty of Medicine, University of René Descartes Paris V, APHP, Necker, Paris 75270, France. <sup>5</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds, Leeds, UK. <sup>6</sup> CHU Dijon BP1542, Dijon, France.

<sup>°</sup>*Both authors contributed equally to this work*

<sup>\*</sup>*Both authors shared the direction of the work*

*Running title: HSP27 is essential for erythropoiesis*

*Corresponding author:*

Carmen Garrido

INSERM U866

Faculty of Medicine & Pharmacy

7, boulevard Jeanne d'Arc

21033 Dijon, France

Phone : 33 3 80 39 32 84, Fax : 33 3 80 39 34 34

email : cgarrido@u-bourgogne.fr

## **Abstract**

HSP27 is a chaperone whose cellular expression increases in response to various stresses and protects the cell by either inhibiting apoptotic cell death or promoting the ubiquitination and proteasomal degradation of specific proteins. Here, we show that GATA-1 is a client protein of HSP27. In two models of erythroid differentiation, i.e. in K562 cells induced to differentiate into erythroid cells upon hemin exposure and CD34-positive human cells ex vivo driven to erythroid differentiation in liquid culture, depletion of HSP27 provokes an accumulation of GATA-1 and impairs terminal maturation. More specifically, we demonstrate that, in the late stages of the erythroid differentiation program, HSP27 is phosphorylated in a p38-dependent manner, enters the nucleus, binds to GATA-1 and induces its ubiquitination and proteasomal degradation, provided that the transcription factor is acetylated. We conclude that HSP27 plays a role in the fine tuning of terminal erythroid differentiation through regulation of GATA-1 content and activity.



## Abstract

Heat shock proteins (HSPs) are molecular chaperones whose expression is increased after many different stresses. They have a protective function helping the cell to cope with lethal conditions. These proteins play an essential role as molecular chaperones by assisting the correct folding of nascent and stress-accumulated misfolded proteins and by preventing their aggregation. My team is interested in understanding the roles of HSPs in two physiological related processes: apoptosis and cell differentiation. The aim of my work is to study the functions of HSP90 and HSP70 in macrophagic differentiation.

I first studied the role of HSP90 in macrophagic differentiation. We previously reported that cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (c-IAP1), migrated from the nucleus to the surface of the Golgi apparatus in cells undergoing differentiation. c-IAP1 is a member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family which has demonstrated functions in cell death, cell signaling and mitosis. Here, we show that c-IAP1 is a client protein of the stress protein HSP90 $\beta$ . In three distinct cellular models, the two proteins interact and migrate from the nucleus to the cytoplasm during the differentiation process through a leptomycin B-sensitive pathway. Inhibition of HSP90 proteins by small chemical molecules and specific depletion of HSP90 $\beta$  isoform by siRNA both leads to c-IAP1 degradation by the proteasomal machinery. This chaperone function of HSP90 towards c-IAP1 is specific of its  $\beta$  isoform as specific depletion of HSP90 $\alpha$  isoform does not affect c-IAP1 content. Chemical inhibition of HSP90 or siRNA-mediated depletion of HSP90 $\beta$  both inhibit cell differentiation, which can be reproduced by siRNA-mediated depletion of c-IAP1. Altogether, these results suggest that HSP90 $\beta$  prevents auto-ubiquitination and degradation of its client protein c-IAP1, whose depletion would be sufficient to inhibit cell differentiation.

The second part of my work consisted in the study of the role of HSP70 in macrophagic differentiation. We used two models of differentiation: human peripheral monocytes exposed to M-CSF and THP1 cells induced to differentiate by TPA. We found that in both models, HSP70 expression was induced during differentiation. Interestingly, the expression of Spi-1/Pu.1, a transcription factor essential for monocytes to differentiate, was similarly induced. Upon differentiation, both proteins co-localized in the nucleus and associated. Inhibition or down regulation of HSP70 induced Spi-1/Pu.1 degradation and blocks the differentiation process, indicating that the necessity of Spi-1/Pu.1 to be chaperoned by HSP70 during differentiation. Since Spi-1/Pu.1 promoter has a HSE-like, we studied whether transcription factors responsible for HSPs induction, HSF, could be involved. We show that although HSF2 do not seem involved, HSF1 binds to Spi-1/Pu.1 promoter and its inhibition blocks Spi-1/Pu.1 expression and monocytes differentiation.

So HSP90 and HSP70 are essentials for macrophagic differentiation. Understanding monocyte differentiation regulation is important since defects of the differentiation process can lead to the development of leukemias (acute myeloid leukemia, chronic myelomonocytic leukemia). A better understanding of the roles of HSPs may provide new therapeutic strategies for the treatment of these pathologies.

## Résumé

La synthèse des protéines de choc thermique (HSPs) est un moyen de défense développé par la cellule pour faire face aux diverses agressions auxquelles elle peut être soumise. En tant que chaperons, les HSPs participent aux mouvements intracellulaires des protéines, préviennent l'agrégation des protéines altérées, éliminent les protéines anormales et contribuent à la conformation correcte des peptides nouvellement synthétisés. Mon équipe d'accueil s'intéresse aux rôles des HSPs dans des processus cellulaires tels que l'apoptose et la différenciation cellulaire. Le but de mon travail de thèse consiste à étudier le rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 au cours de la différenciation des monocytes en macrophages.

J'ai dans un premier temps étudié l'implication de HSP90 dans la différenciation macrophagique. c-IAP1 est un membre de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose impliqué dans la régulation de l'apoptose, dans le cycle cellulaire et dans la signalisation cellulaire. Nous avons précédemment montré que c-IAP1 migre du noyau vers le cytoplasme au cours de la différenciation cellulaire. Nous démontrons dans ce travail que c-IAP1 est une protéine cliente de la protéine de choc thermique HSP90 $\beta$ . Dans trois différents modèles de différenciation, ces protéines interagissent et migrent ensemble du noyau vers le cytoplasme au cours de la différenciation cellulaire. L'inhibition de HSP90 ou la déplétion spécifique de l'isoforme  $\beta$  par des siRNA conduisent à sa dégradation par le protéasome. La fonction de chaperon moléculaire de HSP90 envers c-IAP1 est spécifique de l'isoforme  $\beta$  car la déplétion de l'isoforme  $\alpha$  n'a pas d'effets sur c-IAP1. De plus l'inhibition de HSP90 ou la déplétion de HSP90 $\beta$  bloquent la différenciation cellulaire tout comme la déplétion de c-IAP1 par siRNA.

La deuxième partie de mon travail a consisté à étudier le rôle de HSP70 dans la différenciation macrophagique. Nous montrons que cette protéine est fortement induite après stimulation des cellules par le facteur de croissance M-CSF et que son inhibition bloque la différenciation des monocytes en macrophage. HSP70 interagit avec la protéine Spi-1/Pu.1, facteur de transcription clé de la différenciation macrophagique. L'expression de Spi-1/Pu.1 augmente également au cours de la différenciation macrophagique et ce de manière similaire à celle de HSP70. Ceci suggère l'implication des facteurs de transcription responsables de l'induction des HSPs, les Heat Shock Factor (HSFs). L'étude du promoteur de Spi-1/Pu.1 a révélé la présence d'une séquence ressemblant fortement aux éléments de réponse classiques sur lesquels se fixe HSF1. HSF1 est capable de se fixer sur le promoteur de Spi-1/Pu.1 et l'inhibition de HSF1 bloque l'expression de Spi-1/Pu.1. HSF1 participe donc au contrôle de l'expression de Spi-1/Pu.1 lors de la différenciation macrophagique.

HSP90 et HSP70 sont donc essentielles à la différenciation macrophagique. Comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les voies de différenciation se révèle extrêmement important puisque des altérations des mécanismes de l'hématopoïèse sont retrouvées dans plusieurs types de leucémies (leucémies aiguës myéloblastiques et leucémies myélo-monocytaires chroniques). Connaître le rôle des HSPs dans la différenciation cellulaire permettrait donc de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de ces pathologies.

