



HAL
open science

Inhibition de HSP70 : une nouvelle piste thérapeutique contre le cancer

Jessica Gobbo

► **To cite this version:**

Jessica Gobbo. Inhibition de HSP70 : une nouvelle piste thérapeutique contre le cancer. Biologie cellulaire. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS088 . tel-01930925

HAL Id: tel-01930925

<https://theses.hal.science/tel-01930925>

Submitted on 22 Nov 2018

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

UFR de Médecine

Ecole Doctorale Environnements - Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Science Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée le 19 Novembre 2013

Par **Jessica GOBBO**

Inhibition de HSP70 : une nouvelle piste thérapeutique contre le cancer

Directeur de thèse : Dr. Carmen GARRIDO

Membres du jury :

Président du Jury : Pr. François GIRODON
Rapporteurs : Dr. Daniel OLIVE
Dr. Patrick MEHLEN
Examineurs : Dr. Pierre COLAS
Dr. Maria CASTEDO
Invité d'honneur : Dr. Dominique DELMAS
Directeur de thèse : Dr. Carmen GARRIDO

Je dédie ma
thèse à mon fils Luca

La persévérance :

« Reste devant la porte si tu veux qu'on te l'ouvre. Ne quitte pas la voie si tu veux qu'on te guide. Rien n'est fermé jamais, sinon à tes propres yeux. »

Attar (Farid al-Din)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les membres du Jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail malgré leurs obligations professionnelles. Je remercie le **Docteur Patrick Mehlen** et le **Professeur Daniel Olive** d'avoir accepté d'être rapporteur pour ce travail et le **Docteur Pierre Colas** et le **Docteur Maria Castedo** pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Je remercie également le **Professeur François Girodon** d'avoir accepté d'être le président du Jury. Un grand merci au **Docteur Dominique Delmas**, qui m'a accompagnée dans mes premiers pas en recherche.

J'exprime mes profonds remerciements à ma directrice de thèse, **Carmen**, pour m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse dans son équipe et pour son encadrement durant ces 4 années. Un grand merci pour toutes ces connaissances que tu m'as transmises, pour ton écoute attentive, pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès scientifiques et pour ton œil critique qui m'a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différents travaux. Je garderai en mémoire ta gentillesse, ton accessibilité et ton dynamisme. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à tes qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Pour tout cela, je tenais à t'exprimer toute ma reconnaissance.

Je remercie également **Laurent Lagrost**, Directeur de l'unité Inserm-UMR866, qui travaille d'arrache-pied pour nous permettre de réaliser nos thèses dans d'excellentes conditions de travail et rendre cette unité encore plus performante.

Je tiens aussi à remercier le **Professeur Norbert Latruffe** qui durant mes études universitaires m'a accompagnée et guidée dans les choix qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici.

Je remercie de tout cœur le **Conseil régional de Bourgogne** et la **Ligue contre le cancer**, qui m'ont financée durant les quatre années de thèse et qui m'ont permis de réaliser ce travail très enrichissant. J'espère que ces travaux permettront d'améliorer les traitements anticancéreux actuels et de sauver des vies.

Je remercie également tous les membres du plateau technique d'histologie/ microscopie : **Benoit**, **Amandine** et **André** (Et tous ceux que j'ai oublié).

Je remercie chaleureusement **tous les étudiants** de l'unité Inserm-UMR866 avec qui j'ai partagé d'excellents moments et leur souhaite bon courage pour la suite.

Merci aussi à l'équipe EPHE : **Stéphanie, Catherine, Carla, Maria, Cédric, Ali et Jean François** pour leur bonne humeur.

Merci à **Jean-François (Jeff)** pour tous les services qu'il m'a rendu.

Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des personnes avec qui j'ai collaboré lors de ma thèse : **Yann Pellequer, Victor, Manu, Bertrand, Alexandra, Nicolas et Claire**. C'est un plaisir de travailler avec vous. Merci pour votre aide et j'espère que ces collaborations permettront de faire avancer la recherche dans le domaine de la cancérologie.

Merci à toute l'équipe Ghiringhelli que je considère un peu comme ma deuxième équipe: je remercie **Hélène, Fred et Angélique**, vous êtes toutes les trois des filles géniales, je vous souhaite que du bonheur. Merci aussi à **Grégoire, Emeric, Alexia et Alexandra** avec qui j'ai pu discuter de temps en temps avec plaisir. Je tiens à remercier plus particulièrement **Cédric** pour tous ses conseils en immunologie, **Valentin** pour ses conseils pour les manips et ses blagues et **Lionel** pour ses conseils pour la poursuite de ma carrière professionnelle.

Je tiens à remercier plus particulièrement :

Renaud, arrivé dans l'équipe après le début de ma thèse, tu m'as pris sous ton aile tout le reste du temps. Tu m'as encadrée et soutenue au quotidien dans mes travaux. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi et ta vision de la recherche. Un grand merci pour avoir pris soin de moi, pour ton écoute et tous tes conseils. Je garderai vraiment de très bons souvenirs de toi.

Chris, arrivée il y a deux ans seulement mais quel bonheur de te connaître nous avons tellement de points communs que j'ai l'impression de te connaître depuis toujours. Je te remercie pour ton écoute attentive et tes conseils avisés. Renaud et Chris (et bien sûr Evan et Nolan), ma petite famille « Seigneuric », vous comptez beaucoup pour moi. Quel que soit mon avenir, vous resterez toujours près de moi.

Aurélie, tu es vraiment extraordinaire. Heureusement que tu étais là pour moi, ton soutien m'a permis d'avancer et de tenir le coup pour réaliser ma thèse dans cette équipe, tu as su me redonner de l'énergie dans les moments les plus critiques. Même depuis quelques temps loin de moi (merci les téléphones mobiles !), tu m'as toujours aidée que ce soit au niveau professionnel ou personnel, je ne pourrais jamais trop te remercier. Pour moi, tu es un essentiel pour l'équipe. Je te souhaite d'avoir une vie épanouie avec toute ta petite famille.

Guillaume, arrivé pour réaliser ton M2R, tu as beaucoup évolué depuis, tu as pris de l'assurance et de l'autonomie et un peu de ma rapidité (lol !!). Je tenais à te dire un énorme merci pour ton aide précieuse au quotidien (même tard le soir, merci d'avoir fait une sauvegarde de ma thèse, tu m'as sauvée ☺). Merci pour toutes les fois où tu as finalisé mes manip lorsque je devais absolument partir pour récupérer mon fils à la crèche et pour m'avoir transmis de temps en temps ta patience. J'ai vraiment apprécié travailler avec toi. Bon courage pour la suite du projet (enfin des projets !!). Je te souhaite de réaliser une brillante thèse (c'est bien parti). Je te suis extrêmement reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi, sache que si tu as besoin, je serai là pour toi même après mon départ.

Alexandrine, dès mon arrivée c'est toi qui m'a accueillie, j'ai logé longtemps dans ton bureau ce qui a permis de tisser des liens. Merci pour ton soutien et tes encouragements durant mes débuts difficiles. Merci aussi pour ta présence au quotidien (pour les commandes urgentes et tout le reste !!!) tout au long de ces quatre années.

Sophie, tu es restée peu de temps avec nous, c'est la vie qui l'a décidé. Tu vas beaucoup nous manquer. Bientôt maman, tu verras c'est super, profite bien de ta grossesse. Je serai toujours là pour toi si besoin.

Margaux, la petite princesse du labo et la future petite chef ☺. Tu es arrivée en M1, je t'ai encadrée, nos débuts ont été difficiles. Puis en M2 et maintenant en thèse, tu as bien évolué. J'ai appris à te connaître et à t'apprivoiser (☺). Tu es une fille super gentille (avec un caractère bien trempé quand même !!), avec un petit cœur ultrasensible. Avec tes expressions bien à toi du style : c'est comment la déco dans le lasergame, réponse : euh, ben on est dans le noir, (lol), tu m'as bien fait rire. Je serai là pour toi même après mon départ. Je te souhaite tout le bonheur possible pour la suite.

Lucile et Lydie, merci pour l'ensemble des services que vous avez réalisé pour moi, aussi pour votre sympathie et votre gentillesse.

Cindy, nous nous sommes de plus en plus rapprochées ces derniers temps. J'ai découvert une personne vraiment très sympathique, simple comme j'aime beaucoup. Jeune maman comme moi, je te souhaite tout le bonheur possible avec ta petite famille.

Mag, de nature discrète, mais avec du caractère, je t'apprécie énormément, malheureusement nos vies font que nous avons passé peu de moment ensemble ces derniers temps. Un petit clin d'œil aussi à **Rémi** qui me fera toujours rire. Vous voilà jeunes mariés (merci pour cette superbe journée), je vous souhaite tout le bonheur possible. J'espère de tout cœur que je pourrais être un peu plus présente dans les bons moments à venir de votre vie (je pense que tu vois ce que je veux dire ☺).

Julie Debermont, merci pour tes conseils et ton soutien surtout en ce moment. Je n'oublie pas de remercier aussi ton cher et tendre **Tarik**. Bientôt parents vous vous lancez dans une belle aventure. Je serai là pour vous si besoin.

Arlotte, tu es vraiment géniale, tu mets l'ambiance dans l'équipe avec toute ton énergie. Toujours partante pour tout (surtout pour boire un coup, lol). Heureusement que tu es là. Je te remercie également pour l'ensemble des expériences que tu as réalisées pour moi et tous tes conseils.

Annabelle, merci pour ton soutien et tes encouragements lors de mes coups de blues.

Julien, j'ai passé peu de temps avec toi. Mais, j'ai pu te connaître et t'apprécier. Je n'oublie pas pour l'invitation chez moi, t'inquiète!! Je te souhaite de belles choses pour la suite.

Kevinou, tu es très discret et timide, mais dessous cette carapace j'ai pu entrevoir une personne de caractère. Je te souhaite de réussir, tu le mérites.

Olivier, je te découvre de jour en jour, et j'apprécie vraiment la personne que tu es : drôle et sympathique. Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Seb, tu es arrivé depuis peu dans l'équipe mais j'ai pu apprécier nos discussions où j'ai appris de nombreuses choses pour le travail ou sur ta passion : l'art médiéval.

Antoine, merci pour toutes tes blagues décalées, bon courage pour la fin de la thèse.

Pierre, nous sommes dans le même bateau puisque tu passes ta thèse quelques jours avant moi. Lors de ces 3 ans passés ensemble dans l'équipe, j'ai découvert une personne très agréable, en qui on peut avoir confiance. Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Victor, tu es arrivé en M2R et maintenant en thèse, merci pour tes conseils en anglais. Je te souhaite bonne chance pour ta thèse.

Guillaume Conte, bon courage pour ton M2R.

Je n'oublie pas ceux qui ne sont plus au laboratoire, mais avec qui j'ai passé de bons moments, **Hajare, Fanny, Adonis et Ludivine**.

Je tiens aussi à remercier tous mes amis proches: **Sandrine, Sylvain, Anaïse, Joselin, Joséphine, Fanny, Benoit, Nastasia et Sandralyne, Manue, Julie C, Jessica, Romain**. Merci à tous pour votre amitié, votre soutien et tous ces agréables moments passés ensemble.

Enfin un merci spécial pour **Mélanie**, qui a commencé l'aventure des études scientifiques en même temps que moi il y a 9 ans. Depuis notre rencontre, nous avons pris le même chemin sans jamais se quitter (je nous revois encore dans le bureau de Norbert Latruffe afin de lui demander de changer de filière ensemble ou encore partir comme fille au pair). Ta présence auprès de moi a été vitale durant mes études. Tous ces souvenirs avec toi, les joies, les pleurs, aucun mot ne sera assez fort pour exprimer mon ressenti. Tous ces moments sont gravés au fond de moi et me permettent de tenir lorsque tu seras loin. Bien plus qu'une simple amitié pour moi, ... tu sais que tu comptes beaucoup pour moi.

Je remercie ma belle-famille : **Monique, Didier, Ingrid, Séverine, Cédric, Damien**. Je sais que pour vous mon travail reste très abstrait, cependant vous avez tous été là pour me soutenir moralement et m'écouter. Merci à tous pour votre aide lors de ces derniers mois avec Luca.

Je terminerais en remerciant ma famille. Tout d'abord mes parents, merci d'avoir toujours cru en moi. Qui aurait pu croire un jour me voir ici en train de passer mon doctorat.

Papa, j'ai fait le choix de faire des études scientifiques, pourtant je sais que tu aurais aimé apprendre ton métier à ma sœur et à moi. Je voulais te dire merci pour m'avoir laissé le choix de faire ce qu'il me plaît. Malgré tout tu m'as transmis l'amour des pierres, ton côté créatifs (pour le dessin et la peinture) et de nombreuses valeurs de la vie qui font de moi, ce que je suis aujourd'hui. Papa, un énorme merci pour tout cela.

Maman, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir. Merci de m'avoir soutenu et défendu dans mes choix d'études surtout en 3^{ème}, sinon, je n'aurais pas pu en arriver là. Tu m'as appris à être battante et à me dépasser, tout cela m'a permis d'arriver aujourd'hui en doctorat. Je sais que je suis peu expressive sur mes sentiments, je tenais à te dire que rien ne peut remplacer l'amour d'une maman.

Mémé Collin, tu as toujours été là pour moi, tu me donnes tant d'amour. Je me souviendrais de tous ces petits plats que tu préparais pour moi au début de mes études. Tu es vraiment très importante pour moi. Encore aujourd'hui, tu es toujours présente et j'ai besoin de toi, tu es vraiment une mamie géniale. J'ai vraiment de la chance de t'avoir près de moi et Luca aussi.

Pépé et Mémé, merci pour avoir toujours pris soin de moi depuis que je suis toute petite. Merci pour votre aide, pour m'avoir transmis certaines valeurs de la vie et votre soutien tout le long de mes études. Votre présence en ce jour est importante pour moi. J'aimerais tellement que vous soyez moins loin de nous pour voir Luca grandir, il change tellement vite. Je vous embrasse fort.

Ma sœur, nous avons grandi ensemble, puis le temps a passé et nous avons construit nos vies. Je sais que la vie n'est pas simple pour toi, mais sache que je suis là pour t'aider et te donner des conseils de grande sœur. Je te souhaite de trouver le bonheur. Un grand merci pour ton aide ces derniers temps.

Tata, depuis toute petite tu as toujours été là pour moi et tu as toujours cru en moi. Je me rappelle encore lorsque que tu venais me chercher au lycée, j'étais trop heureuse, que le temps a passé vite. La vie n'a pas forcément été facile avec toi, mais tu as toujours réussi à t'en sortir. Je serai toujours là pour toi. Je te souhaite de trouver le bonheur, ma tata.

Tonton et Tata Valérie (Chloé et mimi) merci pour votre soutien et votre présence.

Enfin, **Mick**, à mes côtés depuis longtemps déjà, ta présence est vitale pour moi. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique. Je sais que tu as beaucoup souffert lors de mes études d'être loin de moi, malgré les hauts, les bas, nous y sommes arrivés. Je tenais à te dire merci pour m'avoir laissé réaliser mes ambitions, de m'avoir soutenue à ta façon et de m'avoir supporté dans mes moments de stress. Aujourd'hui, nous avons construit une famille avec notre fils Luca. Nos conditions de vie ne sont pas idéales pour une famille, je ne sais pas encore combien de temps cela va durer mais je te demande de patienter encore quelques temps. Je t'embrasse très fort.

Luca, mon fils chéri, tu es encore tout petit, mais déjà tellement précieux à mes yeux. C'est fou comme tu changes trop vite. Je voulais te dire mon ange que Maman tient énormément à toi, je sais que ces derniers temps auront été difficiles pour toi mais je profite de chaque instant avec toi. Tu es tellement extraordinaire mon petit bout, je t'embrasse très fort.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour **Madeleine, Emilie et Grand-père carotte** qui ont beaucoup compté pour moi, mais qui nous ont quittés trop tôt.

Malheureusement, je ne peux pas citer toutes les personnes que j'ai rencontré durant mon parcours et qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de cette thèse, je leur dis à toutes merci d'avoir été là.

A tous, je voudrais vous dire un grand merci pour votre soutien qui m'a permis d'aller au bout de cette belle et longue aventure : Ma Thèse

Abstract

Heat shock proteins (HSPs) were first discovered in *Drosophila* by Ritossa in 1962. As stress proteins, HSPs are induced in response to a wide variety of physiological and environmental insults. HSPs have a cytoprotective function and act as molecular chaperones by assisting the folding of nascent or misfolded proteins and by preventing their aggregation. Mammalian HSPs have been classified into 5 families according to their molecular weight: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 and the family of small HSPs such as HSP27 (Kampinga et al., 2009). The most well-known inducible stress chaperone HSP70 is hardly detectable at basal level in normal “non-stressed” cells, but in cancer cells HSP70 is constitutively highly expressed. In that respect, this HSP play a key role in oncogenesis and in resistance to chemotherapeutic drugs (Goloudina et al., 2012).

Until now, the cytoprotective properties of HSP70 were attributed to its intracellular functions mainly *via* its ability to block the apoptotic process at key points of the signal (Ravagnan et al., 2001). More recently, a membrane bound form of HSP70 was detected but also at the surface of exosomes derived from tumor cells but not non-cancerous cells (Kuppner et al., 2001). Moreover, growing evidence support the critical role of this membrane-bound HSP70 in the process of tumorigenesis (Pfister et al., 2007; Schmitt et al., 2007) *via* the activation of myeloid suppressor cells (MDSCs), which inhibit the anti-tumor immune response (Chalmin et al., 2010). Thereby, HSP70 by this dual action represents an attractive target for new anti-cancer therapy.

In that aim, we developed specific inhibitors of HSP70, including peptide aptamers and peptides. In this work, we demonstrated that two aptamers A8, A17 (and the peptide P17), interact with different domains of HSP70 and, significantly sensitized cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. Accordingly, *in vivo* studies in mice and rats showed a significant reduction of tumor growth by these inhibitors. Finally, we generate an A8 derived peptide called P8.1 that specifically neutralized the extracellular region of HSP70 at the surface of exosomes. Our results demonstrated that this peptide P8.1 inhibits MDSC activation and restored the antitumor immune response *in vitro* and *in vivo*, respectively.

Overall, our work will help to develop and validate more effective cancer therapy based on the association of conventional chemotherapy with HSP70 inhibitors.

Keywords: HSP70, exosome, cancer, inhibition, therapy.

Table des matières

Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
Liste des annexes	vi
Abréviations	vii
Introduction	1
I. Les protéines de choc thermique (HSP)	2
a. Synthèse des HSPs	4
b. Classification.....	5
c. Structure des principales HSPs.....	6
i. HSP27	6
ii. HSP70	7
iii. HSP90	8
iv. HSP110	8
II. HSPs intracellulaires	9
a. Activité de chaperon moléculaire.....	10
b. Activité anti-apoptotique	12
i. L'Apoptose : généralités	12
ii. Rôles des HSPs dans la voie extrinsèque de l'apoptose.....	13
iii. Rôles des HSPs dans la voie intrinsèque de l'apoptose.....	13
c. Autres fonctions intracellulaires.....	14
d. Cancer et expression des HSPs intracellulaires	15
i. HSP27 et cancer.....	15
ii. HSP70 et cancer.....	16
iii. HSP90 et cancer.....	16
iv. HSP110 et cancer.....	16
III. HSPs extracellulaires	17
a. Comment les HSPs peuvent se retrouver à l'extérieur de la cellule ?.....	18
b. Fonction extracellulaire de HSP70	19
i. Rôle de HSP70 sous sa forme libre	20
ii. Rôle de HSP70 associée aux membranes.....	22
c. Les exosomes : généralités.....	23

i.	Découverte des exosomes	24
ii.	Biogénèse des exosomes.....	25
1.	Formation des vésicules intralunimales et adressage des molécules aux exosomes.....	26
2.	Fusion des MBVs avec la membrane plasmique.....	27
3.	Régulation de la sécrétion des exosomes.....	28
iii.	Composition des exosomes.....	29
1.	Les protéines	29
2.	Les lipides.....	30
3.	Les acides nucléiques	30
iv.	Rôle des exosomes dans le système immunitaire.....	32
v.	MDSCs	33
1.	Expansion et activation des MDSCs	34
2.	Mécanismes et effets immunosuppresseurs des MDSCs	35
IV.	Les inhibiteurs des HSPs	37
a.	HSP27 une cible thérapeutique.....	37
b.	HSP90 une cible thérapeutique.....	37
i.	Les inhibiteurs naturels.....	38
ii.	Les inhibiteurs de synthèse	39
c.	HSP70 une cible thérapeutique.....	41
i.	Inhibiteurs liant le PDB.....	41
ii.	Inhibiteurs ciblant l'ABD	42
iii.	Inhibiteurs des co-chaperons de HSP70.....	42
V.	Objectifs de la thèse.....	44
Résultats	46	
Article 1:	48	
Article 2 :	70	
Un pas vers la clinique	98	
Discussion	105	
I. Article 1 : Peptides and aptamers targeting HSP70 : a novel approach for anticancer chemotherapy	105	
a.	Influence de l'administration du traitement de manière endogène <i>versus</i> exogène	105
b.	P17, un « candidat-médicament ».....	106
II. Article 2: Restoring anticancer immune response by targeting tumor-derived exosomes with a HSP70 peptides inhibitor.....	106	

a.	HSP70 à la membrane des cellules cancéreuses peut elle activer les MDSCs ?	106
b.	Effets activateurs et inhibiteurs des exosomes sur le système immunitaire	107
c.	Action indirecte de P8.1	108
III.	Discussion générale	108
a.	HSP70, une potentielle cible thérapeutique	108
i.	Vectorisation des inhibiteurs de HSP70	108
ii.	Inhibition de HSP70 intracellulaire et extracellulaire : action synergique ?	109
iii.	Effet synergique du co-traitement avec les inhibiteurs de HSP70 et le cisplatine	110
iv.	Y a-t-il un avantage à combiner les inhibiteurs des HSPs ?	111
b.	HSP70 un biomarqueur potentiel	111
	Conclusions et perspectives	113
	Annexes.....	116
	Bibliographie.....	121

Liste des tableaux

Tableau 1 :

Les différentes conditions auxquelles répondent les HSPs dans la cellule.

Tableau 2 :

Principales caractéristiques des HSFs.

Tableau 3 :

Classification des HSPs.

Tableau 4 :

Les principales caractéristiques des HSPs.

Tableau 5 :

Liste des inhibiteurs de HSP90 en essai clinique

Liste des figures

Figure 1 : Structure de HSP27.

Figure 2 : Structure des HSPs de haut poids moléculaire.

Figure 3 : Représentation schématique du mécanisme chaperon de HSP70.

Figure 4 : Schéma récapitulatif du rôle anti-apoptotique des HSPs dans les deux voies de l'apoptose.

Figure 5 : Effets de HSP70 libre sur le système immunitaire.

Figure 6 : Visualisation des exosomes par microscopie électronique à transmission.

Figure 7 : Voie de biogenèse des exosomes tumoraux et acteurs moléculaires impliqués.

Figure 8 : Composition des exosomes.

Figure 9 : Effets des exosomes sur le système immunitaire.

Figure 10 : Activation des MDSCs.

Figure 11 : Mécanismes et effets immunosuppresseurs des MDSCs.

Figure 12 : Les inhibiteurs de HSP70.

Figure 13 : Représentation schématique d'un aptamère peptidique.

Figure 14 : Représentation schématique de mes objectifs de thèse.

Figure 15 : Structure chimique de l'agent chélatant utilisé pour le marquage des molécules.

Figure 16 : Test d'activité des aptamères modifiés chimiquement par le DOTAGA.

Figure 17 : Test d'activité de A17 marqué par l'indium froid.

Figure 18 : Radiochromatogramme du composé A17 marqué à l'indium 111.

Figure 19 : Synthèse de mes travaux de thèse.

Figure 20 : Exosomes isolés de l'urine d'un donneur sain.

Liste des annexes

Annexe 1 :

Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, Jego G, Wanherdrick K, Joly AL, Buhard O, **Gobbo J**, Penard-Lacronique V, Zouali H, Tubacher E, Kirzin S, Selves J, Milano G, Etienne-Grimaldi MC, Bengrine-Lefèvre L, Louvet C, Tournigand C, Lefèvre JH, Parc Y, Tiret E, Fléjou JF, Gaub MP, Garrido C, Duval **Nat Med.2011.**

Annexe 2 :

Quantification of HSP27 and HSP70 molecular chaperone activities. **Gobbo. J**, Caroline Gaucher-Di-Stasio, Stéphanie Weidmann, Jean Guzzo and Carmen Garrido. **Methods Mol Biol .2011.**

Annexe 3 :

Targeting cancer with peptide aptamers. Seigneuric R, **Gobbo J**, Colas P, Garrido C. **Oncotarget. 2011**

Annexe 4 :

Heat shock proteins as danger signals for cancer detection. Seigneuric, R., H. Mjahed, **Gobbo. J**, A.-L. Joly, K. Berthenet, S. Shirley, and Garrido, C. **Front Oncol. 2011**

Abréviations

A8 : Aptamère peptidique 8

A17: Aptamère peptidique17

ABD: ATP Binding Domain

ADD70: AIF-Derived Decoy for HSP70

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine Di-Phosphate

AIF: Apoptosis Inducing Factor

AKT: Protéine Kinase B

Apaf-1: Apoptotic Protease-Activating
Factor 1

ARN: Acide RiboNucléique

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

Alix

BLI: BiLayer Interferometry

CAD: Caspase Activated DNase

CD : Cellule Dendritique

CMH : Complexe Majeur

d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

DISC : Death Inducing Signaling Complex

DOTA : 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-
tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)
tetraacetic acid

DOTAGA : DOTA Glutaric Acid

eIF4G: eukaryotic translation initiation
factor 4G

ESCRT: Endosomal Sorting Complex
Responsible for Transport

FADD: Fas-Associated Death Domain
protein

GAPDH: GlycerAldehyde 3-Phosphate
DesHydrogenase

GIST Gastro-Intestinal Stromal Tumor

GDP: Guanosine Di-Phosphate

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony
Stimulating Factor

GTPases: Guanosine Tri-Phosphatases

Her-2: Human Epidermal Growth Factor
Receptor-2

HSC70 : Heat Shock Cognate 70

HSEs: Heat Shock Elements

HSF: Heat Shock Factor

HSP: Heat Shock Protein

I κ B α : Inhibitor of kappa B

IL : InterLeukine

ILV : Vésicule IntraLuminale

JAK : JAnus Kinase

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

LFA-1: Lymphocyte Function-Associated Antigen-1

LPS: LipoPolySaccharide

LT: Lymphocyte T

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Light

MAPKAP: Mitogen-Activated ProteinKinase-Activated Protein Kinase

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells

MVB: MultiVesicular Bodies

MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene (88)

NEF: Nucleotide Exchange Factor

NF- κ B: Nuclear Factor -kappa- B

NK: Natural Killer

NSCLC: Non small-cell lung cancer

P8: séquence variable de A8

P8.1 : séquence variable de A8

P17 : séquence variable de A17

p53 : protéine 53

PBD: Peptide Binding Domain

PES: 2-PhenylEthyneSulfonamide

PP2A: Protein Phosphatase 2

PPR: Pattern Recognition Receptors

PS: Phosphatidyl-Serine

Rab: Ras-related in brain

RIP: Receptor Interacting Protein

ROS : Espèces Oxygénées Réactives

SNARE : Soluble NSF Attachment Protein Receptor

SPECT: Single Photon Emission Tomography

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

Tem : Tetraspanin-enriched-microdomain

TLR: Toll Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRAIL: Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Treg: Cellule T régulatrice

Tsg101: Tumor Suppressor Gene 101

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

5-FU : 5-FluoroUracile

17-AAG : 17-allylaminogeldanamycine

17-DMAG : 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin

Introduction

I. Les protéines de choc thermique (HSP)

Les protéines de choc thermique (HSPs, Heat Shock Protein), sont encore appelées protéines de stress. Ces protéines sont des chaperons moléculaires qui protègent les cellules contre diverses agressions et assurent leur survie. La réponse cellulaire au stress a été mise en évidence il y a plus de cinquante ans par le scientifique Italien Ferruccio Ritossa. Par un heureux hasard, il trouva que les cellules de drosophile exposées à une température élevée présentaient une augmentation d'activité chromosomale au niveau des chromosomes géants appelés polythènes, trouvés dans les glandes salivaires. Ritossa très intrigué par cette observation, répéta cette expérience avec les contrôles appropriés. La réponse au « heat shock » était née (Ritossa, 1962). Ritossa a eu de nombreuses difficultés à publier cela, car cette découverte était considérée par les grands journaux scientifiques sans intérêt physiologique. A cette époque, les journaux scientifiques étaient bien loin d'imaginer les répercussions de cette découverte dans la recherche médicale de nos jours. Ses conclusions ont donc été publiées dans le journal *Experientia*, qui n'existe plus de nos jours. L'identification des protéines de choc thermique fut découverte seulement douze années plus tard par le Professeur Tissieres. A la suite de cela, ces protéines ont été décrites comme un ensemble de protéines qui s'accumulent dans la cellule après un choc thermique. En 1982, l'équipe de Schlessinger démontra que ces protéines sont très conservées au cours de l'évolution et retrouvées de la bactérie jusqu'à l'homme (Lindquist, 1986).

Actuellement, l'importance et l'impact de la réponse des HSPs sont reconnus comme jouant un rôle majeur dans la survie cellulaire (Schmitt et al., 2007) faisant suite à différentes conditions de stress. Deux catégories de stress sont identifiées: le stress environnemental et le stress pathologique classées en sous-catégories détaillées dans le Tableau 1 (Macario & Conway de Macario. 2005). Brièvement, le stress environnemental inclut le choc dû à la chaleur, au froid, aux irradiations et à l'alcool ou autres produits chimiques. Par ailleurs, le stress pathologique peut être causé par les infections virales et bactériennes ou le cancer. L'ensemble de ces stress est considéré comme des stress protéotoxiques. En effet, l'exposition d'une cellule à un stress induit dans la cellule quatre 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 et toxiques pour la cellule. La seconde étape de la réponse au choc thermique, se caractérise par l'activation transcriptionnelle des gènes *HSP*, et la synthèse des protéines HSPs dites inductibles. Puis,

vient la phase de récupération durant laquelle les altérations vont être corrigées par les protéines HSPs. Dans ce cas, les HSPs sont considérées comme des chaperons moléculaires. Enfin, l'activation des gènes *HSP* est interrompue et les HSPs retrouvent leur niveau basal. Cette fonction de chaperon moléculaire confère un rôle essentiel aux HSPs dans la protection de la cellule soumise à ces différents stress. Les HSPs sont également essentielles à la cellule dans des conditions physiologiques (Tableau 1). Dans ce cas, les HSPs participent à de nombreux processus cellulaires tels que la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire.

Catégories	Type de stress	Description
Stress environnementaux	Chimique	Alcool (éthanol, méthanol, propanol), Anesthésique, Nicotine, Insecticides
	Mécanique	Compression, Etirement, Cisaillement
	Métaux	Zinc, Aluminium, Mercure, Nickel
	Nutritionnelle	Privation de nombreux composants nutritionnels (carbone, glucose, nitrogène, phosphate et nitrate)
	Osmotique	Changements de concentration de sels, sucre, et autres osmolarités
	Oxygène	Tous les dérivés des radicaux libres, peroxyde d'hydrogène, hypoxie, anoxie
	pH	Alcalin, Acidose
	Physique	Chaleur , Froid, Irradiation (UV)
	Psychologique	Emotions, Conflit, Déséquilibre hormonal (hypothalamus)
Stress pathologiques	Biologique	Infection virales et bactériennes, Inflammation, Maladies auto-immunes, Fièvre, Ischémie, Cancer
	Chimique	Médicaments, Traitement anticancéreux
Stress physiologiques	Biologique	Différenciation cellulaire, Croissance, Prolifération, Cycle cellulaire

Tableau 1 : Les différentes conditions auxquelles répondent les HSPs dans la cellule.

a. Synthèse des HSPs

La réponse au choc thermique se traduit par l'activation et à la translocation dans le noyau du facteur de transcription HSF pour "heat shock factor". Ce dernier reconnaît des séquences spécifiques, présentes en copies multiples dans le promoteur d'un gène *HSP*, appelés : les HSEs pour "heat shock elements" (Amin, Ananthan, & Voellmy, 1988). Un seul type de HSF chez la levure et la drosophile a été identifié. Par contre une famille multigénique de HSF est retrouvée chez les plantes, les animaux et l'homme (De Thonel, Mezger, & Garrido, 2011). HSF1 et HSF2 sont retrouvés chez les mammifères, ils sont localisés de façon ubiquitaire, HSF3 est décrit chez les oiseaux et récemment a été découvert chez la souris. Enfin, HSF4 est présent chez l'homme, les oiseaux et les rongeurs. Ce dernier est préférentiellement exprimé dans le cœur, le pancréas, les muscles et le cerveau. Les HSFs présentent différents rôles répertoriés dans le Tableau 2. De manière générale, HSF1 et HSF3 agissent comme des activateurs transcriptionnels répondant aux stress, alors que HSF2 est activé durant des stades spécifiques du développement embryonnaire ou la différenciation cellulaire ou lors de l'inhibition du protéasome dépendant de l'ubiquitine (Kallio et al., 2002; Ostling, Björk, Roos-Mattjus, Mezger & Sistonen, 2007). HSF4 agirait plutôt comme un modulateur dans le développement et la maintenance des organes sensoriels (Fujimoto et al., 2004).

Chez les mammifères, HSF1 est considéré comme le facteur majeur d'activation transcriptionnelle dans les conditions de stress cellulaire. Il a été démontré que la déficience pour le gène *Hsf1* abolit totalement l'induction de l'expression des principales HSPs après un choc thermique (McMillan, Xiao, Shao, Graves, & Benjamin, 1998; X. Xiao et al., 1999). HSF1 est composé de plusieurs domaines auxquels une fonction spécifique est attribuée: un domaine de liaison à l'ADN, un second responsable de la trimérisation de HSF qui est une étape nécessaire à son activation, un troisième permettant l'activation transcriptionnelle et, adjacent à ce dernier, une séquence dont le rôle semble être de supprimer l'activité de HSF par le biais d'une liaison avec le domaine de trimérisation. En l'absence de stimulation, HSF1 est retenu dans le cytoplasme sous forme de monomère inactif. L'activité de liaison à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) ainsi que le domaine de transactivation transcriptionnelle sont réprimés par des interactions intramoléculaires et des phosphorylations constitutives des résidus sérine (S121, S303/307). Lorsque la cellule subit un stress, la répression de HSF1 est levée conduisant à la formation d'un trimère ayant une haute affinité pour les HSEs des promoteurs de gènes *HSP*, permettant ainsi la synthèse des HSPs.

Types HSF	Conservation dans les espèces	Localisation	Rôle
HSF1	Humain, Oiseaux, Souris	Ubiquitaire	- Contrôle de la réponse cellulaire en fonction des conditions de stress - Développement et maintenance des cellules immunitaires - Oogenèse
HSF2	Humain, Oiseaux, Souris	Ubiquitaire	- Développement embryonnaire du cerveau et des gamètes - Différenciation cellulaire - Inhibition du protéasome
HSF3	Oiseaux, Souris	Ubiquitaire	Contrôle de la réponse cellulaire en fonction des conditions de stress
HSF4	Humain, Oiseaux, Souris	Cœur, Pancréas, Muscles, Cerveau	Développement et maintenance des organes sensoriels (épithélium olfactif)

Tableau 2 : Principales caractéristiques des HSFs.

b. Classification

Bien que les HSPs partagent un grand nombre de propriétés communes, chaque famille, présente en plus de leur poids moléculaires, des particularités propres comme : la structure, la localisation intracellulaire, leur expression (inductible/constitutive) et leur dépendance à l'ATP (Adénosine TriPhosphate) ou non.

Chez les mammifères, les HSPs sont regroupées en cinq principales familles classées en fonction de leur poids moléculaire : quatre familles de haut poids moléculaire (les familles HSP110, HSP90, HSP70 et HSP60) et une famille de petit poids moléculaire (petites HSPs) à laquelle appartient HSP27. Chaque famille est composée de nombreux membres. Une nomenclature consensus a été proposée par Kampinga, en 2009 (Tableau 3) mais elle ne fait pas l'unanimité et est peu utilisée (Kampinga et al., 2009). Les HSPs sont exprimées soit de façon constitutive ou inductible. Par exemple HSC70 (*Heat Shock Cognate 70*) est exprimée de manière constitutive alors que HSP70 est fortement induite lors d'un stress (Ravagnan et al., 2001). Les HSPs sont localisées dans différents compartiments cellulaires : majoritairement dans le cytoplasme, certaines dans le noyau, la mitochondrie et peuvent aussi se retrouver transmembranaires.

Famille	Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
Petites HSPs	HSP27 α -cristalline	HSPB2 HSPB4
HSP60	HSP60	HSPD1
HSP70	HSP70 (HSP72) HSC70 (HSP73) Grp78 (BIP)	HSPA1 HSPA8 HSPA5
HSP90	HSP90 α HSP90 β Grp94	HSPC2 HSPC3 HSPC4
HSP110	HSP105 α HSP105 β Grp170	HSPH1 HSPH2 HSPH4

Tableau 3 : Classification des HSPs. Présentation des membres composant chaque famille en incluant l'ancienne et la nouvelle nomenclature.

c. Structure des principales HSPs

Nous aborderons ici uniquement les HSPs les plus étudiées dans le domaine de la recherche en cancérologie à savoir : HSP27, HSP70, HSP90 et HSP110.

i. HSP27

L'expression de HSP27 est ubiquitaire, cependant elle est faiblement exprimée à l'état basal. HSP27 s'accumule en réponse aux stress externes ainsi que probablement en réponse à des stress physiologiques. En effet, son expression varie en fonction du stade de différenciation des cellules ou encore en fonction du cycle cellulaire. HSP27 est retrouvée dans le cytosol et dans le noyau suite à un stress.

Chez l'homme, le gène HSP27 est localisé sur le chromosome 7 et code une protéine de 205 acides aminés. Sa structure révèle un domaine central très conservé, appelé domaine α -cristallin caractéristique de la famille des petites protéines de stress (parmi lesquelles les α -cristallines, exprimées principalement, comme leur nom l'indique, au niveau du cristallin). HSP27 présente également à son extrémité N-terminale un domaine hydrophobe WDPF qui semble jouer un rôle dans l'oligomérisation de la protéine (Figure 1). En effet, l'activité de HSP27 est dépendante de son oligomérisation, contrairement aux autres HSPs qui sont ATP dépendantes.

L'oligomérisation de HSP27 est un processus dynamique régulé par le statut de phosphorylation de trois résidus sérines de la séquence de HSP27 humaine, les sérines 15, 78 et 82. HSP27 déphosphorylée peut former des structures oligomériques pouvant atteindre jusqu'à 1000 kDa. La phosphorylation des résidus sérines de HSP27 est transitoire et réversible. Les MAPKAP kinases 2 (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2*) et 3 induisent la phosphorylation alors que la phosphatase 2A permet la déphosphorylation de la protéine (Kostenko & Moens, 2009).

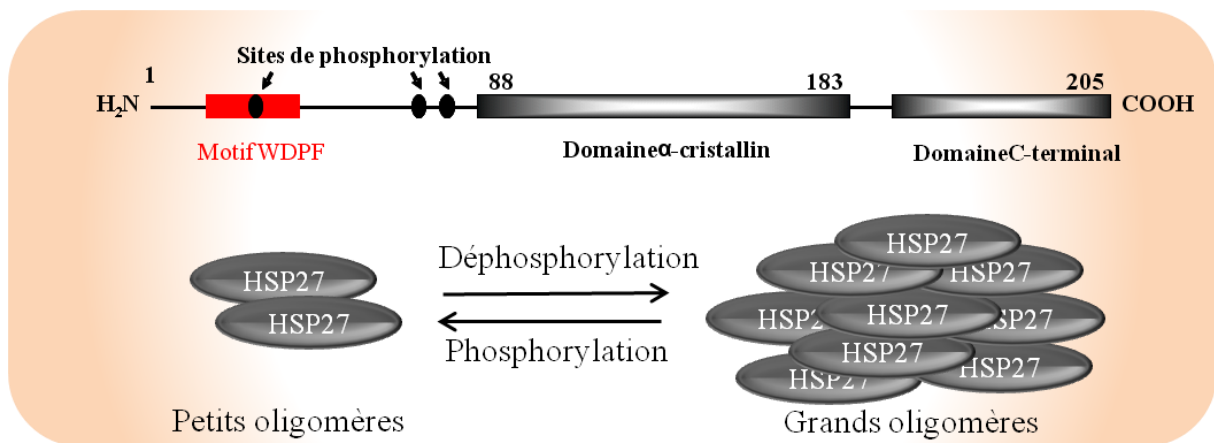


Figure 1 : Structure de HSP27. HSP27 est composée d'un domaine central et d'un domaine terminal hydrophobe. HSP27 peut se retrouver dans la cellule sous deux formes en fonction de son statut de phosphorylation : en petit ou en grand oligomère. Selon son organisation spatiale, HSP27 aura différentes fonctions au sein de la cellule.

ii. HSP70

Dans la famille des HSP70, le membre le plus inductible est HSP72 encore appelé HSP70. Sur le plan phylogénique, cette protéine est la plus étudiée et la plus conservée des HSPs. Une particularité de l'ARN (Acide ribonucléique) messenger du gène de HSP70 est de ne pas comporter d'intron. Il ne nécessite donc pas de maturation nucléaire, ce qui permet à la protéine d'être rapidement disponible dans le cytoplasme où sa séquence "leader" favorise sa traduction lors d'un stress. De ce fait, HSP70 est la protéine de choc thermique inductible par excellence. Deux gènes principaux, *hsp70.1* et *hsp70.3*, localisés sur le chromosome 6 humain codent pour une protéine de 641 acides animés (Singh, Kolvraa, & Rattan, 2007; Wu, Hunt, & Morimoto, 1985). La structure de HSP70 révèle deux domaines principaux : un domaine N-terminal hautement conservé comprenant une activité ATPase (ABD pour *ATP Binding*

Domain) et un domaine C-terminal moins conservé appelé PBD pour *Peptide Binding Domain* incluant un motif chaperon EEVD qui interagit avec le substrat et les co-chaperons tels que HSP40 (Figure 2). L'activité de HSP70 est dépendante de l'ATP. Nous aborderons dans la partie HSPs intracellulaire, comment l'ATP influence l'activité de HSP70. HSP70 est localisée dans le cytosol, dans le noyau et de manière non expliquée, à la membrane des cellules cancéreuses.

iii. HSP90

HSP90 est la protéine de stress la plus abondante dans les cellules, et est essentielle à la survie des cellules eucaryotes. En effet, elle représente environ 1% à 2 % des protéines totales (Margineantu, Emerson, Diaz, & Hockenbery, 2007). Le gène de *HSP90* est localisé sur le chromosome 14 et code une protéine de 732 acides aminés. Il existe deux isoformes appelées HSP90 α et HSP90 β . HSP90 α , la forme majoritaire est très inductible, alors que HSP90 β , minoritaire est exprimée constitutivement (Sreedhar, Kalmár, Csermely, & Shen, 2004). La structure de HSP90 présente trois parties : une partie N-terminale comprenant le site de liaison de l'ATP (ABD), un domaine median (PBD) permettant la fixation du substrat et la régulation de l'hydrolyse de l'ATP et un domaine C-terminal qui permet la dimérisation de la protéine (Figure 2). Le domaine de dimérisation est aussi impliqué dans la régulation de l'activité ATPase et permet le recrutement de certains co-chaperons tels que CHIP et CHOP grâce au motif EEVD, qui est très conservé chez les HSPs. HSP90 est principalement active sous la forme d'homodimères et est localisée dans le cytosol et dans le noyau.

iv. HSP110

La protéine HSP110 fut totalement ignorée jusqu'aux années 1990. Pourtant, cette protéine représente après HSP90 et HSP70 la troisième protéine la plus abondante dans les cellules de mammifères. Initialement considérée comme une sous-famille de HSP70 du fait de l'identité mutuelle de leur domaine de liaison à l'ATP (Easton, Kaneko, & Subject, 2000). HSP110 est essentielle à l'activité de HSP70. HSP110, aussi référencée HSP105, est régulée par des conditions de stress spécifiques telles que l'hyperthermie, l'alcool, les agents oxydatifs, l'inflammation et l'ischémie. Le gène de *HSP110* est localisé sur le chromosome 13 et code une protéine de 858 acides aminés. HSP110 est présente sous deux isoformes HSP105 alpha (constitutive) et beta (inductible), résultant d'un épissage alternatif. HSP110 est localisée dans le cytosol, mais aussi dans le noyau, et est constituée de trois domaines : un domaine de liaison à l'ATP localisé en N-terminal, un domaine de fixation peptidique « hélice bêta » et un domaine C-terminal qui permet la liaison avec l'ADN (Figure 2).

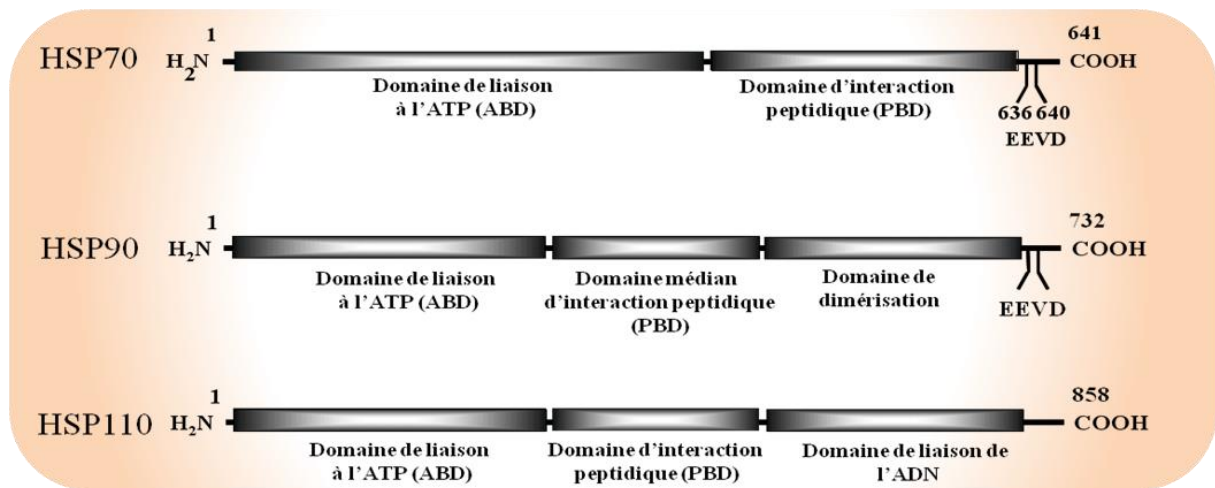


Figure 2 : Structure des HSPs de haut poids moléculaire. HSP70, HSP90 et HSP110 présentent toutes en commun un domaine de liaison à l'ATP (ABD) et un domaine de liaison au peptide (PBD).

Les HSPs de haut poids moléculaire partagent donc des caractéristiques communes par rapport aux petites HSPs comme leur dépendance à l'ATP ou la présence d'un domaine d'interaction peptidique (Tableau 4). Au sein de la cellule, les HSPs présentent en fonction de leurs caractéristiques un rôle bien défini, qui contribue à maintenir la cellule en vie.

Familles	Protéines	Expression	Localisation	ATP +/-
Petites HSPs	HSP27	Inductible	Cytosol	ATP indépendant
HSP70	HSP70	Inductible	Cytosol/Noyau/ Membranaire	ATP dépendant
HSP90	HSP90 α HSP90 β	Inductible Constitutive	Cytosol/Noyau	ATP dépendant
HSP110	HSP105 α HSP105 β	Constitutive Inductible	Cytosol/Noyau	ATP dépendant

Tableau 4 : Les principales caractéristiques des HSPs

II. HSPs intracellulaires

D'une manière générale, les HSPs sont connues pour avoir deux fonctions intracellulaires principales : une activité chaperon et une activité anti-apoptotique. Outre ces deux fonctions, les HSPs possèdent d'autres fonctions bien définies qui sont essentielles à la cellule.

a. Activité de chaperon moléculaire

A travers leur fonction de chaperon moléculaire, les protéines de choc thermique jouent un rôle primordial dans des conditions de stress physiologique. Elles participent aux mouvements intracellulaires des protéines, contribuent à l'élimination des protéines anormales ou reconnues comme étrangères par le protéasome, dissocient des complexes protéiques et participent à la conformation des protéines néo-synthétisées. De ce fait, ces protéines participent au « tri des protéines intracellulaires », entre réparation et destruction permettant ainsi le maintien de l'homéostasie cellulaire (E Schmitt et al., 2007). Cependant, la fonction de chaperon moléculaire des HSPs est aussi très importante lors d'un stress protéotoxique. En effet, à la suite de ce stress, les protéines cytoplasmiques vont être dénaturées. Ce mécanisme se déroule en deux étapes : une étape de déploiement avec la perte de la structure tridimensionnelle de la protéine par le dépliement de sa chaîne d'acides aminés, puis une étape de dénaturation irréversible avec la création de liaisons secondaires non spécifique au sein de la protéine. La dénaturation a pour conséquence directe la perte de l'activité biologique et une modification de la solubilité de la protéine. La solubilité d'une protéine dépend de sa structure 3D, dans ce cas, les chaînes hydrophobes ou chargées des protéines normalement enfouies à l'intérieur de la protéine se retrouvent exposées à l'extérieur, menant à la formation d'agrégats protéiques. L'accumulation de ces agrégats est létale pour la cellule (Dobson, 2003). Les HSPs et plus particulièrement HSP27, HSP70, HSP90 et HSP110 jouent un rôle primordial dans ce cas, afin d'empêcher la formation d'agrégats protéiques irréversibles et réparer ces protéines dénaturées.

De façon indépendante de l'ATP, HSP27 est capable de reconnaître et de se lier aux protéines dénaturées évitant ainsi leur agrégation (McConnell & McAlpine, 2013). Il en serait de même pour HSP110 bien que le mécanisme exact reste encore à définir (Mattoo, Sharma, Priya, Finka, & Goloubinoff, 2013). Dans ce contexte, HSP27 agit sous forme de grands oligomères (protéine déphosphorylée), permettant ainsi la formation d'un réservoir de protéines. HSP27 n'ayant pas la capacité de renaturer les protéines car son activité est indépendante de l'ATP, les protéines dénaturées sont dans un second temps, cédées aux HSPs dépendantes de l'ATP tels que HSP70 et HSP90. L'étape de renaturation nécessite la présence de co-chaperon spécifique à chaque système chaperon et l'ensemble est bien sûr conditionné par l'ATP. Concernant le système chaperon de HSP70, deux co-chaperons sont essentiels pour son fonctionnement : HSP40 et HSP110 (Figure 4).

Dans l'ordre chronologique, HSP27 donne son substrat (protéine dénaturée) à HSP40, ensuite HSP40 apporte ce dernier à HSP70. HSP70 prend en charge le substrat par son domaine PBD dont la conformation est étroitement régulée de manière allostérique par l'ATP. Lorsque HSP70 est liée à l'ATP, HSP70 présente une conformation ouverte. L'hydrolyse de l'ATP en ADP stimulée par HSP40 entraîne la fermeture de HSP70 et donc la fixation et la stabilisation (renaturation) du substrat. C'est alors qu'intervient HSP110 considérée ici comme un NEF (*nucleotide exchange factor*) en favorisant la dissociation de l'ADP présent sur HSP70. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP permet ainsi l'ouverture de HSP70 et la libération du substrat. L'ensemble des étapes ci-dessus correspond à un cycle, à la suite duquel la protéine est soit renaturée retrouvant ainsi sa structure tridimensionnelle et son activité biologique, soit dirigée vers le protéasome pour être dégradée, soit acheminée vers HSP90 si le repliement de la protéine n'est pas finalisé et nécessite un repliement plus complexe. Le système chaperon de HSP90 fonctionne avec des co-chaperons (CHIP et CHOP) de manière similaire à HSP70. Cependant, HSP90 doit se dimériser pour être active et la fermeture de HSP90 sur son substrat est consécutive à la fixation de l'ATP (Retzlaff et al., 2010).

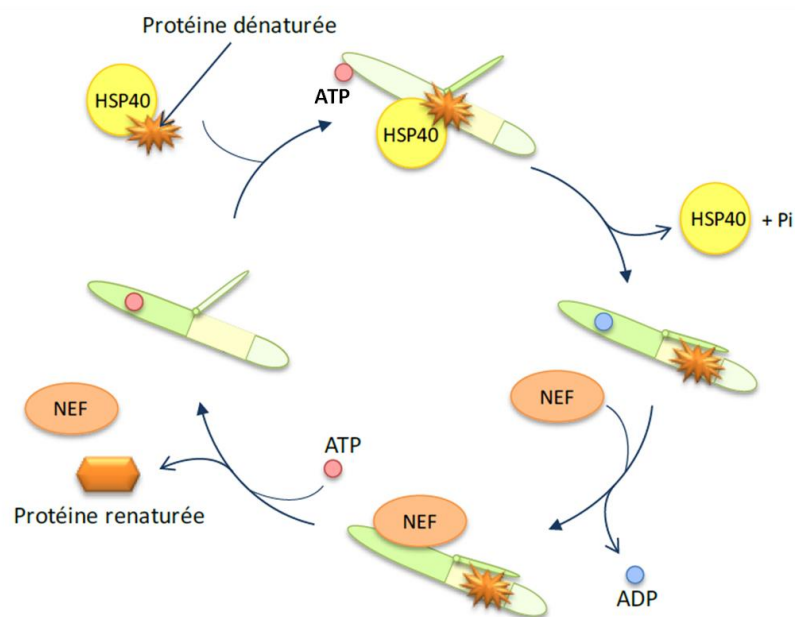


Figure 3 : Représentation schématique du mécanisme chaperon de HSP70. La protéine substrat est apportée à HSP70 par HSP40. L'hydrolyse de l'ATP en ADP entraîne la fermeture de HSP70 et la renaturation de la protéine. Ensuite HSP110 ou NEF (*nucleotide exchange factor*) en favorisant la dissociation de l'ADP, permet la fixation d'une nouvelle molécule sur HSP70 puis l'ouverture de HSP70 et la libération de la protéine renaturée. Pi : phosphate inorganique

b. Activité anti-apoptotique

L'autre fonction très importante des HSPs est leur rôle anti-apoptotique. Par cette fonction les HSPs sont impliquées dans le développement tumoral (Lanneau et al., 2008). (Figure 5)

i. L'Apoptose : généralités

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, fait partie intégrante de la physiologie d'un organisme. Elle joue un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie cellulaire notamment dans l'hématopoïèse, en détruisant les cellules devenues inutiles ou altérées. L'apoptose se traduit par de nombreux changements phénotypiques et morphologiques spécifiques. Au niveau cytoplasmique, nous trouvons une acidification et une condensation du cytoplasme due à une perte d'eau. Au niveau membranaire, des bourgeonnements vont se former libérant ainsi les corps apoptotiques. Au niveau du noyau, la chromatine se condense, et l'ADN cellulaire se fragmente (Zimmermann, Bonzon, & Green, 2001). L'induction de l'apoptose dépend de nombreux signaux tels que le stress oxydatif, l'activation des récepteurs de mort par des ligands spécifiques. Deux voies majeures ont été décrites: une voie extrinsèque qui dépend des récepteurs de mort et une voie intrinsèque impliquant directement la mitochondrie. Ces deux voies sont liées et permettent une amplification de la réponse apoptotique (Zielinski, Eigl, & Chi, 2013).

La voie extrinsèque est induite par les récepteurs de mort de type TNF (*Tumor Necrosis Factor*), FAS et TRAIL (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*). Ces récepteurs sont activés par des ligands solubles tels que TNF α/β , FASL et TRAIL. FAS et TRAIL induisent l'activation de l'apoptose au niveau de la membrane plasmique *via* un complexe appelé DISC (*Death Inducing Signaling Complex*), permettant l'activation de la caspase-8, première étape de la cascade protéolytique des caspases conduisant à la mort cellulaire. La voie de signalisation du TNF est plus complexe. En effet, dans un premier temps, l'activation du récepteur va engager des signaux de survie impliquant le facteur de transcription *NF- κ B* (*Nuclear Factor-Kappa B*) et la kinase *AKT* (protéine kinase B). Dans un second temps, le récepteur TNF va être internalisé afin de déclencher l'apoptose par la caspase-8, de manière équivalente au DISC de FAS et TRAIL.

Concernant la voie intrinsèque, elle est activée lors d'un stress cellulaire comme par exemple la chaleur, les radiations ou les agents anticancéreux. Ces stimuli vont engendrer des dommages mitochondriaux comme la perméabilisation des membranes mitochondriales,

permettant la libération de molécules pro-apoptotiques dans le cytosol (AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), cytochrome C) et l'activation de la cascade des caspases. De nombreuses molécules pro-apoptotiques sont impliquées dans ces deux voies, permettant aux HSPs d'agir sur plusieurs cibles.

ii. Rôles des HSPs dans la voie extrinsèque de l'apoptose

HSP27, HSP70 et HSP90 favorisent l'activation de la voie de survie cellulaire NF- κ B induite par le récepteur au TNF. En effet, HSP70 et HSP90 en empêchant la dégradation de la protéine kinase RIP (*Receptor Interacting Protein*) permettent l'activation de la voie de survie NF- κ B et ainsi protègent les cellules de la mort induite pour le TNF α (Lewis et al., 2000). HSP70 et HSP90 stabilisent la kinase AKT et permettent son activation en empêchant sa déphosphorylation par la phosphatase PP2A, favorisant aussi la survie cellulaire (Newton, 2003). AKT, une fois phosphorylée est capable d'inhiber de nombreuses protéines impliquées dans le processus apoptotique telles que Bad ou la caspase-9. Dans cette voie de survie HSP27 favorise l'ubiquitination de I κ B α (*Inhibitor of kappa B*), induisant sa dégradation par le protéasome, ce qui permet l'augmentation de l'activité de NF- κ B et sa relocalisation dans le noyau pour induire la transcription des gènes anti-apoptotiques tels que *BCL-2* (Didelot et al., 2006; Gurbuxani et al., 2003).

HSP70 agit également au niveau des récepteurs de mort de type TRAIL. Elle peut donc inhiber l'apoptose induite par TRAIL en bloquant la formation du complexe DISC qui résulte du recrutement de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*) et la caspase-8 (Guo et al., 2005). De plus, HSP70 et HSP90 peuvent agir directement sur la caspase-8 ce qui bloque le clivage de Bid et la dépolarisation de la mitochondrie. HSP27 est de même capable d'empêcher l'entrée de Bid dans la mitochondrie (Paul et al., 2002). Enfin, HSP70 inhibe des kinases activées par le stress : par exemple, elle peut se lier à JNK (c-Jun N-terminal Kinase), empêchant ainsi cette dernière de déclencher l'apoptose.

iii. Rôles des HSPs dans la voie intrinsèque de l'apoptose

Au niveau mitochondrial, HSP70 et HSP110 empêchent la translocation membranaire de Bax (Yamagishi, Ishihara, Saito, & Hatayama, 2006). Ainsi, le cytochrome C et AIF, ne peuvent plus être libérés de la mitochondrie vers le cytoplasme. Cette fonction semble dépendante du motif chaperon EEVD et de l'ABD de HSP70 (Ruchalski et al., 2006). HSP70 est aussi capable de bloquer directement AIF dans le cytoplasme (Ravagnan et al., 2001).

Au niveau post-mitochondrial, la formation de l'apoptosome est inhibée de différentes façons. HSP27 et HSP110 interagissent avec le cytochrome C bloquant ainsi son interaction avec ses cibles (Apaf-1 : *Apoptotic protease activating factor 1*). HSP70 et HSP90 peuvent se lier à Apaf-1 et empêcher son oligomérisation, prévenant ainsi le recrutement de la pro-caspase-9 nécessaire pour la formation de l'apoptosome. Il a été démontré que l'ABD joue un rôle important dans cette interaction (Beere et al., 2000). D'autre part, HSP27 et HSP70 interagissent avec la pro-caspase-3, prévenant ainsi sa maturation protéolytique et conduisant à l'inhibition de l'apoptose dépendante des caspases (Garrido et al., 2006).

Au niveau nucléaire, HSP70 peut s'associer à la nucléase CAD (*Caspase Activated DNase*) et réguler son repliement ce qui a pour conséquence de bloquer la fragmentation de l'ADN (Li, Lee, Ko, Kim, & Seo, 2000).

c. Autres fonctions intracellulaires

HSP27 et HSP90 préservent l'intégrité cellulaire en s'associant à l'actine et à la tubuline pour les stabiliser à la suite d'un stress (Jackson, 2013). De plus, HSP27 possède des propriétés anti-oxydantes en réduisant le nombre d'espèces oxygénées réactives (ROS) ou en neutralisant les effets toxiques des protéines oxydées (Sakurai et al., 2013). Au cours d'un stress, HSP27 peut inhiber la synthèse des protéines en interagissant avec le facteur eIF4G (*Eucaryotic Initiator Factor 4G*) impliqué dans la traduction de nombreux ARN messager. Ce rôle est complémentaire à sa fonction anti-agrégation afin d'éviter de nouveau l'accumulation de protéines anormales et par conséquent, des agrégats toxiques pour la cellule.

Enfin, HSP27 et HSP70 jouent un rôle essentiel dans la différenciation érythroïde. Notre équipe a démontré en collaboration avec l'équipe d'Olivier Hermine (Hôpital Necker, Paris) que dans les cellules hématopoïétiques, HSP70 et HSP27 protégeaient GATA-1 (facteur de transcription clé de la différenciation érythroïde) du clivage par la caspase-3 permettant ainsi aux érythroblastes de se différencier en érythrocytes plutôt que de mourir par apoptose (de Thonel et al., 2010; Ribeil et al., 2007).

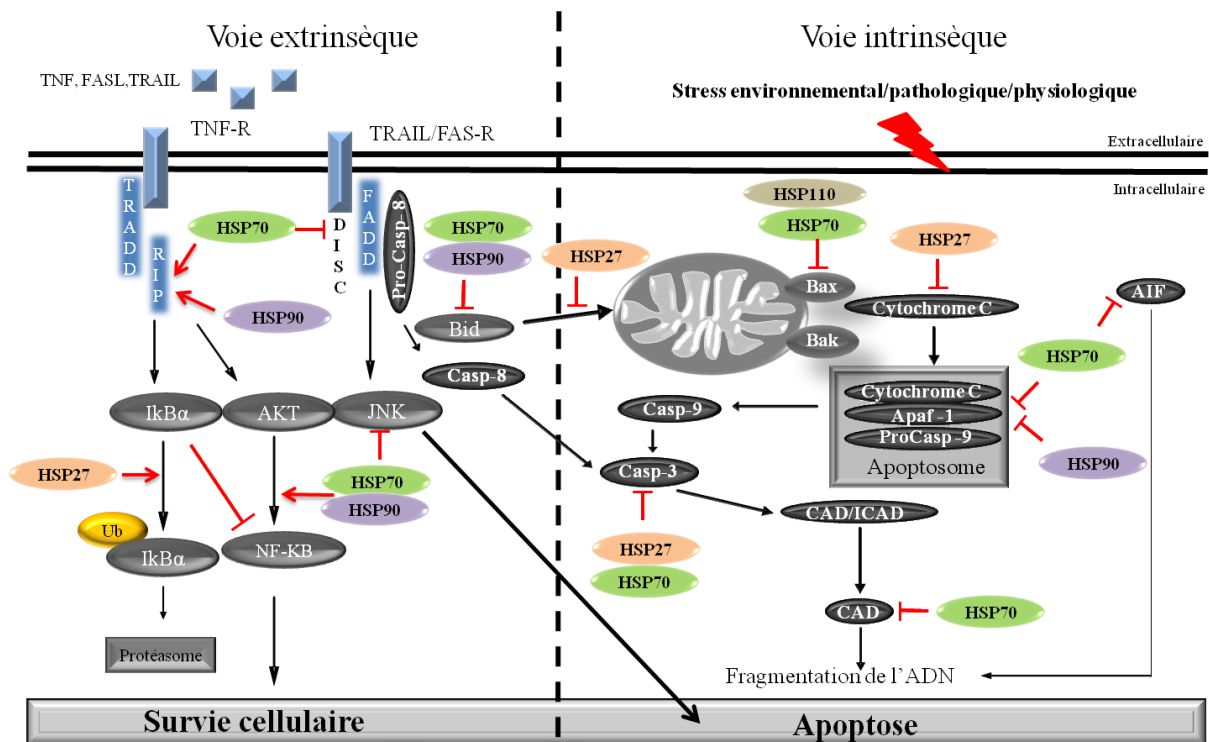


Figure 4 : Schéma récapitulatif du rôle anti-apoptotique des HSPs dans les deux voies de l'apoptose : à gauche, la voie extrinsèque impliquant les récepteurs de mort et à droite la voie intrinsèque impliquant la mitochondrie. \blackrightarrow Symbole représentant l'effet inhibiteur des HSPs, $\color{red}\rightarrow$ Symbole représentant l'effet activateur des HSPs.

d. Cancer et expression des HSPs intracellulaires

i. HSP27 et cancer

Les niveaux d'expression de HSP27 sont connus pour être élevés dans de nombreux cancers notamment les cancers du sein, des ovaires, de la prostate, de l'estomac ainsi que dans certaines leucémies (Brunet Simioni et al., 2009; Lorient, Zoubeidi, & Gleave, 2012). Dans la plupart des cellules tumorales, l'expression de HSP27 est associée à une augmentation de la taille des tumeurs. Cette augmentation de tumorigénicité est associée à son rôle anti-apoptotique. De plus, la surexpression de HSP27 semble accroître le potentiel métastatique des cellules cancéreuses dans les modèles de rongeurs (Garrido et al., 2006). Dans ce contexte pathologique, la cellule cancéreuse utilise HSP27 pour se protéger des agressions par les agents anticancéreux. Dans un modèle de cancer colique de rat, la surexpression de la protéine HSP27 stimule la tumorigénicité et diminue l'immunogénicité des cellules tumorales. Elle prévient la mort des cellules tumorales qui constitue un « signal danger » pour le système immunitaire (Bruey et al., 2000; Garrido & Solary, 2003).

ii. HSP70 et cancer

HSP70 est surexprimée dans de nombreuses tumeurs solides (endomètre, sein, prostate, côlon, mélanome, tumeurs gastriques et ostéocarcinome) mais aussi dans des tumeurs liquides (leucémie). Cette surexpression est associée à la présence de métastases, à un mauvais pronostic et à une résistance à la chimiothérapie ainsi qu'à la radiothérapie (McConnell & McAlpine, 2013). Chez les rongeurs, HSP70 augmente la tumorigénicité des cellules cancéreuses (Jäättelä, 1995). Ce pouvoir tumorigénique de HSP70 semble être corrélé à ses propriétés anti-apoptotiques. En effet, comme vu précédemment, HSP70 bloque toutes les voies de l'apoptose, ce qui limite donc l'efficacité des médicaments anticancéreux.

iii. HSP90 et cancer

HSP90 est jusqu'à 10 fois plus exprimée dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales (Ferrarini, Heltai, Zocchi, & Rugarli, 1992). HSP90 est surexprimée dans les cancers du sein, des poumons et dans les leucémies. HSP90 est capable d'interagir avec plus de 200 protéines, dont des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes (gènes qui, lorsqu'ils sont mutés, respectivement freinent ou favorisent la genèse des cancers). HSP90 a un rôle très important dans l'émergence des mutations à l'origine de la formation de clones cancéreux qu'elle parvient à chaperonner p53, l'une des protéines clientes de HSP90, est mutée dans près de la moitié des cancers humains (Vogelstein, Lane, & Levine, 2000; Whibley, Pharoah, & Hollstein, 2009). Ce facteur de transcription est l'un des acteurs le plus important dans le processus de cancérisation. HSP90 est capable de stabiliser la protéine p53 mutée. La mutation de la protéine p53, masquée par HSP90, entraîne la perte de ses capacités antiprolifératives et apoptotiques. De ce fait, les cellules deviennent bien plus à risque de transformation maligne (Dai, Whitesell, Rogers, & Lindquist, 2007).

iv. HSP110 et cancer

Bien que généralement négligée jusqu'à peu, HSP110 est en fait surexprimée dans de nombreux cancers (colorectal, prostate, peau) et son expression augmente le potentiel métastatique et est d'autant plus élevée que le stade de la tumeur est avancé (Slaby et al. 2009; Kai et al. 2003). Ces deux dernières observations suggèrent que HSP110 favoriserait la progression tumorale.

Pour conclure, les HSPs sont exprimées à des taux très inférieurs dans les cellules normales par rapport aux cellules cancéreuses, mais dans ces deux situations les HSPs servent un même objectif, le maintien en vie de la cellule. Dans les conditions physiologiques, les

effets des HSPs sont bénéfiques, évitant ainsi la mort des cellules à la suite d'un stress. A l'inverse, dans les cellules cancéreuses considérées comme continuellement stressées, les HSPs vont chaperonner les protéines impliquées dans le développement tumoral pour éviter leur agrégation ou leur dégradation. Par leur action anti-apoptotique, les HSPs participent au développement de la résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis des agents chimiothérapeutiques et ainsi favoriser la progression tumorale. De ce fait, les HSPs et plus particulièrement HSP70, par sa forte activité chaperon et anti-apoptotique, apparaissent comme des cibles thérapeutiques au niveau intracellulaire.

Pendant de nombreuses années, les HSPs ont été considérées comme des protéines typiquement intracellulaires. Cependant, de nos jours une accumulation de résultats montre que les HSPs peuvent se retrouver à l'extérieur de la cellule élargissant ainsi leur champ d'action (Rappa et al., 2012).

III. HSPs extracellulaires

La présence extracellulaire des HSPs a longtemps été considérée comme énigmatique. Cependant, il est maintenant bien établi que les HSPs sont aussi présentes à l'extérieur des cellules. La première publication observant la présence des HSPs extracellulaires a été réalisée sur des axones géants de calamar dans le laboratoire de Tytell en 1986 (Tytell, Greenberg, & Lasek, 1986). Indépendamment, Hightower et Guidon ont démontré la présence de la protéine de stress HSP70 dans le milieu extracellulaire. De nos jours, les HSPs sont détectées dans le plasma des souris et des humains, en particulier HSP27, HSP70 et HSP90 (De Maio & Vazquez, 2013; Gehrmann et al., 2008). Les HSPs sont présentes à l'extérieur de la cellule, sous une forme libre ou sous une forme associées aux membranes. De nombreuses publications suggèrent que les HSPs ne sont pas simplement associées aux membranes mais insérées dans celle-ci (De Maio, 2011; Multhoff et al., 1995). Il est difficile de différencier exactement ces deux états. C'est pourquoi dans cet exposé nous les traiterons ensemble. Chez l'Homme la présence extracellulaire des HSPs est principalement associée à des situations de stress physiologiques, environnementaux et/ou pathologiques tels que la chaleur, la division cellulaire, l'inflammation, les infections bactériens et virales et le cancer. De manière surprenante, les HSPs inductibles : HSP27 (De Maio, 2011; Liao, Wu, Wang, Tien, & Lin, 2009), HSP70 (De Maio & Vazquez, 2013; Gehrmann et al., 2008; Stangl et al., 2011) et HSP90 (Sidera & Patsavoudi, 2008) sont retrouvées à l'extérieur de la cellule. Dans ce travail,

notre intérêt se portera plus particulièrement sur HSP70. HSP70 existe sous les deux formes extracellulaires décrites ci-dessus. En revanche, nous retrouvons HSP70 associée aux membranes des cellules cancéreuses mais pas à la surface des cellules normales (Rappa et al., 2012). En effet, les cellules cancéreuses sont considérées comme continuellement stressées, les HSPs inductibles telles que HSP70 deviennent dès lors « constitutives ». De ce fait, il y a une surexpression intra-cytoplasmique de HSP70 et environ 10 % de cette HSP70 se retrouve à la membrane (Seigneuric et al., 2011). Il a été démontré que l'expression de HSP70 à la membrane des cellules cancéreuses est directement associée à une faible survie des patients cancéreux (Hantschel et al., 2000) indiquant que la présence des HSPs à l'extérieur des cellules joue un rôle dans le développement tumoral.

A ce jour, il n'y a aucune certitude sur le mécanisme utilisé par les HSPs pour passer à l'extérieur ou à la membrane de la cellule. De plus, les HSPs ne possèdent aucun motif d'export ou d'insertion membranaire (De Maio & Vazquez, 2013). Deux questions majeures restent ouvertes: comment les HSPs passent la membrane et qu'elles sont leurs fonctions extracellulaires ?

a. Comment les HSPs peuvent se retrouver à l'extérieur de la cellule ?

Dans la littérature, nous trouvons plusieurs mécanismes pouvant expliquer le passage des HSPs à l'extérieur ou à la membrane de la cellule. La première hypothèse fut proposée par le groupe de Srivastava qui démontra que la mort par nécrose cellulaire se traduisait par une libération passive de HSP70 dans le milieu extracellulaire (Basu, Binder, Suto, Anderson, & Srivastava, 2000). Par ailleurs, l'équipe de Hightower a mis en évidence une libération de HSP70 dans un contexte indépendant de la mort cellulaire, ce qui fut confirmé par d'autres équipes (Hightower & Guidon, 1989). L'argument majeur en faveur d'une sécrétion passive de HSP70 est que HSP70 n'a pas de signal de sécrétion connu pour la voie classique du golgi-réticulum endoplasmique, HSP70 ne peut donc pas passer par cette voie pour être excrétée. En effet, l'utilisation d'inhibiteur spécifique de la voie golgi-réticulum endoplasmique, n'a pas d'effet sur la libération de HSP70 (Hightower & Guidon, 1989). Ce qui suggère donc que HSP70 doit être exportée par un mécanisme alternatif. De nombreuses protéines cytoplasmiques telles que l'interleukine 1 (IL-1) ou les galectines utilisent des voies de sécrétion non conventionnelles pour leur sécrétion. Concernant HSP70, divers scénarios ont été proposés pour expliquer son export de façon actif. Tout d'abord, il a été suggéré que l'export de cette protéine est dépendant de la voie lysosome-endosome avec l'intervention des

transporteurs de type ABC (Mambula, Calderwood, & Alerts, 2013). Dans ce cas, HSP70 s'associe à une protéine devant être excrétée, puis après son intégration dans le lysosome le complexe est exocyté. D'autres études montrent que le mécanisme d'excrétion de HSP70 passerait plutôt par la voie de sécrétion des granules (Evdonin et al., 2006). Une particularité intéressante est que HSP70 a aussi la capacité de lier les phosphatidyl-sérines (PS) dans les cellules tumorales. Les PS sont capables de passer à l'extérieur de la membrane par un mécanisme de Flip-Flop (Schilling et al., 2009). Il est donc possible que HSP70 utilise ce mécanisme pour passer à la membrane des cellules cancéreuses. Enfin, le mécanisme le plus accepté, pour l'export de HSP70 serait par la voie des vésicules extracellulaires tels que les ectosomes, les microparticules et les exosomes (De Maio, 2011). Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux exosomes, nous détaillerons dans la partie consacrée aux exosomes comment HSP70 peut se retrouver à leur surface. Ce mécanisme permettrait à HSP70 de se retrouver sous une forme transmembranaire avec une partie extracellulaire. Il a été démontré qu'une fraction, composée de seulement 14 acides aminés : « TKDNNLLGRFELSG » nommée souvent par l'abréviation « TKD », serait extracellulaire dans ce cas. Cette partie extracellulaire correspond à une partie du PBD de HSP70 (Arispe et al., 2004; Multhoff et al., 1995). L'organisation spatiale du TKD n'est pas connue à ce jour.

L'ensemble des arguments présenté suggère deux sources pour HSP70 extracellulaire: une active, par le biais de processus de sécrétion non conventionnel, et une passive à la suite de la mort cellulaire par nécrose. Grâce à cela, nous retrouvons HSP70 sous deux formes qui coexistent au sein de l'organisme, une forme insoluble associée aux membranes et une forme soluble libre.

b. Fonction extracellulaire de HSP70

HSP70 extracellulaire agit principalement sur le système immunitaire. Néanmoins, le rôle de HSP70 extracellulaire sur le système immunitaire reste controversé. De nombreuses études montrent que HSP70 joue le rôle d'immunostimulateur, à l'inverse d'autres études mettent en avant l'effet immunosuppresseur de HSP70 (De Maio & Vazquez, 2013; Gehrmann et al., 2008). Nous traiterons cette partie en fonction de la forme extracellulaire de HSP70.

i. Rôle de HSP70 sous sa forme libre

HSP70 libre peut présenter des effets opposés sur le système immunitaire. L'ensemble des effets est répertorié dans la figure 5. HSP70 libre joue un rôle essentiel dans l'immunité innée en activant les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), telles que les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. HSP70 est capable de se lier à de nombreux récepteurs des CPA. En effet, HSP70 interagit avec les récepteurs de type PPR (*Pattern Recognition Receptors*) comme les *toll-like receptor* TLR2 et le TLR4 et les récepteurs «poubelles» (*scavenger receptor*) comme CD94 et Lox-1 (Borges et al., 2012) présent sur les cellules dendritiques (CD) induisant ainsi un signal pro-inflammatoire (Kuppner et al., 2001). Pour ce faire, HSP70 libre est capable de prendre en charge les peptides antigéniques dérivés des tumeurs afin de favoriser la présentation croisée (Chen & Cao, 2010). HSP70 forme un complexe stable avec ces peptides (Bendz et al., 2007) et favorise leur endocytose par les cellules dendritiques. Dans le cytoplasme, HSP70 et le peptide antigénique se dissocient, permettant à ce dernier d'aller dans le réticulum endoplasmique afin d'être chargé sur les molécules du CMH I (complexe majeur d'histocompatibilité de type I). Le peptide antigénique chargé sur le CMH I est ensuite acheminé à la membrane des CD et induit l'activation des lymphocytes CD8⁺ (Borges et al., 2012; Floto et al., 2006). Il en résulte une réponse pro-inflammatoire avec sécrétion de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α qui active ensuite la voie de survie et de prolifération dans les lymphocytes cibles (E Schmitt et al., 2007). Cependant, il est reporté que l'activation serait non spécifique.

Par ailleurs, HSP70 favorise aussi l'activation des lymphocytes CD4⁺ par les cellules dendritiques en leur présentant le peptide antigénique via le CMH II (Binder, Blachere, & Srivastava, 2001; Haug, Schepp, Kalbacher, Dannecker, & Holzer, 2007). Compte tenu de sa fonction de chaperon moléculaire, il n'est pas surprenant que HSP70 ait cette capacité de chaperonner des peptides antigéniques vers les effecteurs de l'immunité. Par ailleurs, HSP70 est impliquée dans la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques pour leurs maturations. Enfin, HSP70 peut lier et activer les monocytes, induisant une réponse inflammatoire avec la production puis la sécrétion de TNF α , IL-1 β (A Asea, Kabingu, Stevenson, & Calderwood, 2000).

De nombreux rapports remettent en question l'effet immunoactivateur de HSP70 (Bausinger et al., 2002; De Maio, 2011; Gao & Tsan, 2003). En effet, la protéine HSP70 utilisée dans la plupart des expériences *in vitro* et *in vivo* est souvent contaminée par des endotoxines, impuretés dérivant de la production de HSP70 dans les bactéries. Les effets immunostimulateurs observés pourraient être attribués à l'endotoxine plutôt qu'à HSP70. En effet, une étude démontre des effets totalement opposés sur le système immunitaire, en fonction de la pureté de la protéine recombinante HSP70 utilisée. Lorsque HSP70 est contaminée par des endotoxines, cela conduit à l'activation de cellules immunitaires telles que les CPA. A l'inverse aucune activation des CPA n'est observée en présence HSP70 dépourvue d'endotoxine (Henderson et al., 2010). Cette hypothèse est renforcée, par le fait que la protéine HSP70 recombinante est capable d'activer la voie spécifique de transduction du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est considérée comme une endotoxine pyrogène qui a la capacité de lier le récepteur TLR4 et d'induire la libération de cytokines pro-inflammatoire (Triantafilou & Triantafilou, 2004). Ceci laisse supposer que l'activation de cette voie serait plutôt due à l'endotoxine contaminant qu'à HSP70.

Des études menées avec la protéine recombinante HSP70 sans endotoxine montrent, des effets plutôt inhibiteurs du système immunitaire. En effet, lorsque la protéine recombinante HSP70 est traité avec du Triton X114, un détergent qui permet l'élimination des endotoxines, HSP70 présente des effets anti-inflammatoires comme par exemple la production d'IL-10 par les cellules immunitaires (Borges et al., 2012). L'IL-10 est considérée comme la principale cytokine anti-inflammatoire et immunosuppressive (Moore, de Waal Malefyt, Coffman, & O'Garra, 2001). De plus, il a été démontré que HSP70 est capable d'inhiber la différenciation des cellules dendritiques et d'induire une tolérance de ces cellules. Les CD tolérantes vont ensuite créer un environnement immunosuppresseur par la génération de T régulateurs (Treg) (Onishi, Fehervari, Yamaguchi, & Sakaguchi, 2008). Les lymphocytes Treg ont un rôle crucial dans la suppression du système immunitaire en inhibant la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs.

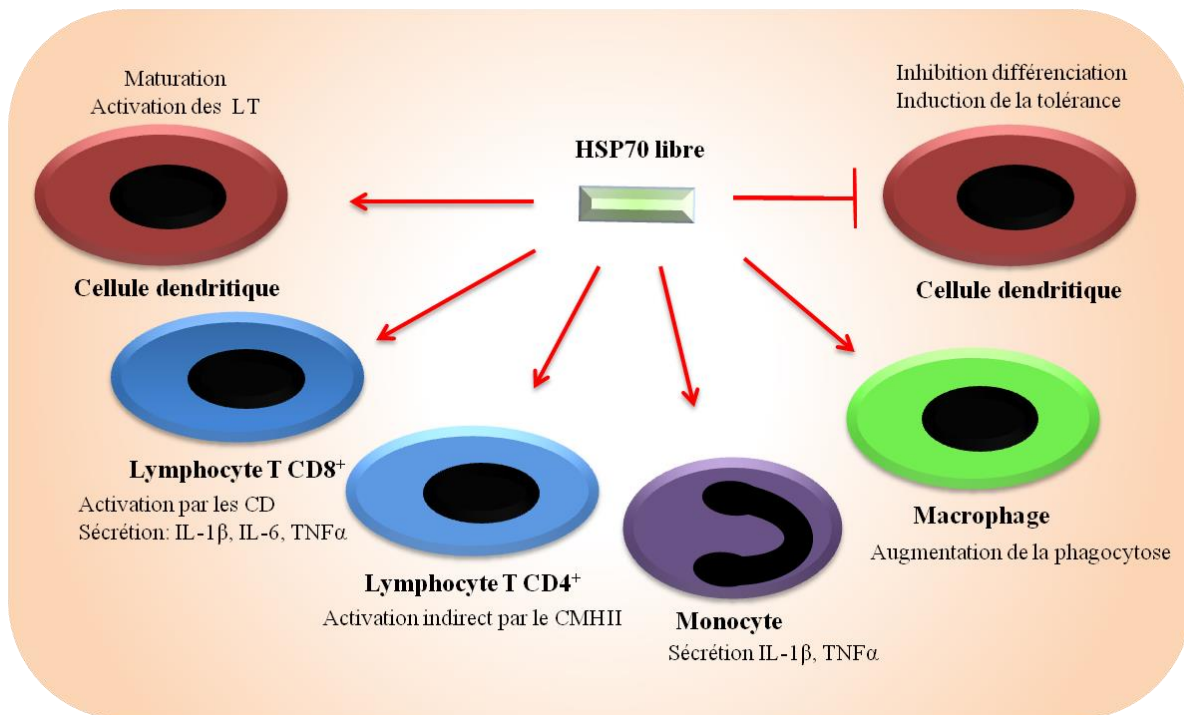




Figure 5 : Effets de HSP70 libre sur le système immunitaire. HSP70 sous sa forme libre est capable d'activer les cellules dendritiques, les lymphocytes T, les monocytes et les macrophages induisant une réponse inflammatoire. Cependant, lorsque HSP70 est utilisée sans endotoxine, elle est capable d'inhiber les cellules dendritiques.  Symbole représentant l'effet inhibiteur des HSPs,  Symbole représentant l'effet activateur des HSPs.

ii. Rôle de HSP70 associée aux membranes

Comme vu précédemment, HSP70 est retrouvée associée aux membranes des cellules cancéreuses, mais aussi sur les vésicules extracellulaires comme les exosomes. Concernant HSP70 membranaire sur les cellules cancéreuses, il a été démontré que HSP70 agit principalement sur des cellules NK en augmentant leur activité cytotoxique et leur potentialité migratoire. En effet, l'équipe de Gabriele Multhoff a démontré que les cellules NK sont capables de reconnaître et de tuer spécifiquement les cellules cancéreuses exprimant HSP70 à leur membrane (Multhoff, 2007). Le mécanisme suggéré implique le récepteur CD94 présent sur la cellule NK qui reconnaît le TKD, partie extracellulaire de HSP70. Après contact, les NK produisent et secrètent de grande quantité de granzyme B. Le granzyme B est capable de se lier avec une grande affinité à HSP70 membranaire, favorisant ainsi son internalisation et l'induction de l'apoptose dans la cellule cancéreuse (Pfister et al., 2007). A ce jour, aucun effet immunosuppresseur de HSP70 sur les cellules cancéreuses n'a été décrit.

A l'inverse HSP70 sur les exosomes semble plutôt avoir des effets immunosuppresseurs. Une partie de mon travail de thèse sera consacré aux exosomes, c'est pourquoi il est essentiel auparavant de les introduire. Nous détaillerons dans un premier temps leur biogénèse et leurs caractéristiques, puis nous aborderons leurs effets sur le système immunitaire.

c. Les exosomes : généralités

Les exosomes est un domaine de recherche très convoité actuellement. Les exosomes sont sécrétés par toutes les cellules normales ou cancéreuses (Vlassov, Magdaleno, Setterquist, & Conrad, 2012). Les exosomes sont considérés comme des vésicules de taille nanométrique entourées par une bicouche lipidique avec quelques nanolitres de cytosol dans leur lumière. Ils sont hétérogènes, en effet, leurs tailles, leurs compositions, leurs densités et leurs fonctions peuvent varier. Cependant, ils partagent des caractéristiques communes, reflétant pour la plupart des origines endosomales. En effet, les exosomes caractérisés par microscopie électronique à transmission, présentent une forme concave et ont une taille comprise entre 5 à 200 nm de diamètre (Figure 6). Ils sédimentent par ultracentrifugation à 100 000 g ou flottent sur un gradient de sucrose à une densité de 1,13 à 1,19 g/mL (Hannafon & Ding, 2013; Théry, Zitvogel, & Amigorena, 2002). D'autre part, ils présentent une composition protéique, lipidique et nucléique distincte de la membrane plasmique qui rappelle celles de vésicules extracellulaires. Les exosomes sont enrichis en certaines protéines qui sont de fait considérées comme des marqueurs de ces vésicules telles que : Tsg101, Alix, CD9, CD63, CD81 et les molécules du CMH (Complexe Majeur Histocompatibilité) (Théry, Ostrowski, & Segura, 2009). Il est important de préciser que ces protéines sont pour la plupart impliquées dans la voie endocytose, suggérant le mécanisme impliqué dans leur biogénèse. Concernant la composition lipidique, la membrane des exosomes est plus riche en cholestérol que celle des cellules. Ces modifications de composition membranaire rendent les exosomes plus rigides que les cellules et moins sensibles aux détergents. L'ensemble des caractéristiques que nous venons de citer permet de distinguer les exosomes des autres vésicules extracellulaires produites par les cellules, tels que les ectosomes, les exovésicules et les corps apoptotiques.

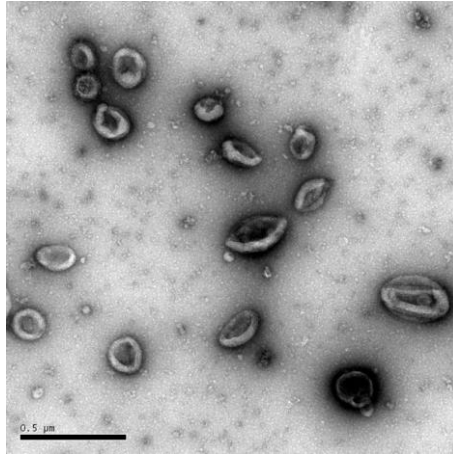


Figure 6: Visualisation des exosomes par microscopie électronique à transmission.

Exosomes sécrétés par lymphocytes B, présentant la forme concave caractéristique des exosomes.

i. Découverte des exosomes

En 1981, Trams et al, mirent en évidence pour la première fois la sécrétion par plusieurs lignées cellulaires (tumoraux ou non) d'une population hétérogène de vésicules contenant une enzyme ancrée dans la membrane ayant une activité enzymatique 5'nucléasique. Cette enzyme clive les nucléotides extracellulaires en nucléosides, perméables à la membrane (Trams, Lauter, Salem, & Heine, 1981). Cette équipe fut la première à utiliser le terme « d'exosome » pour désigner ces microvésicules sécrétées par les cellules dans le milieu extracellulaire. Puis en 1983, l'équipe de Johnstone et Stahl, montre à l'aide de la microscopie électronique que la formation de ces vésicules ne provenaient pas d'un bourgeonnement membranaire, mais plutôt qu'elles se formaient dans des corps multivésiculaires (MVB : *MultiVesicular Bodies*) par la voie d'endocytose. A cette époque, les exosomes suscitaient très peu d'intérêt, ils étaient considérés comme des microvésicules sécrétés par les cellules pour éliminer les protéines membranaires obsolètes (Johnstone, Adam, Hammond, Orr, & Turbide, 1987). Il fallut attendre presque 10 ans pour que les exosomes suscitent un réel intérêt, avec une étude de Raposo et al, démontrant le rôle essentiel des exosomes dans la communication cellulaire notamment dans l'activation des lymphocytes T (Bobrie, Colombo, Raposo, & Théry, 2011). Depuis, de nombreuses études ont montré, que les exosomes sont sécrétés par de nombreuses cellules : nerveuses, épithéliales, immunitaires, mais aussi par les cellules cancéreuses (Chaput & Théry, 2011; Schneider & Simons, 2013).

Les exosomes peuvent être isolés à partir de surnageant de culture mais aussi à partir des fluides biologiques comme : le sérum (Duijvesz, Luiders, Bangma, & Jenster, 2011; Taylor, Akyol, & Gercel-Taylor, 2006), le plasma, l'urine (van Balkom, Pisitkun, Verhaar, & Knepper, 2011), le liquide bronchoalvéolaires (Torregrosa Paredes et al., 2012), le liquide séminal (Poliakov, Spilman, Dokland, Amling, & Mobley, 2009), la salive (Gallo & Alevizos, 2013), le lait maternel (Admyre et al., 2007), le liquide amniotique (Alexzander Asea et al., 2008; Raimondo, Morosi, Chinello, Magni, & Pitto, 2011) et les effusions tumorales (Andre, Escudier, Angevin, Tursz, & Zitvogel, 2004). Ainsi, les exosomes sont présents dans des conditions *in vitro* et *in vivo*, permettant de mieux les étudier pour comprendre leur biogénèse, leur composition et leur fonction.

ii. Biogénèse des exosomes

La biogénèse des exosomes utilise dans un premier temps la voie d'endocytose puis la voie d'exocytose. L'endocytose est une voie de transport permettant à la cellule d'internaliser des molécules extracellulaires ou membranaires. Alors que l'exocytose permet à la cellule de les externaliser. Dans l'ordre chronologique, la biogénèse débute par l'invagination de la membrane plasmique aboutissant à la formation de vésicules d'endocytose. Ces dernières possèdent une bicouche lipidique identique à celle de la membrane plasmique et expriment HSP70 uniquement si elles dérivent des cellules cancéreuses. Les vésicules vont fusionner avec les endosomes précoces puis les endosomes tardifs (Duijvesz et al., 2011). Ensuite, l'invagination de la membrane de l'endosome vers son lumen permet la formation de vésicules intraluminales (ILVs) futur exosomes. A cette étape, une partie du contenu cytosolique de la cellule est emprisonnée dans l'ILV. La vésicule contenant les ILVs s'appelle alors le corps multivésiculaire (MVB). Enfin, par la fusion des MVBs avec la membrane plasmique de la cellule, les ILVs sont sécrétées dans le milieu extracellulaire par exocytose : ces vésicules deviennent alors des exosomes (Figure 7). Lors de ce processus d'exocytose, la membrane du MVB fusionne avec la membrane plasmique de la cellule. Il est important de noter que la membrane des exosomes présente la même orientation membranaire que la cellule. L'ensemble de ce processus permet donc de mieux comprendre comment la protéine de stress HSP70 peut se retrouver à la surface des exosomes lorsqu'ils dérivent des cellules cancéreuses.

Les mécanismes exacts et les acteurs moléculaires impliqués dans la formation des MBVs, des ILVs et par extension des exosomes sont encore mal connus. Cependant, certaines

études suggèrent qu'il n'existe pas de mécanisme général, mais plutôt que cela dépend du type cellulaire considéré.

1. Formation des vésicules intralunimales et adressage des molécules aux exosomes

- Le complexe protéique ESCRT (*l'Endosomal Sorting Complex Responsible for Transport*)

Ce complexe intervient à deux endroits importants, dans le processus d'invagination de la membrane de l'endosome pour la formation des ILVs et dans la sélection des protéines intégrant ces vésicules (Williams & Urbé, 2007). La fonction principale des protéines ESCRT est de trier entre les protéines à dégrader (protéines ubiquitinylées) et celles à recycler. Etant donné que nous retrouvons un enrichissement des protéines ESCRT (Alix et Tsg101) dans les exosomes, nous pouvons penser que ce mécanisme est bien nécessaire à la formation des exosomes. Cependant, d'autres études ont montré que la formation des exosomes pouvait être indépendante du complexe ESCRT, en se liant à d'autres molécules comme les tétraspanines ou les céramides.

- Les tétraspanines

Ce sont des glycoprotéines de surface composées de 4 régions hydrophobes transmembranaires initialement découvertes dans les cellules hématopoïétiques. Leur fonction moléculaire n'est pas encore déterminée, elles sont pourtant impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la migration, les interactions intercellulaires et la réponse immunitaire. Les tétraspanines sont des molécules d'adhésions qui peuvent servir de récepteur de surface et intervenir dans l'adhérence cellulaire. Il existe de nombreuses tétraspanines, mais les exosomes sont plus particulièrement enrichis en marqueurs CD9, CD63, CD81, CD82. L'une des caractéristiques majeures de ces tétraspanines est leur capacité à organiser un réseau d'interactions moléculaires au sein de la bicouche lipidique appelé le « tetraspanin web » (Rana, Yue, Stadel, & Zöller, 2012). En effet, ces protéines ont la capacité de se multimériser de façon homo-hétérotypique pour former des Tem (*tetraspanin-enriched-microdomain*). Ces plateformes se retrouvent au niveau de la membrane des exosomes et plus précisément dans les rafts lipidiques.

➤ Les céramides

Ce sont des sphingolipides, résultant de la combinaison d'un acide gras avec une sphingosine par une liaison amine. Ils ont un rôle structural très important dans les membranes plasmiques. Les céramides ont une forme de cône, qui permettrait d'induire naturellement une courbure à la bicouche lipidique. Cette caractéristique serait à l'origine de la formation des ILVs. Il a été démontré dans des lignées oligodendrocytaire, que la déplétion des protéines du complexe ESCRT (Alix, Tsg101) n'entraîne pas de réduction de la sécrétion des exosomes. En revanche, l'inhibition de la sphingomyélinase une enzyme qui clive la sphingomyéline en céramide entraîne une diminution de la production de ces exosomes (Trajkovic et al., 2008).

Ces résultats suggèrent donc l'existence de plusieurs mécanismes de formation des ILVs dont une voie dépendant du complexe ESCRT et voie une indépendante.

2. Fusion des MBVs avec la membrane plasmique

Cette étape est très importante car elle permet la libération des ILVs (soit les exosomes) dans le milieu extracellulaire. La fusion membranaire nécessite d'abord une étape de rapprochement, puis un arrimage des membranes. Deux principales familles de protéine semblent jouer un rôle important dans ce processus : les protéines de la famille Rab (*Ras-Related in Brain*) et les protéines SNARE (*Soluble NSF Attachment REceptor*). Les protéines de la famille Rab ont un rôle très important dans l'adressage des vésicules vers la membrane plasmique. Les protéines Rab sont des petites GTPases (Guanosine tri-phosphatase) monomériques de 20 à 25 kDa. Elle se trouve dans deux états, un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP (Guanosine di-phosphate). Il existe une soixantaine de membres dans cette famille. Dans notre cas, les protéines Rab11, Rab27 et Rab35 sont les trois plus impliquées dans la sécrétion des exosomes (Ostrowski et al., 2010). Les protéines Rab sont localisées à la surface des MBVs, et sont capables de reconnaître d'autres effecteurs présents sur la membrane plasmique. A ce jour, ces effecteurs ne sont pas connus. Cependant, une étude dans les mélanocytes montre que les protéines Rab peuvent interagir avec des protéines impliquées dans le trafic membranaire (synaptotagmine 2) qui interagissent spécifiquement avec le phosphatidyl-sérine (Saegusa et al., 2006).

Concernant, les SNAREs se sont des protéines membranaires qui permettent la fusion des bicouches lipidiques. Ils sont présents à la fois sur la vésicule à exocyter donc sur les ILVs, mais aussi sur la membrane plasmique de la cellule.

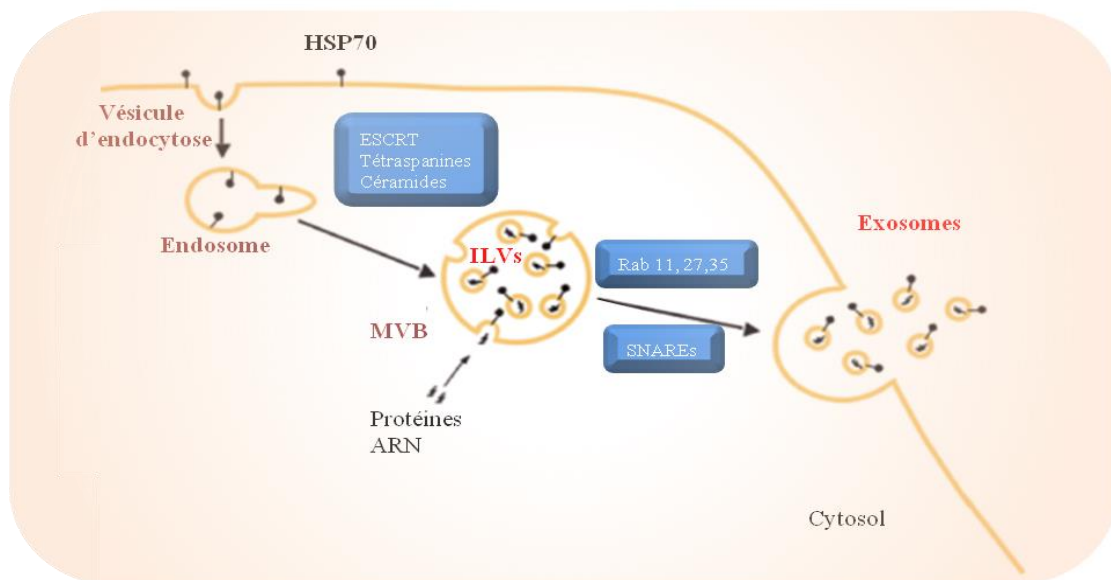


Figure 7 : Voie de biogenèse des exosomes tumoraux et acteurs moléculaires impliqués.

Suite à l'invagination de la membrane plasmique, une vésicule d'endocytose se forme. Cette vésicule fusionne avec un endosome précoce, qui lui-même fusionne avec un endosome tardif. Puis l'invagination de la membrane externe de cet endosome vers son lumen permet la formation des vésicules intraluminales (ILVs) futur exosomes. Le complexe ESCRT, les tétraspanines et les céramides participent à la formation des ILVs. Les ILVs sont contenues dans le corps multivésiculaire (MVB). A l'aide des protéines Rab et SNARE, le MVB fusionne avec la membrane plasmique libérant les ILVs à l'extérieur de la cellule : les exosomes. Adapté de (Bobrie et al., 2011)

3. Régulation de la sécrétion des exosomes

La sécrétion des exosomes peut avoir lieu de manière constitutive, comme pour les cellules épithéliales, les cellules dendritiques immatures ou les cellules transformées par l'EBV (Bobrie et al., 2011; Théry, Zitvogel, et al., 2002). Cependant, cette sécrétion peut être modulée en fonction des signaux extérieurs. Il a été montré dans des cellules hématopoïétiques et oligodendrocytes, qu'une augmentation de calcium intracellulaire stimule le relargage des exosomes (Savina, Furlán, Vidal, & Colombo, 2003). Cependant, l'exocytose peut être induite de manière Ca^{2+} -indépendante, lors de l'activation des cellules T par CD3 (Théry, Duban, et al., 2002). Dans le cas des cellules dendritiques, la sécrétion des exosomes

peut être aussi augmentée suite à leur interaction avec des lymphocytes T (Buschow et al., 2009). De même, la dépolarisation de la cellule induite par le K^+ augmente aussi la sécrétion des exosomes dans des cellules neuronales (Fauré et al., 2006). Enfin, de nombreuses études montrent que la sécrétion des exosomes est activée lorsque les cellules sont soumises à un stress. En effet, il a été démontré que les cellules cancéreuses soumises à un stress chimique comme un agent anticancéreux sécrètent plus d'exosomes. Ce résultat a été confirmé en 2012 dans un modèle d'hépatocarcinome et corrélé à une augmentation de HSP70 et HSP90 dans les exosomes (Lv et al., 2012).

Ainsi, la régulation de la sécrétion des exosomes semble dépendant des éléments du milieu environnant : présence d'ions calcium ou potassium ou stress.

iii. Composition des exosomes

La composition des exosomes est très particulière, ce qui permet de bien les différencier des autres vésicules dérivant des cellules. Les exosomes sont composés principalement de protéines, de lipides et d'ARN. Le site Exocarta (<http://www.exocarta.org>) propose une liste exhaustive de tous les composants identifiés dans les exosomes en fonction du type cellulaire dont ils dérivent. La figure 8 synthétise les composants les plus classiquement trouvés dans les exosomes.

1. Les protéines

L'analyse des protéines des exosomes a tout d'abord été réalisée par western blot dans les années 1990 puis plus récemment par analyses de protéomiques. Certaines protéines sont spécifiques du type cellulaire, d'autres communes. Nous présenterons ici les protéines communes et les particularités des exosomes dérivés des cellules cancéreuses.

Différentes catégories de protéines sont présentes dans les exosomes: (i) des protéines d'adhésions : tétraspanines (précédemment détaillées) qui sont importantes pour l'adressage des exosomes et des intégrines (LFA-1) des protéines transmembranaires important pour interagir avec les cellules. (ii) des protéines du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de type I et II ainsi que le CD86. Ceci va conférer aux exosomes la capacité de présenter des antigènes, d'interagir avec les cellules immunitaires et même de moduler le système immunitaire (SI) (iii) des molécules du cytosquelette : actine, tubuline, myosine (iv) des protéines de signalisation intracellulaire : protéine $G\alpha$, 14-3-3, (5) des protéines associées aux radeaux lipidiques : la flotilline, (vi) des enzymes du métabolisme cellulaire: pyruvate

kinase, GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase-activating protein*), (vii) des protéines impliquées dans le trafic membranaire (Rab, annexines, Alix, Tsg101) (viii) des ligands des récepteurs de mort comme FASL. Enfin, des protéines de stress telles que HSP90 et HSP70 sont également retrouvées dans les vésicules. Il est important de préciser à nouveau que les exosomes dérivant des cellules cancéreuses présentent HSP70 à leur surface contrairement aux cellules « normales » (Multhoff et al., 1995).

2. Les lipides

La composition lipidique de la membrane des exosomes est identique à celle de la membrane plasmique, mais présente des enrichissements en certains lipides. En effet, les exosomes sont enrichis en : (i) phospholipides saturés tels que les phosphatidyl-éthanolamine et glycéro-phospholipides, phosphatidyl-choline et phosphatidyl-sérine (ii) en sphingolipides (sphingomyéline et céramides), (iii) cholestérol. Cette modification rend les exosomes très résistants à la solubilisation. La phosphatidyl-sérine est localisée sur le feuillet externe de la bicouche lipidique des exosomes, une particularité qui conforte l'hypothèse que le passage de HSP70 à la membrane peut se faire par mécanisme actif : le flip-flop (E Schmitt et al., 2007).

3. Les acides nucléiques

Dans la lumière des exosomes nous trouvons aussi des ARNs messagers et des microARNs (rôle dans la régulation de l'expression des gènes), cela a été mis en évidence pour la première fois en 2007 par l'équipe de Valadi (Valadi et al., 2007). Dans cette même étude, les auteurs prouvent que ces ARN messagers sont fonctionnels. Ces ARNs permettraient le transfert potentiel d'informations génétiques entre cellules et pourraient donc affecter les fonctions de la cellule réceptrice. Plus récemment, des études montrent la présence dans les exosomes d'ADN tels que des retrotransposons provenant de virus endogènes et des séquences oncogéniques amplifiées et mutées. Par le biais des exosomes l'ADN viral serait transféré des cellules infectées aux cellules immunitaires, permettant induire une réponse antivirale (Balaj et al., 2011).

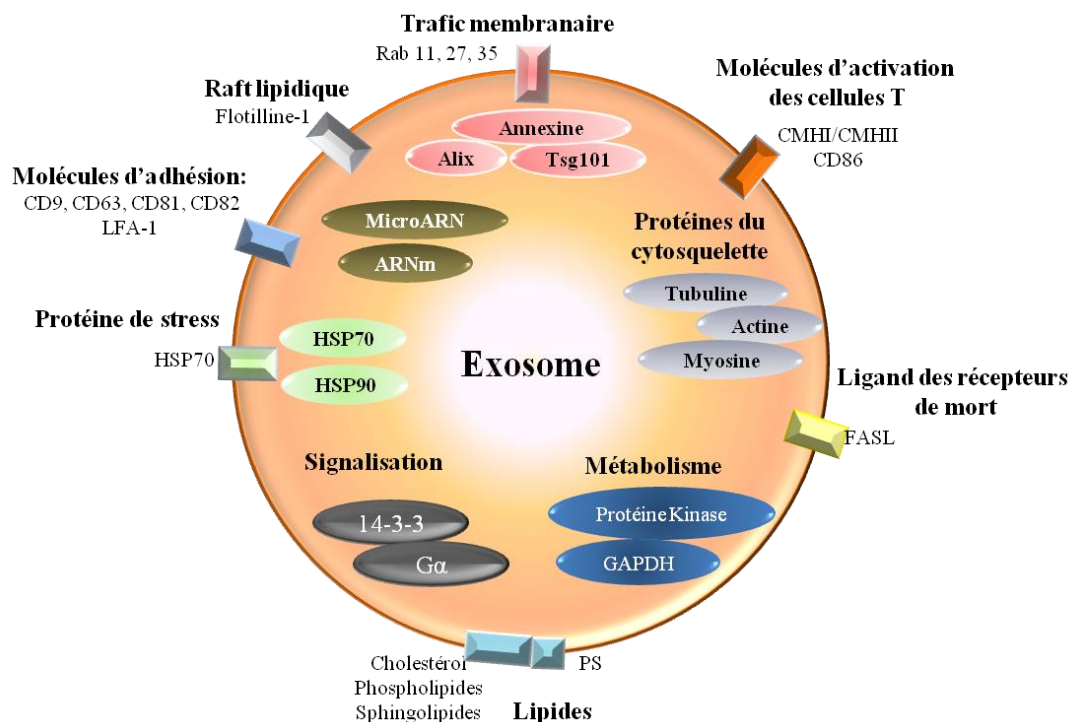


Figure 8 : Composition des exosomes. Ce schéma représente les lipides, les protéines, les plus classiquement trouvés au niveau des exosomes dérivant des cellules cancéreuses. Certaines protéines sont seulement sous forme membranaire et d'autres sont cytoplasmiques. Il est à noter que HSP70 sous sa forme membranaire est seulement présent à la surface des exosomes dérivant des cellules cancéreuses. PS : phosphatidylsérine qui se retrouve dans ce cas exposée à l'extérieur.

Malgré leur petite taille (de 50 à 200 nm de diamètre) les exosomes sont dotés de nombreux types de molécules, c'est pourquoi de nombreux groupes de recherches tentent actuellement de comprendre leurs rôles *in vitro* ainsi que leurs implications physio- et pathologiques *in vivo*. En seulement quelques années, de nombreuses fonctions ont été attribuées aux exosomes, lesquelles seraient étroitement liés à leur origine cellulaire. Ainsi, ils peuvent participer à l'élimination des molécules, à la sécrétion des protéines comme par exemple HSP70, au transfert de lipides et d'acides nucléiques, mais aussi à la dissémination des pathogènes dans le cas des maladies à prions (Fevrier et al., 2004). Les exosomes sont considérés comme jouant un rôle essentiel dans la communication intercellulaire. Les travaux réalisés pendant cette thèse ont porté sur les exosomes dérivés des cellules cancéreuses et leurs implications dans la réponse immunitaire tumorale. Il a été démontré que les exosomes participaient au développement de la tumeur, notamment en favorisant le développement des niches métastatiques (Peinado et al., 2012). Ainsi, dans cette partie, nous nous focaliserons sur l'action des exosomes dérivés des tumeurs. Compte tenu des molécules présentes à la surface des exosomes, ces derniers peuvent interagir avec différents types de cellules

immunitaires. Cette interaction peut conduire dans la cellule cible à l'activation d'une voie de signalisation cellulaire, à la fusion de l'exosome avec la membrane plasmique ou aboutir à l'endocytose de l'exosome. Dans ces deux derniers cas, le contenu de la lumière des exosomes, les protéines, l'ARN est libéré dans le cytoplasme de la cellule, pouvant ainsi modifier les propriétés de la cellule cible. Dans ce manuscrit nous nous intéresserons plus particulièrement à l'activation des voies de signalisation cellulaire par les exosomes tumoraux.

iv. Rôle des exosomes dans le système immunitaire

Les exosomes tumoraux ont la propriété d'interagir avec différentes cellules immunitaires environnantes et peuvent avoir des effets immuno-activateurs ou –suppresseurs sur le système immunitaire (Figure 9).

Dans l'étude menée, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'effet immunosuppresseur des exosomes dérivant des cellules tumorales. En effet, des travaux montrent que les exosomes sont capables d'activer les NK, les CD et les macrophages (Théry et al., 2009). Les voies de signalisation impliquées dans la communication entre cellules immunitaires et exosomes sont encore mal connues. Parmi celles qui ont pu être identifiées, nous avons la voie impliquant les récepteurs de mort (FASL) ainsi que celle impliquant les TLR (*Toll-Like Receptor*). Ces deux voies vont entraîner une réponse immunosuppressive (Figure 9).

En effet, les ligands des récepteurs de mort tels que FASL sont exprimés à la surface des exosomes et interagissent avec leur récepteur FAS présent à la surface des cellules T. Cette interaction a pour conséquence de bloquer la différenciation et/ou d'induire l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺.

Concernant la voie des TLR il a été récemment montré qu'elle est dépendante de HSP70 présente sur les exosomes. Cette dernière est capable d'activer les cellules immunosuppressives telles que les cellules myéloïdes suppressives (*Myeloid-Derived Suppressor Cells ou MDSCs*) (Théry et al., 2009, Lio, 2010, valenti 2006, Xiang, 2009). Cette activation met en jeu la séquence TKD de la protéine HSP70 qui est exposée à la surface des exosomes et le récepteur *Toll-Like Receptor 2 (TLR2)* des MDSCs. Leur interaction conduit à l'activation des MDSCs. Cette activation a pour effet d'inhiber le développement de la réponse antitumorale (Chalmin et al., 2010). Le mécanisme exact de l'activation des MDSCs par la protéine de stress HSP70 sera détaillé plus loin. Auparavant, nous allons définir les cellules MDSCs.

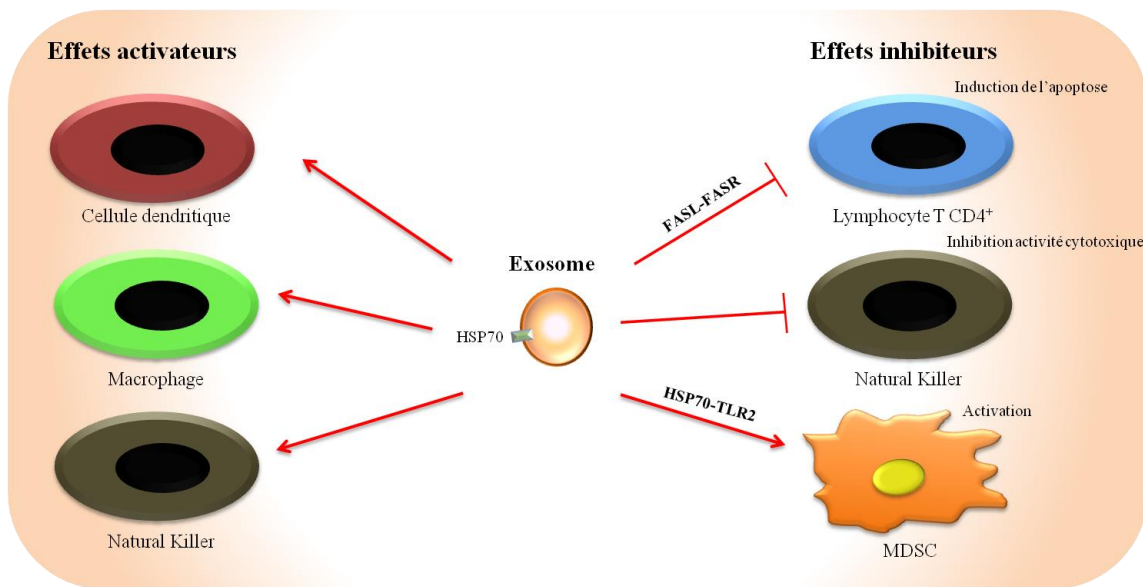


Figure 9 : Effets des exosomes sur le système immunitaire. Les exosomes tumoraux présentent des fonctions activatrices ou inhibitrices sur le système immunitaire. Les voies de signalisation impliquées sont peu connues. Cependant, deux voies d'inhibition de la réponse immunitaire ont été identifiées : la voie des récepteurs de mort inhibant les lymphocytes T et la voie des TLR impliquant la protéine de stress HSP70. Cette voie permet l'activation des cellules immunosuppressives. Les exosomes sont capables de non seulement inhiber les effecteurs de l'immunité, mais aussi d'activer les cellules générant un environnement immunosuppresseur.

—| Symbole représentant l'effet inhibiteur des HSPs, → Symbole représentant l'effet activateur des HSPs.

v. MDSCs

Les MDSCs (ou *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) sont considérées comme jouant un rôle prépondérant dans le processus d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire. Ces cellules sont fortement impliquées dans le processus tumoral en exerçant un effet immunosuppresseur sur les autres cellules immunitaires, principalement sur les cellules T (Lindau, Gielen, Kroesen, Wesseling, & Adema, 2013). Leur présence est directement corrélée avec le développement tumoral. De plus, les MDSCs s'infiltrant dans les tumeurs et semblent favoriser l'angiogénèse et la formation des métastases (Hao et al., 2006).

Les MDSCs sont des lignées myéloïdes immatures générées dans la moelle osseuse, qui dans un contexte cancéreux migrent vers les organes, la tumeur et le sang imposant ainsi une suppression immunitaire générale (Kao et al., 2011). Ces cellules sont identifiées chez la souris grâce à leur marquage membranaire $GR1^+CD11b^+$ et chez les patients atteints d'un cancer, par le marquage $CD11b^+CD33^+HLA-DR^-$ (Serafini et al., 2006). Les MDSCs

représentent 20 à 30% des cellules de la moelle osseuse et 2 à 4% des cellules spléniques chez une souris saine. Dans les cas de souris porteuses de tumeur, leur proportion peut augmenter jusqu'à 50% des splénocytes totaux (Kusmartsev et al., 2003). En présence des cellules cancéreuses, les MDSCs interagissent avec ces dernières et les associent à des cellules normales. A la suite de cela les MDSCs indiquent faussement aux autres effecteurs de l'immunité que les cellules cancéreuses sont saines et empêchent ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale de s'effectuer.

1. Expansion et activation des MDSCs

L'expansion des MDSCs est consécutive à la sécrétion par les cellules tumorales des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et le VEGF (Vascular endothelial growth factor). Après liaison avec leurs récepteurs spécifiques, la plupart des cytokines vont activer la voie de JAK/STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), induisant la survie et la prolifération cellulaire.

L'activation des MDSCs est induite par des cytokines produites par les cellules tumorales, (INF γ , IL-4), ou encore par les exosomes en activant la voie des TLR (Figure 10). Les TLR ont un rôle central dans l'activation de la réponse immunitaire et cette voie est dépendante de l'adaptateur cytoplasmique MyD88 (Nagaraj et al., 2009). Il a été démontré que l'expression de la protéine MyD88 par les MDSCs est nécessaire au développement métastatique (Xiang et al., 2010). Comme décrit ci-avant, l'activation des MDSCs par la voie des TLR met en jeu la protéine de stress HSP70 sur les exosomes et le TLR2 sur les MDSCs. Cette interaction induit *via* le facteur de transcription NF- κ B, l'expression d'une cytokine inflammatoire, IL-6, et l'expression des facteurs immunosuppresseurs (dont Arginase-1, ROS). L'IL-6 est ensuite sécrétée et agit de manière autocrine sur les MDSCs, maintenant les MDSCs dans un état activées par le biais de la voie de signalisation JAK2/STAT3. C'est la phosphorylation et la dimérisation de STAT3 dans le noyau qui permettra l'activation des gènes de la voie de survie. A la suite de cette activation les MDSCs peuvent exercer leur activité d'immunosuppresseur.

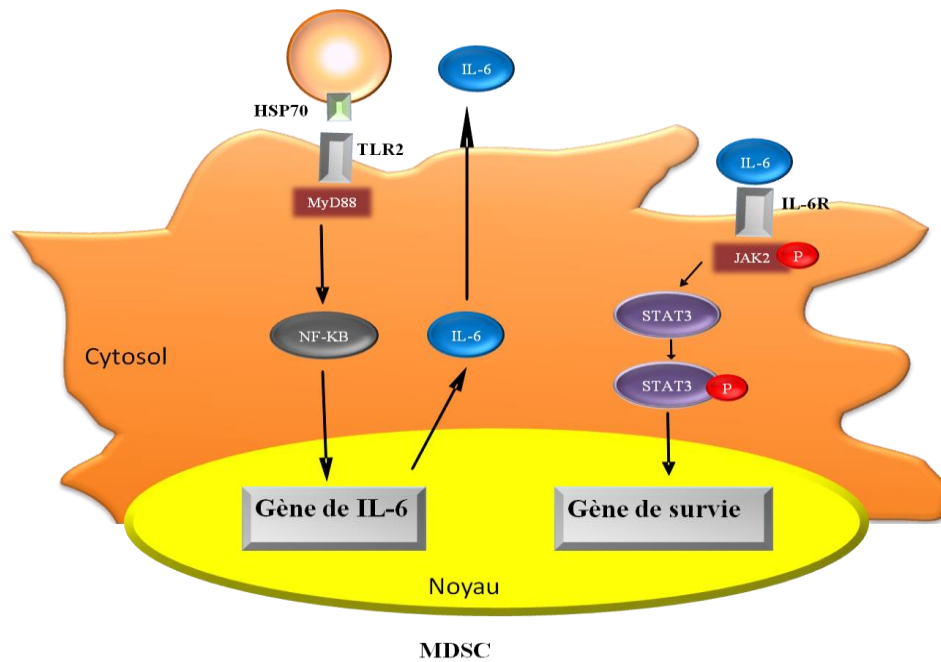


Figure 10 : Activation des MDSCs. L'activation des MDSCs est provoquée par l'interaction de HSP70 (via son TKD) sur les exosomes et le TLR2 sur les MDSCs. Les effecteurs cytosoliques du récepteur TLR2, MyD88 permet par la voie NF-κB, l'expression de la cytokine inflammatoire IL-6. Cette dernière par voie autocrine va lier le récepteur IL-6 des MDSCs activant la phosphorylation de STAT3 par la voie JAK2. STAT3 phosphorylée induit ensuite l'activation des gènes de la voie de survie dans les MDSCs.

2. Mécanismes et effets immunosuppresseurs des MDSCs

Dans un contexte cancéreux, de nombreux mécanismes sont impliqués dans l'immunosuppression induite par les MDSCs. Cela permet à ces cellules d'agir sur différents effecteurs de l'immunité (Figure 11). La première cible des MDSCs sont les lymphocytes T (LT). Deux mécanismes sont mis en place, l'expression par les MDSCs de l'enzyme Arginase-1 et l'induction des ROS (*Reactive Oxygen Species*). Concernant l'arginase-1, elle a pour cible la L-arginine qui régule les fonctions des LT en modulant l'expression du TCR. L'arginase-1 va inhiber la réponse des lymphocytes T en catabolisant la L-arginine en urée et L-ornithine (Raber, Ochoa, & Rodríguez, 2012) diminuant ainsi leur cytotoxicité. Les ROS sont impliquées dans la diminution de la prolifération des LT. L'arginase-1 est aussi capable d'agir sur les NK en bloquant leurs effets cytotoxiques. Les MDSCs synthétisent également des facteurs solubles immunosuppresseurs comme l'IL-10 et le TGFβ (Cuenca et al., 2011). L'IL-10 bloque la transcription de l'IL-12, inhibant ainsi les macrophages et les cellules dendritiques. Enfin, les MDSCs agissent aussi sur les lymphocytes Treg, en favorisant : la conversion des LT CD4⁺ en Treg et ensuite leur activation et leur expansion. Le mécanisme

d'action des MDSCs sur les Treg est encore mal compris. Cependant, il semblerait que l'activation des lymphocytes Treg passe par l'interaction CD40-CD40L (Lindau et al., 2013).

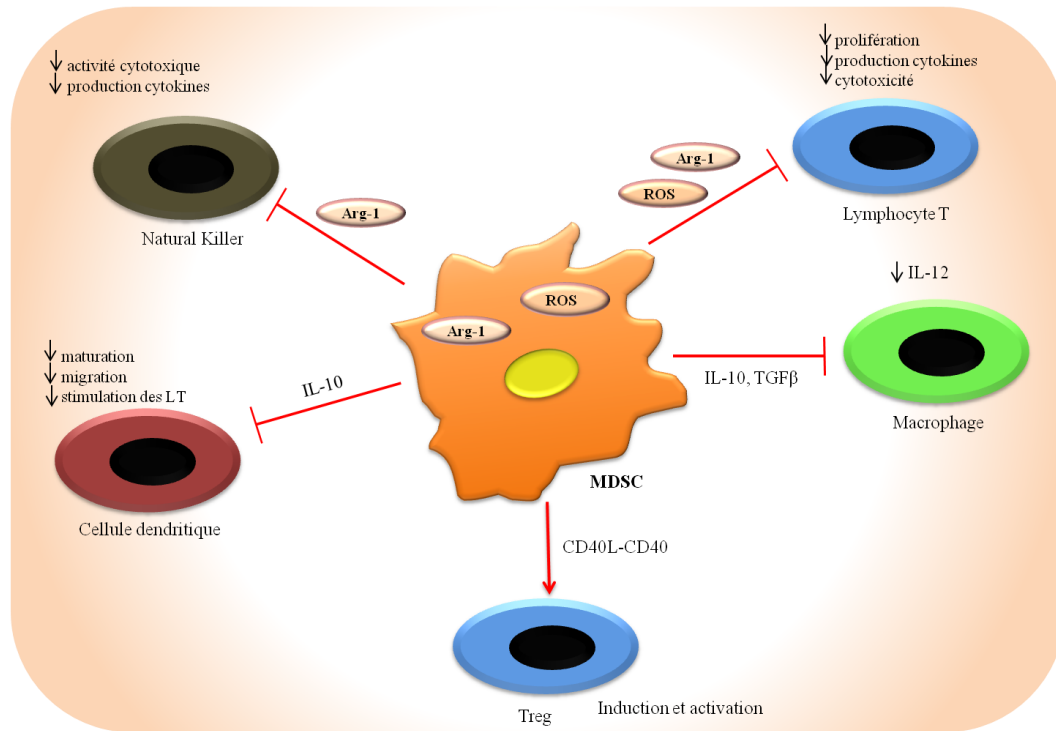


Figure 11 : Mécanismes et effets immunosuppresseurs des MDSCs. L'action des lymphocytes T et des *Natural killer* est inhibée par l'arginase-1 et les ROS synthétisés par les MDSCs. Les MDSCs synthétisent aussi des cytokines immunosuppressives comme IL-10, le TGFβ afin d'inhiber les cellules dendritiques et les macrophages. Enfin, les MDSCs induisent des lymphocytes Treg, permettant de créer un environnement immunosuppresseur. Par ces actions les MDSCs participent au mécanisme d'échappement tumoral des cellules cancéreuses. \dashv Symbole représentant l'effet inhibiteur des HSPs, \rightarrow Symbole représentant l'effet activateur des HSPs.

Pour conclure sur cette partie, les HSPs sont capables de se retrouver dans le milieu extracellulaire sous forme soluble ou associées aux membranes des cellules cancéreuses et des exosomes par divers mécanismes actifs ou passifs. Dans un contexte tumoral, les HSPs extracellulaires peuvent inhiber le système immunitaire en instaurant un environnement immunosuppresseur. En effet, HSP70 libre est capable d'induire la tolérance des cellules dendritiques, générant des lymphocytes Treg, HSP70 liée à la membrane des exosomes tumoraux active des cellules immunosuppressives capables d'inhiber diverses cellules immunitaires. Au regard du rôle extracellulaire de HSP70 nous pouvons dire que HSP70 sous sa forme extracellulaire représente également une cible thérapeutique de choix.

Compte tenu du rôle clé des HSPs et plus particulièrement de HSP70, à la fois par ses fonctions intracellulaires et extracellulaires dans le développement tumoral, il semble important de trouver des inhibiteurs ciblés. L'intérêt d'inhiber HSP70 dans la thérapie anticancéreuse est donc double en agissant (i) sur ses fonctions intracellulaires (inhibition de ses propriétés cyto-protectrices et sensibilisation des cellules cancéreuses à la mort cellulaire) (ii) sur ses fonctions extracellulaires (suppression de ses effets immunosuppresseurs favorisant le développement d'une meilleure réponse immunitaire anti-tumorale).

IV. Les inhibiteurs des HSPs

Les HSPs sont surexprimées dans de nombreuses tumeurs (côlon, estomac, poumons, sein, prostate, de la peau), et cette augmentation est corrélée à : la prolifération cellulaire, la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie, et à un mauvais pronostic. Par conséquent, l'inhibition des HSPs représente un enjeu thérapeutique en cancérologie. L'inhibition des HSPs n'est pas un concept nouveau en thérapie anticancéreuse (particulièrement pour HSP90). Plusieurs inhibiteurs ciblant spécifiquement les HSPs inductibles : HSP27, HSP70 et HSP90 ont été développés (Jego, Hazoumé, Seigneuric, & Garrido, 2013) mais encore trop peu sont arrivés en clinique.

a. HSP27 une cible thérapeutique

HSP27 est une protéine dont la fonction ne dépend pas de l'ATP et pour laquelle, il est donc difficile de concevoir des inhibiteurs chimiques, puisque généralement ces derniers ciblent généralement la poche ATPasique. C'est pourquoi, le seul inhibiteur connu de HSP27: l'OGX-427 vise à bloquer directement son expression. C'est un oligonucléotide anti-sens de deuxième génération dont les études *in vitro* et *in vivo* chez le petit animal, montrent des effets anti-cancéreux. En effet, OGX-427 sensibilise les carcinomes squameux de la tête et du cou aux radiations, inhibe le développement du cancer invasif des cellules non musculaires de la vessie et des cellules du cancer de la prostate. L'OGX-427 sensibilise aussi les cellules tumorales à la chimiothérapie (Baylot et al., 2011). Actuellement, cet oligonucléotide est en phase d'essai clinique II dans le traitement du cancer de la prostate.

b. HSP90 une cible thérapeutique

HSP90 est surexprimée en condition de stress suggérant un rôle protecteur au niveau cellulaire. Si HSP90, est indispensable au bon fonctionnement de cellules saines, une telle activité représente un inconvénient dans la lutte contre le cancer, car la protection de protéines mutées conduit à la survie de cellules cancéreuses. C'est pourquoi les inhibiteurs ciblant cette protéine ont été développés. Actuellement, certains inhibiteurs de HSP90 sont utilisés en thérapie conventionnelle et il existe 17 candidats médicaments qui sont en cours d'essai clinique, utilisés soit en monothérapie soit en association thérapeutique. Les candidats médicaments sont classés en deux catégories : les inhibiteurs naturels et les inhibiteurs synthétiques (actuellement dits de seconde génération). La plupart des inhibiteurs naturels lie l'ABD de HSP90. Le tableau 5 présente une liste des inhibiteurs de HSP90 actuellement en essai clinique.

i. Les inhibiteurs naturels

Le radicicol, un antibiotique antifongique isolé du champignon *Monocillium nordinii* a été le premier inhibiteur de HSP90 identifié. Cette molécule est efficace *in vitro*, mais très instable chimiquement pour être utilisée *in vivo* (Soga, Akinaga, & Shiotsu, 2013). Des dérivés plus stables comme le KF58333 et le VER52296 (NVP-AUY9226) ont été développés. Ces molécules présentent une activité anti-tumorale dans des modèles de xénogreffe de tumeur humaine chez la souris immunodéprimée (Murphy, 2013). La molécule VER52296 est utilisée seule ou en combinaison, actuellement en essai clinique de phase I/II dans de nombreux cancers solides. Les autres inhibiteurs naturels dérivent tous de la geldanamycine, un antibiotique de la famille des benzoquinone ansamycines. Il existe des dérivés moins toxiques comme le 17-allylaminogeldanamycine (17-AAG). Ces inhibiteurs compétitifs se lient à la poche ADP/ATP de HSP90 avec une plus forte affinité que les nucléotides naturels et empêchent la protéine de passer sans cesse d'une conformation liée à l'ADP à une conformation liée à l'ATP. L'activité chaperon de HSP90 est inhibée et ses protéines clientes sont dégradées, en général par le protéasome. Ces molécules sont plus toxiques pour les cellules cancéreuses que pour les cellules normales. Ceci est probablement dû à une plus forte affinité de HSP90 présente dans les cellules cancéreuses pour ses inhibiteurs, elle est 20 à 200 fois plus importante que dans les cellules normales (Kamal et al., 2003). De nos jours, le 17-AAG est l'inhibiteur ciblé le plus avancé. Il est actuellement en phase III, où il est utilisé en combinaison avec le bortezomib, un inhibiteur du protéasome, pour le traitement du myélome multiple. En association avec le Imatinib mesylate (ou Gleevec), cette molécule semble intéressante dans les leucémies myéloïdes chroniques. Le 17-

AAG semble très efficace, cependant, cette molécule a une faible solubilité dans l'eau, c'est pourquoi un dérivé a été généré : le 17-DMAG (*17-(Diméthylaminoéthylamino)-17-déméthoxygeldanamycine* ou KOS-1022). Cette analogue hydrosoluble est administrable *per os*, et a démontré une tolérance acceptable en phase I sur des leucémies et divers cancers solides (Jhaveri & Modi, 2012; Lancet et al., 2010; Rajan et al., 2011).

Un autre dérivé hydrosoluble a également été développé, le IPI-504 (retaspimycine). Il contient une hydroquinone réduite, permettant une meilleure solubilité, facilitant ainsi sa formulation pour un composé oral, en essai clinique sur des patients avec un cancer du sein Her-2 positif métastatique ou un cancer des poumons non à petites cellules (ou NSCLC : *non small-cell lung cancer*).

ii. Les inhibiteurs de synthèse

Des criblages basés sur l'interaction ADP/ATP de HSP90 ont permis d'identifier des inhibiteurs de synthèse. Il s'agit de purines qui ont une plus haute affinité que l'ADP pour l'ABD de HSP90 [17]. Ces molécules sont solubles et ont démontré leur efficacité au cours des phases précliniques. Nous trouvons en essai clinique de phase II les composés suivants : le CCT-018159 (pyrazole 3,4-diarylpurazole) et son analogue STA-9090, ils agissent en tant que forts anti-proliférateurs (Barrott & Haystead, 2013). Enfin, BIIB021 qui est aussi une purine oralement bio-disponible, semble très intéressante. Elle induit en effet la mort cellulaire des cellules de lymphome, du cancer du sein ou du cancer gastro-intestinal (GIST) à travers l'inhibition de la voie NF- κ B. De plus elle semble efficace dans des modèles de cancers dans lesquels le 17-AAG est inefficace à cause de l'expression des glycoprotéines membranaires P-gp impliquées dans la résistance aux drogues. Enfin, la dernière molécule bio-disponible administrée oralement est le : Debio0932. Cette molécule a montré son efficacité chez les souris dans diverses xénogreffes de tumeurs (Isambert et al., 2012). Son inhibition de HSP90 provoquerait la dégradation d'oncoprotéines impliquées dans la progression maligne. Debio0932 est en cours d'essai clinique de phase I/II sur les cancers du sein et des poumons.

D'après ces résultats les inhibiteurs de HSP90 paraissent prometteurs. Cependant, l'inhibition de HSP90 par la geldanamycine et l'ensemble de ses dérivées, induit une compensation par l'expression d'autres HSPs, en particulier HSP70 et HSP27 (Bottoni, Giardina, & Scatena, 2009). HSP70 est largement plus impliquée dans la survie cellulaire que

HSP90 et de ce fait l'induction de HSP70 limiterait les effets des inhibiteurs de HSP90. Ceci renforce l'idée que HSP70 est actuellement une cible thérapeutique clé. De nombreux inhibiteurs de HSP70 sont en cours de développement mais contrairement à HSP90, une seule molécule est en cours d'essai clinique.

Types d'inhibiteurs	Dénomination	Traitement	Phase clinique	Type de cancer	Compagnie
Inhibiteurs naturels	17-AAG (Tanasimpycon, KOS-953)	Seul	II	Cancer du sein métastatique Lymphome Hodgkin Cancer du sein	Kosan biosciences
		Combiné avec Bortezomib	III	Leucémie Lymphome Myélomes Tumeurs solides	
		Combiné avec Gleevec	I	Leucémie myéloïde chronique	
	17-DMAG (Alvespmycin)	Seul	I	Leucémie Cancers solides	
		Combiné avec Trastuzimab (Herceptin)	I	Cancer du sein	
	IP-504 (Retaspimycin)	Seule	II	Cancer du sein métastatique Cancer du poumons	Infinity Pharmaceuticals
		Combiné avec Gleevec	I	Leucémie	
		Combiné avec Docetaxel	III	Cancer des poumons	
	NVP-AUY922 (VER-52269)	Seul	II	Lymphome	Novartis
		Combiné avec Cetuximab	I	Cancer colorectal métastatique	
		Combiné avec Trastuzimab (Herceptin)	I/II	Cancer du sein Cancer gastro-intestinal	
		Combiné avec Erlotinib		Cancer des poumons	
	KF58333 (NVP-HSP990)	Seul	I	Cancers solides	Novartis
Inhibiteurs de synthèse	CCT-018159 (pyrazole 3-,4-diarylpyrazole)	Seul	II	Cancers solides	ND
	MPC-3100	Seul	I	Cancer réfractaire ou récidive	Myriad Pharmaceuticals
	PU-H71	Seul	I	Cancer solides métastatiques Lymphome	Samus therapeutic
	STA-9090 (Ganetespil)	Seul	II	Cancer du poumon	Synta pharmaceuticals
	BIB021 (CNF-2024)	Seul	II	Cancer gastro-intestinal	Biogen Idec
		Combiné avec Trastuzimab (Herceptin)	I	Cancer du sein	
	SNX-5422	Combiné avec Trastuzimab (Herceptin)	I/II	Lymphome Cancers solides	Serenex/ Pfizer
	Debio0932 (CUDC-305)	Combiné avec Cisplatine et Gemcitabine	I/II	Cancer des poumons Cancer du sein	DebioPharm

Tableau 5 : Liste des inhibiteurs de HSP90 en essai clinique. Les inhibiteurs de HSP90 sont classés en deux catégories : les inhibiteurs naturels et les inhibiteurs synthétiques. Les inhibiteurs sont testés seuls ou associés à d'autres médicaments. Actuellement, la molécule la plus avancée au niveau clinique est le 17-AAG, un dérivé d'un inhibiteur naturel.

c. HSP70 une cible thérapeutique

L'activité de HSP70 est dépendante de ses domaines ABD et PBD ainsi que de son interaction avec ses co-chaperons notamment HSP40 et HSP110. C'est pourquoi, des inhibiteurs ciblant l'un ou l'autre de ses domaines ou ses co-chaperons sont développés. L'ensemble de ces inhibiteurs sont regroupés dans la Figure 12.

i. Inhibiteurs liant le PDB

Le PES (2-phenylethynesulfonamide) ou pifithrin- μ a été initialement décrit comme un inhibiteur de l'activité pro-apoptotique mitochondriale, en réduisant l'affinité de p53 pour des protéines apoptotiques telles que Bcl-2 ou Bcl-xl (Strom et al., 2006). Ensuite, il a été montré que le PES est capable d'avoir un effet cytotoxique sur de nombreux types de cancers, mais pas sur les cellules normales (Leu, Pimkina, Frank, Murphy, & George, 2009). HSP70 a été identifiée par spectrométrie de masse comme une protéine interagissant avec le PES. Le PES bloquerait l'interaction de HSP70 avec ces protéines clientes, dont Apaf-1 et p53, favorisant ainsi l'apoptose des cellules cancéreuses. Des études précliniques réalisées sur des modèles de souris atteintes de lymphome spontané de cellules B, ont mis en évidence l'effet protecteur du PES contre le développement du lymphome avec une absence de toxicité du produit dans les reins, le foie, et les autres organes (Balaburski et al., 2013). Un dérivé de PES a été produit, le PES-cl, qui est capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses. Il faut souligner que le PES semble avoir un impact sur HSP90, en bloquant le système chaperon de HSP70/HSP90, provoquant ainsi des nombreux agrégats de protéines insolubles, conduisant à la mort cellulaire.

Notre groupe a développé un inhibiteur de HSP70. Cet inhibiteur a été produit sur la base de l'interaction HSP70/AIF. Cet inhibiteur spécifique nommé ADD70 (*AIF-Derived Decoy for HSP70*) est capable de neutraliser HSP70 dans le cytosol et de rendre les cellules traitées plus sensibles, *in vitro*, à divers stimuli de mort. Dans des expériences, *in vivo* notre équipe a démontré le potentiel du peptide ADD70, dans des modèles animaux de cancer du côlon (rat) et de mélanome (souris) où l'expression du peptide ADD70 par les cellules tumorales injectées aux animaux retardait le développement de la tumeur et limitait la formation des métastases. Ces phénomènes ont été corrélés avec une infiltration plus importante des tumeurs par des lymphocytes CD8⁺, qui sont probablement responsables de la

réduction tumorale (Schmitt et al., 2003). De plus, la sensibilisation des cellules tumorales à la chimiothérapie, précédemment observée *in vitro* a été confirmée *in vivo* dans ces modèles animaux : ADD70 renforce l'effet du cisplatine, mais également celui du 17AAG, inhibiteur de la protéine HSP90 (Schmitt et al., 2006).

ii. Inhibiteurs ciblant l'ABD

L'hydrolyse de l'ATP joue un rôle central dans l'activité chaperon de HSP70. Dans un premier temps le NSC-630668, une dyhydropyrimidine a été identifiée dans la chimiothèque de l'institut national du cancer. A la suite de cela, un dérivé de cette molécule a été développé. Il a été démontré que MAL3-101 bloque la prolifération des lignées cancéreuses du sein (Fewell, Day, & Brodsky, 2001) et semble efficace dans le modèle de xénogreffe pour les myélome multiples (Braunstein et al., 2011). VER-155008 est un composé dérivé de l'adénosine, considéré comme un analogue de l'ATP. Il induit l'apoptose de manière dépendante des caspases dans les cellules du cancer du sein et de façon indépendante des caspases dans des cellules du cancer du côlon (Williamson et al., 2009). Par ailleurs, ce composé augmente le potentiel métastatique du 17-AAG (inhibiteurs de HSP90) dans les cellules du cancer du côlon. Cependant, une étude préclinique montre que l'activité anticancéreuse de ce produit semble limitée (Williamson et al., 2009). D'autres molécules, comme l'azure C, le bleu de méthylène et la myricétine sont considérées comme des inhibiteurs de HSP70 (McConnell & McAlpine, 2013), mais à ce jour, aucune expérience n'a démontré leurs spécificités pour HSP70 (Jinwal et al., 2009). Il faut noter qu'un sphingolipide, le 3'sulfogalactolipide a été décrit pour sa capacité à lier spécifiquement HSP70 et à bloquer l'hydrolyse de l'ATP (Whetstone & Lingwood, 2003). Enfin nous trouvons, la molécule MKT-077, la seule en essai clinique (de phase I). Il a été démontré que MKT-077 s'accumule dans la mitochondrie des cellules cancéreuses, et bloque ainsi la prolifération cellulaire. Malheureusement, les données cliniques montrent que cette molécule présente une forte toxicité rénale (Murphy, 2013).

iii. Inhibiteurs des co-chaperons de HSP70

HSP40 est un co-chaperon essentiel pour HSP70, comme décrit dans la partie II de l'introduction. HSP40 apporte la protéine dénaturer et module l'activité ATPasique de HSP70. Il a été démontré que MAL2-11B se lie à HSP40 ce qui a pour conséquence de compromettre les fonctions cellulaires de HSP70 (Goloudina et al., 2012). Le PES est aussi

capable de bloquer l'interaction entre HSP70 et HSP40. Enfin, nous avons récemment montré que HSP110 est essentielle pour l'échange de nucléotide avec HSP70. Elle est mutée dans 100 % des patients atteints d'un cancer du côlon de type MSI (microsatellite instable). Nous avons démontré qu'un mutant naturel nommé HSP110DE9 bloque l'activité chaperon de HSP70 et sensibilise *in vitro* et *in vivo* les cellules cancéreuses à la chimiothérapie (Dorard et al., 2011).

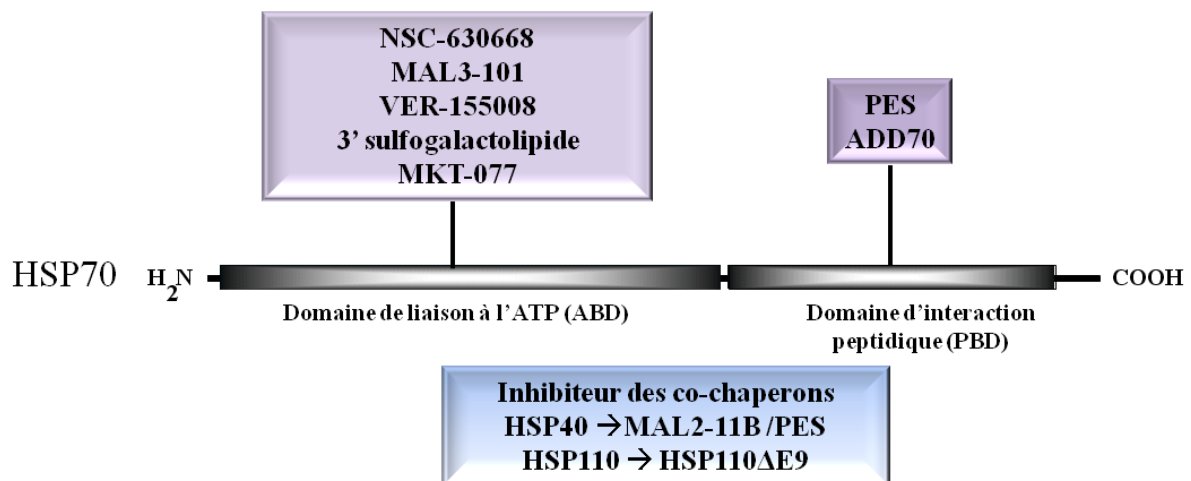


Figure 12 : Les inhibiteurs de HSP70. Les inhibiteurs de HSP70 sont regroupés en trois classes : ceux liant l'ABD, ceux liant le PBD et ceux bloquant les co-chaperons de HSP70. Comme nous pouvons le voir la plus part des inhibiteurs ciblent l'ABD de HSP70, ce qui n'est pas étonnant, car l'activité de HSP70 est directement liée à son activité ATPasique.

Un seul inhibiteur de HSP70 est arrivé en phase clinique contre 17 pour HSP90. Cependant, le fait que (i) HSP70 soit plus fortement impliquée que HSP90 dans le processus de cancérisation et que (ii) la plupart des inhibiteurs de HSP90 induisent une augmentation d'expression de HSP70 renforce l'intérêt de développer des agents ciblant HSP70 pour la clinique qu'il faudra probablement associer à des inhibiteurs de HSP90.

V. Objectifs de la thèse

Ce travail a été effectué au sein du groupe de Carmen Garrido, qui étudie le rôle des protéines de choc thermique dans le cancer depuis plus de 20 ans. Comme présenté dans la partie sur les inhibiteurs des HSPs, notre équipe a généré un peptide, ADD70, affectant les fonctions cytoprotectrices de HSP70. Malgré des résultats expérimentaux *in vivo* intéressants, cette construction est relativement grande et peu soluble. De ce fait, son utilisation en clinique est peu envisageable. Nous avons donc orienté notre recherche vers des molécules de plus petites tailles nommées aptamères peptidiques

Le terme et le concept des aptamères peptidiques ont été créés par Roger Brent en 1996 (Colas et al., 1996), en analogie avec les aptamères d'ADN et d'ARN. Les aptamères peptidiques sont des constructions protéiques combinatoires. La conception des aptamères est directement inspirée de la structure des immunoglobulines ou des récepteurs des cellules. Les aptamères sont composés de deux parties: une séquence peptidique variable (de 8 à 20 acides aminés maximum), insérée dans une armature protéique constante en général la thioredoxine A (*Escherichia coli*), contraignant l'exposition de la partie variable vers l'extérieur de la structure (Figure 13). La séquence peptidique est insérée dans le site catalytique de la thioredoxine afin de rendre cette dernière inerte. Cette conformation rend les aptamères moins vulnérables aux protéases et augmente leur affinité envers la protéine cible (Baines & Colas, 2006).

Les aptamères peptidiques sont utilisés depuis quelques années comme outils thérapeutiques et leur efficacité a été démontrée expérimentalement dans l'inhibition intracellulaire de facteurs impliqués dans la progression tumorale (Crawford, Woodman, & Ko Ferrigno, 2003; Ireson & Kelland, 2006; McConnell & McAlpine, 2013). Par exemple, il a été démontré que le blocage du facteur de transcription LMO2, constitutivement exprimé dans les cellules T leucémiques humaines, par un aptamère peptidique spécifique réduit sa fonction néoplasique et la croissance tumorale (Appert et al., 2009).

En collaboration avec la société Imaxio (Lyon), nous avons entrepris un criblage de deux banques d'aptamères peptidiques ayant pour cible HSP70 en système de double hybride chez la levure. Nous avons obtenu 17 aptamères peptidiques potentiellement inhibiteurs de HSP70 inductible.

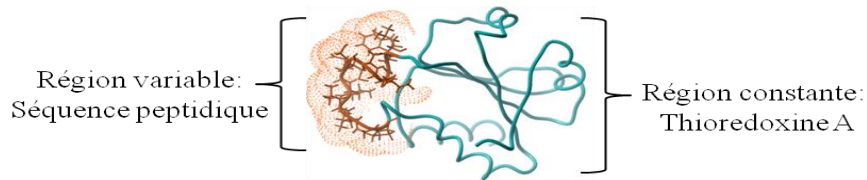


Figure 13 : Représentation schématique d'un aptamère peptidique. Un aptamère peptidique est composée d'une région variable capable d'interagir avec la protéine cible et d'une région constante permettant de stabiliser la région variable.

Mes travaux de thèse ont donc consisté à:

- Démontrer l'effet des inhibiteurs de HSP70 sur la sensibilisation des cellules cancéreuses aux agents chimio-thérapeutiques en bloquant les fonctions intracellulaires de HSP70 (Figure 14).

- Favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale en bloquant l'action extracellulaire de HSP70 (Figure 14).

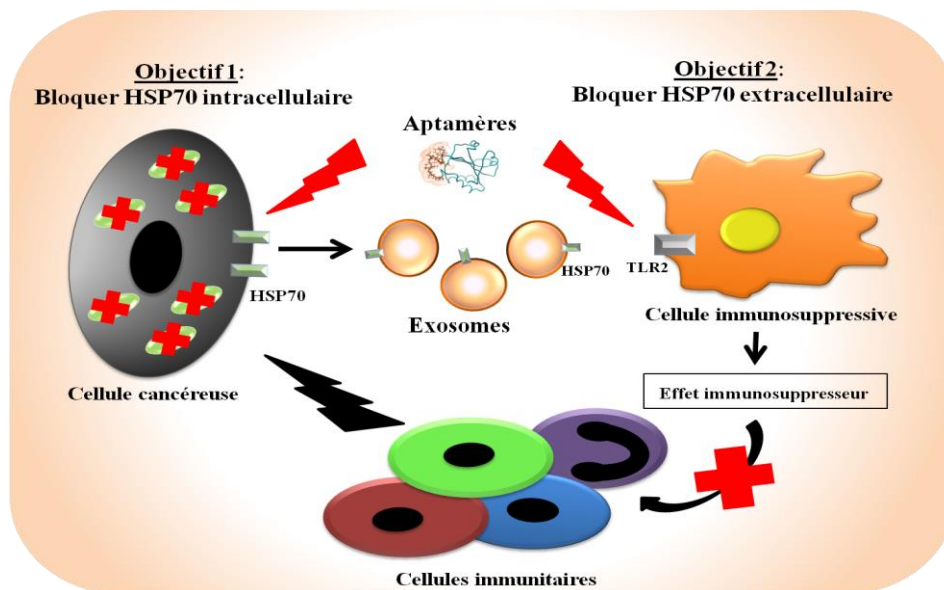


Figure 14. Représentation schématique de mes objectifs de thèse. Hypothèses de travail : HSP70 est surexprimée dans les cellules cancéreuses mais pas dans les cellules normales. De ce fait, (i) HSP70 confère à ces cellules une résistance aux agents chimiothérapeutiques en inhibant les voies de mort cellulaire (ii) les cellules cancéreuses expriment HSP70 à la membrane, ainsi que les exosomes dérivant de ces cellules, permettant ainsi le blocage de la réponse immunitaire antitumorale par l'activation des cellules immunosuppressives. Nous avons donc identifié des inhibiteurs potentiels de HSP70 appelées aptamères peptidiques. Nous espérons avec ces aptamères : (i) bloquer les fonctions intracellulaires de HSP70 et donc favoriser leur mort cellulaire. (ii) bloquer HSP70 extracellulaire afin d'améliorer la réponse immunitaire.

Résultats

La partie résultat sera composée de 3 sous-parties :

Article 1 :

**Peptides and Aptamers targeting HSP70: A novel approach
for anticancer chemotherapy**

Publié en 2011 dans le journal Cancer Research.

Article 2 :

**Restoring anticancer immune response by targeting tumor-
derived exosomes with a HSP70 peptide inhibitor.**

Cet article sera prochainement soumis dans le journal Plos biology.

Une partie orientée vers la clinique,

**Nous exposerons ici l'étude préclinique des aptamères
peptidiques.**

ARTICLE 1:

Peptides and Aptamers targeting HSP70: A novel approach for anticancer chemotherapy

Les protéines de stress sont des chaperons moléculaires très conservées qui sont exprimées constitutivement ou induits en réponse à un stress cellulaire. En l'absence de toute agression, les HSPs participent aux transports des protéines et à la conformation des protéines néo-synthétisées. En situation de stress, les HSPs vont permettre la survie des cellules, par leur capacité à inhiber la mort cellulaire et à restaurer la conformation des protéines endommagées. HSP70 est la protéine de stress la plus induite lors d'une agression cellulaire. Les cellules cancéreuses sont considérées en situation de stress permanent. Elles expriment donc HSP70 de manière constitutive (Garrido & Solary, 2003; Ravagnan et al., 2001), ce qui leur confère une résistance vis à vis des agents chimiothérapeutiques. De fait, lorsque HSP70 est neutralisée, les cellules cancéreuses sont sensibilisées à la mort par apoptose. L'inhibition de HSP70 apparaît donc comme une nouvelle piste thérapeutique en cancérologie. L'inhibition des HSPs n'est pas un concept nouveau en thérapie cancéreuse. Près d'une vingtaine d'inhibiteurs pour la protéine HSP90 sont testés en essai clinique qui pour la plupart des composés dérivent de la geldanamycine, un antibiotique. Actuellement, le 17-AAG combiné avec le bortezomib, un inhibiteur du protéasome est en essai clinique de phase III et montre des résultats encourageants sur les myélomes multiples (McConnell & McAlpine, 2013). Cependant, l'inhibition de HSP90 induit la plupart du temps une expression très importante de HSP70.

Concernant HSP70, très peu de molécules ciblent spécifiquement cette protéine, pourtant au vu de ses fonctions anti-apoptotiques et oncogéniques, il semble important de développer de tels inhibiteurs. C'est pourquoi, nous avons recherché et identifié des molécules ciblant spécifiquement HSP70. Dans cet article, nous rapportons les effets anticancéreux des aptamères peptidiques et de leurs dérivés et montrons chez la souris qu'un peptide peut inhiber la croissance tumorale *in vivo*.

Cet article est divisé en deux parties. Dans la première, nous avons étudié l'effet de l'inhibition des aptamères peptidiques sur le développement tumoral. Dans la deuxième partie, toujours dans une optique de mener ces inhibiteurs en clinique, nous avons optimisé les inhibiteurs en réduisant leur taille. Pour ce faire, nous avons isolé la partie variable de l'aptamère peptidique et nous avons validé l'effet de ces peptides, par différentes expériences *in vitro* et *in vivo*.

Peptides and Aptamers Targeting HSP70: A Novel Approach for Anticancer Chemotherapy

Anne-Laure Rérole¹, Jessica Gobbo¹, Aurelie De Thonel¹, Elise Schmitt¹, Jean Paul Pais de Barros¹, Arlette Hammann¹, David Lanneau¹, Eric Fourmaux¹, Oleg Deminov¹, Olivier Micheau¹, Laurent Lagrost¹, Pierre Colas², Guido Kroemer³⁻⁵, and Carmen Garrido^{1,6,7}

Abstract

The inhibition of heat shock protein 70 (HSP70) is an emerging strategy in cancer therapy. Unfortunately, no specific inhibitors are clinically available. By yeast two-hybrid screening, we have identified multiple peptide aptamers that bind HSP70. When expressed in human tumor cells, two among these peptide aptamers—A8 and A17—which bind to the peptide-binding and the ATP-binding domains of HSP70, respectively, specifically inhibited the chaperone activity, thereby increasing the cells' sensitivity to apoptosis induced by anticancer drugs. The 13-amino acid peptide from the variable region of A17 (called P17) retained the ability to specifically inhibit HSP70 and induced the regression of subcutaneous tumors *in vivo* after local or systemic injection. This antitumor effect was associated with an important recruitment of macrophages and T lymphocytes into the tumor bed. Altogether, these data indicate that peptide aptamers or peptides that target HSP70 may be considered as novel lead compounds for cancer therapy. *Cancer Res*; 71(2); 484–95. ©2011 AACR.

Introduction

Stress-inducible heat shock protein 70 (HSP70) is a prominent cytoprotective factor. Under normal conditions, HSP70 functions as an ATP-dependent chaperone by assisting the folding of newly synthesized proteins and polypeptides, the assembly of multiprotein complexes, and the transport of proteins across cellular membranes (1–3). HSP70 upregulation by cellular stress or transfection-enforced HSP70 overexpression inhibits apoptosis induced by a wide range of insults and may facilitate oncogenic transformation (4, 5). Thus, HSP70 overexpression increases the tumorigenicity of cancer cells in rodent models (6) and correlates with poor prognosis in cancer (7). Conversely, HSP70 downregulation is sufficient to kill tumor cells or to sensitize them to apoptosis induction *in vitro* (8) and can reduce tumorigenicity *in vivo* (9). The antiapoptotic function of HSP70 involves interactions with several components of the apoptotic machinery. HSP70 has been demonstrated to bind to Apaf-1, thereby preventing the

recruitment of procaspase-9 to the apoptosome (10). Moreover, HSP70 can inhibit apoptosis by directly neutralizing the caspase-independent death effector, apoptosis inducing factor (AIF; 11).

Targeting HSPs is an emerging concept in cancer therapy. Different inhibitors of HSP90 are being tested in clinical trials. These are mainly compounds derived from the geldanamycin antibiotic, such as the 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG), but they also include synthetic small molecules designed to bind the ATP domain of HSP90 (12). Like the synthetic molecules, geldanamycin derivatives also associate with the HSP90 ATP domain, thus inhibiting ATP binding and, therefore, affecting the function of signaling proteins whose structure depends on the HSP90 chaperone activity (13, 14). Currently, 17AAG is being tested for its chemosensitizing effects in phase III clinical trials, with encouraging results in multiple myeloma (15).

HSP70 can be targeted by a "negative" strategy, that is, siRNAs or antisense oligonucleotides to downregulate its expression (8, 9). In addition, we have shown the feasibility of a "positive" HSP70-targeting, chemosensitizing strategy in which a molecule that antagonizes HSP70 at the protein level is introduced into cancer cells. Based on our previous results, which showed that HSP70 specifically binds to AIF and sequesters it in the cytosol (16), we designed a construct, encoding the minimal AIF region required for HSP70 binding. This AIF derivative, called ADD70 (for AIF-Derived Decoy for HSP70), interacts with the peptide-binding domain of HSP70, thereby inhibiting the interaction of HSP70 with AIF and other client proteins. ADD70 was not cytotoxic on its own, yet it displayed chemosensitizing properties *in vitro* and *in vivo* in rodent models (17). Confirming the interest in neutralizing HSP70 in cancer therapy, 2-phenylethanesulfonamide (PES), a

Authors' Affiliations: ¹INSERM UMR 866, Faculty of Medicine and Pharmacy, Dijon, France; ²CNRS USR 3151, Roscoff, France; ³INSERM U848, ⁴Institute Gustave Roussy, and ⁵Université Paris Sud/Paris 11, Villejuif, France; and ⁶Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, and ⁷CHU Dijon BP1542, Dijon, France

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

A-L Rérole and J. Gobbo contributed equally to this work.

Corresponding Author: Carmen Garrido, INSERM UMR 866, Faculty of Medicine and Pharmacy, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21033 Dijon, France. Phone: 33-3-80-39-32-84; Fax: 33-3-80-39-34-34; E-mail: cgarrido@u-bourgogne.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1443

©2011 American Association for Cancer Research.

recently introduced small inhibitor of HSP70, has been described to retard tumor growth in a mouse model of MYC-driven lymphoma (18, 19).

Taking into account the antiapoptotic and oncogenic functions of HSP70 and the fact that very few molecules specifically target HSP70, we sought to construct small peptides that target additional molecular surfaces of HSP70, which may serve as lead compounds for the development of small HSP70 inhibitors. We report here the mechanistic exploration of the anticancer effects of HSP70-targeting aptamers and provide a proof-of-principle that such peptides can inhibit tumor growth *in vivo*.

Materials and Methods

Cells, plasmids, transfections, and products

HeLa cells [provided by American Type Culture Collection (ATCC), 2007]. Mouse embryonic fibroblasts (MEF; ATCC 2007), *HSP70.1*^{-/-} MEF (heat shock factor 1^{-/-}; 20), and *HSP70.1*^{-/-} *HSP70.3*^{-/-} MEFs (MEF HSP70^{-/-}; 21) are cultivated in DMEM 10% FBS (Lonza); the mouse B16F10 melanoma cell line (ATCC) is cultivated in RPMI 10% FBS (Lonza); and the rat colon cancer PROb cells (22) are cultivated in HAM'S F10 10% FBS (Lonza). Transfections were done by using the Superfect reagent (Qiagen) or the Chariot transduction agent (active motif; Rixensart). G418 (Sigma-Aldrich) was used at 400 µg/mL. The peptides from the variable region of the aptamers were synthesized and purified by Proteogenix and diluted in PBS at the indicated concentration. Recombinant HSPs were from StressGen (TebuBio) and were used at 3.5 ng/µL. PES (Sigma-Aldrich) was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) and used to a final concentration of 10–20 µmol/L. Cisplatin (Sigma-Aldrich) was diluted in PBS and used to a final concentration of 12.5, 25, or 50 µmol/L. Etoposide and 5-FU (Sigma-Aldrich) were diluted in PBS and used to a final concentration of 10 µmol/L.

Immunoprecipitation and Western blotting

Transfected cell (HSP70, aptamers) were lysed in lysis buffer [50 mmol/L HEPES (pH 7.6), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, and 0.1% NP40], incubated with HA-tag antibody (16B12 clone), and subjected to immunoblotting. For the *in vitro* coimmunoprecipitation, we used HSP70 WT or the corresponding mutants (both HA-tagged) with purified peptides (biotin-tagged) or peptide aptamers (MYC-tagged). The peptide aptamers were produced with the TNT Quick Coupled Transcription/Translation System as follows: 1 µg of template plasmid DNA was added to the reaction mixture that was later incubated at 30°C for 90 minutes. Immunoprecipitates were separated in a 10% or 14% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes using a wet transfer apparatus (Bio-Rad). After blocking nonspecific binding with 5% (w/v) nonfat dry milk, membranes were first probed overnight using primary antibodies: HA-tag antibody was from Covance (Eurogentec); HSC70 (B-6 clone) was from Santa-Cruz (TebuBio); and the MYC-tag antibody (9B11 clone) was from Cell signaling (Ozyme; ref. 23). Next, the membranes were incubated for 1 hour with appropriate

secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and revealed with ECL (Amersham).

Cell death analysis

The 2.5×10^5 adherent cells were plated onto 6-well culture plates in a complete medium. When indicated, cells were treated with cisplatin (CDDP, 12.5, 25, or 50 µmol/L), etoposide, or 5-fluorouracil (5-FU; 10 µmol/L) for 24 hours, and/or the same was applied to peptides P0, P8, and P17 (1–5 mg/L, 24 hours). Cell death was measured by the crystal violet colorimetric assay or Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) staining. For PS exposure, 10^5 cells stained with propidium iodide (PI) and FITC-Annexin V conjugate were analyzed by flow cytometry with a FACS Scan flow cytometer (Becton Dickinson). Caspase-3 activity was determined by using the fluorochrome FITC-DEVD-fmk (PromoKine Caspase-3 staining kit; PromoCell).

HSP70 chaperone activity

HSP70 chaperone activity was evaluated with a protein thermostability assay. Recombinant HSP70, HSP90, or HSC70 were added (3.5 ng/mL; Stressgen, TebuBio), with or without the molecules to test (100 ng/mL), to 2 mg/mL of total proteins from *HSP70.1*^{-/-} MEFs (Dc Assay kits; Bio-Rad). The mixture was heated at 55°C for 1 hour. After centrifugation to eliminate the aggregated proteins, the remaining native proteins in the supernatant were quantified. The ratio between the initial amount of soluble proteins and that obtained after heating allowed for the quantification of protein aggregation.

Tumor growth analysis *in vivo*

Exponentially growing B16F10 cells (wild-type and aptamers-transfected) were harvested and resuspended in an RPMI medium without FBS to a concentration of 2×10^6 /mL B16F10 cells. *In vivo* studies were performed in wild-type or *nu/nu* C57/BL6 mice (Charles River). B16F10 cells (5×10^4 cells) were injected s.c. into the right flank. Tumor volumes were evaluated every 2 days. The animals were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie, France. All experiments were approved by the Comité d'Éthique de l'Université de Bourgogne.

Histologic study of the tumor

Animals were killed 14 or 19 days after cell injection. The site of the tumor cell injection was resected and snap-frozen in methylbutane that had been cooled in liquid nitrogen. An immunohistochemical study of tumor-infiltrating inflammatory cells was done on acetone-fixed 5-µm cryostat sections. Two independent experiments were done in which 4 mice were injected with the different cells.

Isolation of plasma lipoproteins by gel filtration and analysis of the peptides by MALDI-TOF

Total lipoproteins were isolated from human plasma in the $d < 1.21$ g/mL fraction and were dialyzed overnight against PBS. For each aptamer, mixtures of lipoproteins (1.9 mg/mL of protein) and peptide (0.7 mg/mL) were incubated for 1 hour

prior to being fractionated by gel permeation chromatography on a Superose 6HR column. Peak fractions containing individual lipoproteins (VLDL, very low density lipoproteins; LDL, low density lipoproteins; HDL: high density lipoproteins) were delipidated with 100 volumes of ethanol to diethylether (3:2). The delipidated lipoprotein fraction was then mixed with 9 volumes of α -cyano-hydroxy-cinnamic acid (1 mg/mL) dissolved in a ratio of acetonitrile to trifluoroacetic acid to H₂O (60:0.1:30, v:v:v). Peptides were spotted on a ground steel plate and analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry on an Ultraflex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonique S.A.) in the reflectron mode.

Statistical methods

For *in vitro* experiments, Student's *t* test and the ANOVA test (mean \pm SD) were used for statistical analysis as appropriate. All *P* values were calculated using 2-sided tests, and error bars in the graphs represent 95% CIs. For the analysis of HSP70 activity, we used a repeated-measure ANOVA model and evaluated with Holm-Sidak.

Results and Discussion

Selection of HSP70-binding peptide aptamers

An optimized yeast 2-hybrid procedure was used to select peptide aptamers for their ability to bind to HSP70 (24). Two peptide aptamers libraries, consisting of an *Escherichia coli* thioredoxin scaffold displaying variable peptide loops of 8 or 13 amino acids and both of a complexity of 2.5×10^7 transformants (25), were screened. We selected 8 aptamers with a variable region of 8 amino acids and 9 aptamers with a variable region of 13 residues (Table 1). To find the capacity of these aptamers to bind to endogenous HSP70 in mammalian cancer cells, we cloned the aptamer coding sequences into an HA-tagged pcDNA3 vector and transiently transfected them into HeLa cells. We then immunoprecipitated the aptamers with an HA-tag antibody (Fig. 1A, bottom blots) and revealed the endogenous HSP70 bound by immunoblot (Fig. 1A, top blot). HSP70 was coimmunoprecipitated to various extents with most peptide aptamers. Four peptide aptamers (A8, A11, A12, and A17) exhibited particularly strong binding to HSP70 (Fig. 1A).

HSP70 inactivation in cancer cells sensitizes them to apoptotic killing by anticancer chemotherapeutics (9, 21, 26). Therefore, we analyzed the chemosensitizing properties of the 17 selected aptamers. HeLa cells transiently transfected with aptamer expression vectors were treated with the anticancer agent cisplatin, and cell survival was assessed. None of the aptamers exhibited any cytotoxicity on their own (Fig. 1B). However, 2 aptamers (A8 and A17) strongly sensitized the cells to killing by cisplatin (Fig. 1B). Importantly, A8 and A17 belonged to the group of peptide aptamers that showed the highest apparent binding affinity for HSP70 (Fig. 1A), inciting us to continue their characterization.

Aptamers A8 and A17 sensitize to apoptotic cell death

HeLa cells were mock-transfected or transiently transfected with expression vectors that either coded for an HA-tagged

Table 1. The amino-acid sequences of the variable regions of the selected peptide aptamers

Peptide aptamers	Sequence (AA)
A1	HTLLTPRR
A2	ICLRLPGC
A3	KAFWGLQH
A4	LALMLPGC
A5	LGFWGLPH
A6	LVPCLPGC
A7	RALWGLQH
A8	SPWPRPTY
A9	AKWVGDLTLCRWR
A10	CIPMAWAVSWPHF
A11	CIWVSDGKKLWRH
A12	CYTQYRKCQELTA
A13	EVWRLAEFLAMPP
A14	IAAHDTGPGVWLS
A15	PNEVNRLAHLRLH
A16	SPLGYGFAVRNSG
A17	YCAYSPRHKTTF

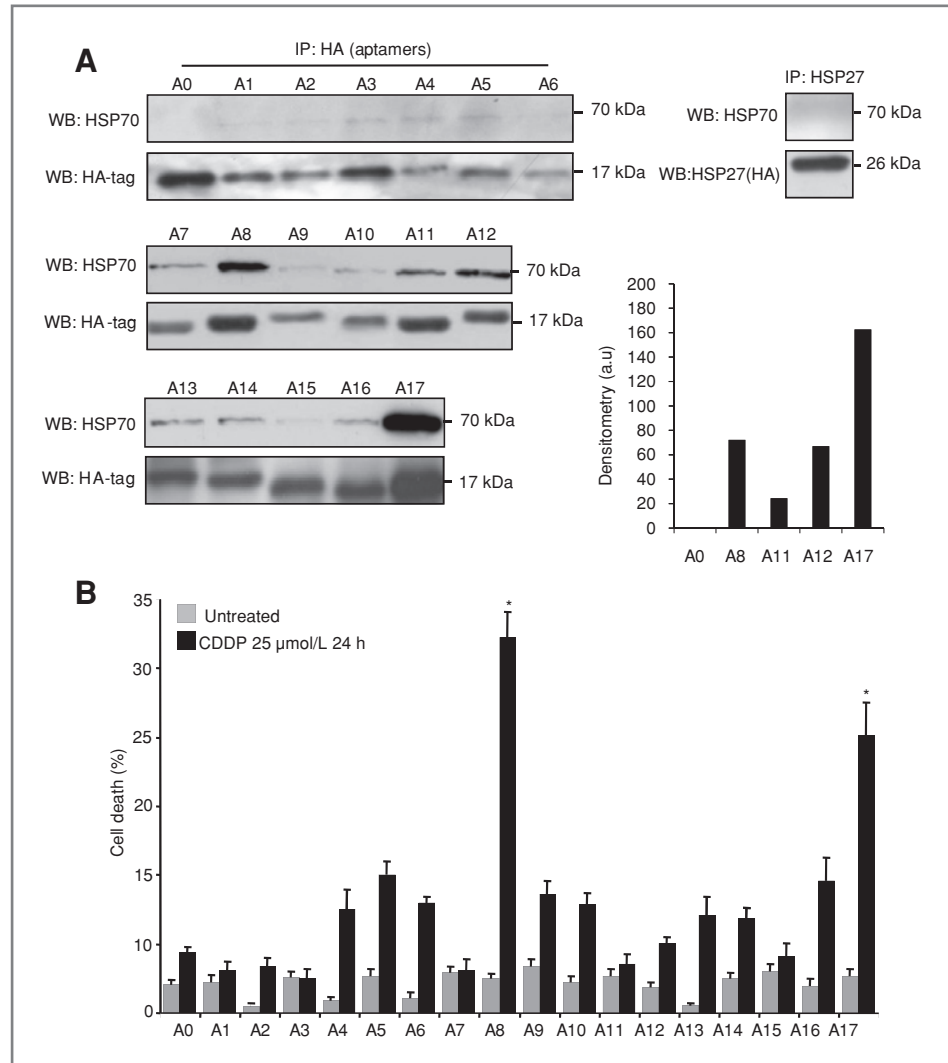
NOTE: A yeast 2-hybrid procedure was used to select peptide aptamers for their ability to bind to HSP70 from 2 peptide aptamer libraries, consisting of an *E. coli* thioredoxin scaffold displaying variable peptide loops of 8 or 13 amino acids.

control aptamer, which did not bind to HSP70 in the yeast 2-hybrid assay (A0), or for the HSP70-targeted aptamers A8 or A17. Then, the cells were treated with different concentrations of cisplatin, and cell death was determined by a crystal violet colorimetric assay. As shown in Figure 2A, none of the aptamers induced cell death on its own. However, after cisplatin treatment, the aptamers A8 and A17 increased the percentage of cell death, for example, by a factor of 3 to 4 for a concentration of cisplatin of 25 μ mol/L during 24 hours. That this cell death was apoptosis was determined by counting the cells presenting chromatin condensation (Hoechst 33343), PS exposure (FITC-Annexin V), and caspase-3 activation (FITC-DEVD-fmk; Fig. 2B–D). Figure 2E shows that the sensitizing effect of the HSP70 peptide aptamers was not just specific for cisplatin but was a more general effect since A8 and A17 also strongly increased apoptosis induced by other chemotherapeutic drugs such as 5-FU or etoposide. A similar sensitizing effect to apoptosis was obtained in mouse melanoma B16F10 cells that were stably transfected with A8 or A17 (Supplementary Fig. 1).

A8 and A17 are specific for inducible HSP70 and bind to distinct HSP70 domains

The recently described small molecule inhibitor of HSP70, PES, binds to the peptide-binding domain of HSP70 (19), contrasting with the fact that HSP90 inhibitors that efficiently

Figure 1. Selection of HSP70 peptide aptamers. **A**, HeLa cells transiently transfected with the 17 aptamers-HA-tagged were immunoprecipitated using an HA-tag antibody, and then the endogenous HSP70 was revealed by immunoblot with an anti-HSP70 antibody (top blot). As a negative control, we used the aptamer A0-HA-tagged that did not bind to HSP70 in the yeast 2-hybrid assay. For the indicated peptide aptamers, the amount of HSP70 that binds to the peptide aptamer was quantified by densitometric analysis. **B**, HeLa cells transiently transfected with the HA-tagged peptide aptamers were treated with cisplatin (25 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours. Cell death was assessed by the use of a vital dye ($X \pm \text{SD}$, $n = 4$). *, $P < 0.05$. Controls, mock transfected cells and the A0 aptamer.



block its chaperone activity (currently in clinical trials) bind to the ATP-binding domain of HSP90 (27). Immunoprecipitation experiments demonstrated that A17 binds to the HSP70 ATP-binding domain (HSP70 Δ PBD), and the aptamer A8 specifically binds to the HSP70 peptide-binding domain (HSP70 Δ ABD; Fig. 3A). To find the contribution of inducible HSP70 (as opposed to constitutive HSP70-like proteins) to A8- and A17-mediated cell killing, we evaluated chemosensitization by these aptamers on MEFs originating from wild-type mice or from mice that were deficient for inducible HSP70 (*HSP70.1*, *HSP70.3*). Both peptide aptamers A8 and A17 showed a strong chemosensitizing effect on wild-type MEFs responding to cisplatin (Fig. 3B). In sharp contrast, both aptamers were completely inactive on HSP70.1^{-/-} HSP70.3^{-/-} MEFs (Fig. 3B). Similarly, A8 and A17 lost their chemosensitizing properties in HeLa cells that were depleted from inducible HSP70 by small interfering RNAs (siRNAs; Fig. 3C). These results indicate that A8 and A17 both specifically exert their chemosensitizing effects through the blockade of the antiapoptotic activity of inducible HSP70.

The specific effect of A8 and A17 for the HSP70 chaperone was further studied by a novel method set up in our laboratory (Fig. 3D). Proteins were extracted from MEFs that lack *HSF1*, the main transcription factor responsible for stress-induced HSP expression (28–30). Therefore, *HSF1*^{-/-} MEF cells express reduced levels of all inducible HSPs including HSP70. These *HSF1*^{-/-} MEF proteins were heated (55°C, 1 hour), and protein aggregation was determined in the presence or absence of recombinant HSPs, alone or in combination with the HSP70 peptides aptamers. By virtue of their chaperone activity, recombinant HSP70, HSC70, or HSP90 significantly reduced the amount of aggregated proteins (Fig. 3E and F). The A17 aptamer (and less so, the A8 aptamer) inhibited HSP70 chaperone activity, but no such inhibitory activity was observed for the control aptamer A0. Neither A17 nor A8 blocked the chaperone activity of recombinant HSC70 or HSP90 (Fig. 3E), indicating that they are indeed specific for HSP70.

We next tested, in this *in vitro* assay, whether the synthetic heptapeptide (P8) and tridecapeptide (P17) corresponding to

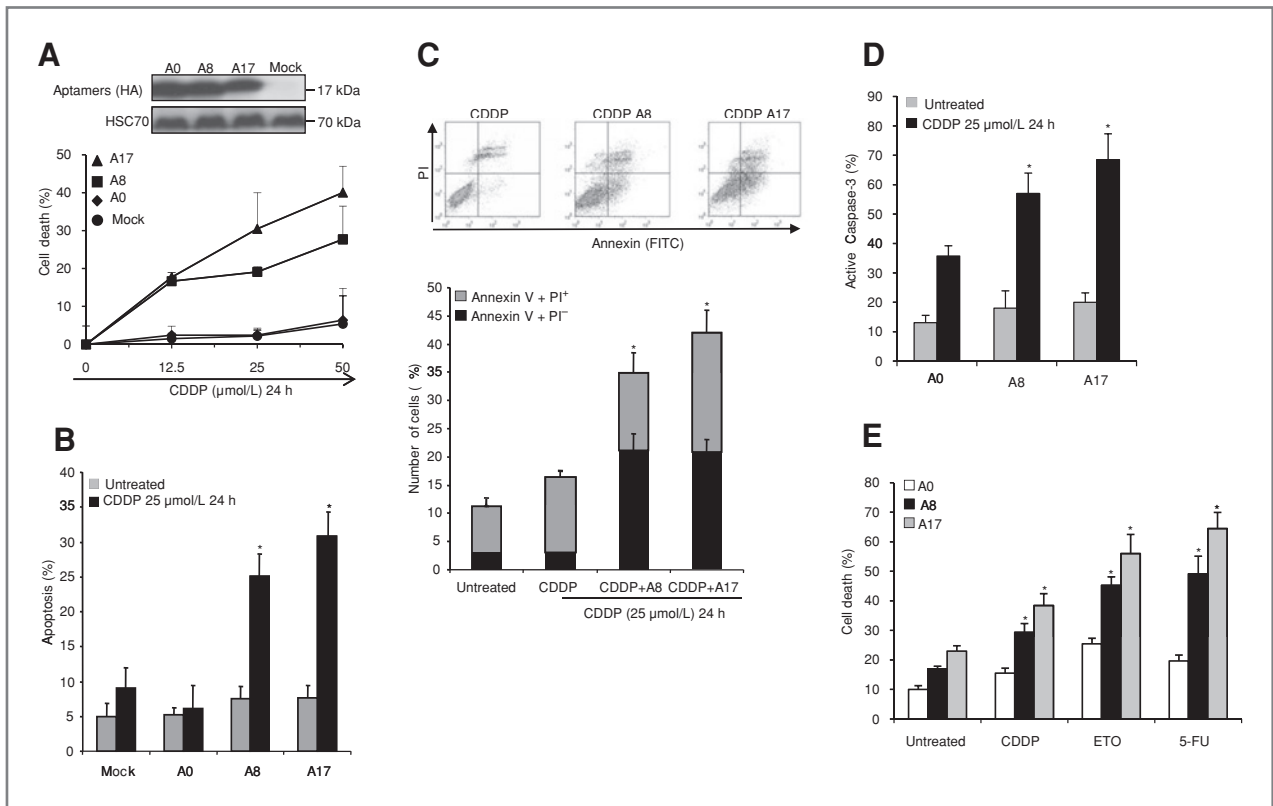


Figure 2. Aptamers A8 and A17 sensitize to apoptotic cell death. A, human HeLa cells mock transfected or transfected with the indicated HA-tagged peptide aptamers were either left untreated or treated with the indicated concentrations of cisplatin for 24 hours. Cell death was determined by a crystal violet colorimetric assay ($X \pm SD$, $n = 4$). Aptamers expression in the different transfected cells was monitored by Western blotting. B, apoptosis was measured in the previously described cells that were treated with cisplatin (25 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours) by counting cells with condensed and fragmented nuclear chromatin after cell staining with Hoechst 33342 dye ($X \pm SD$, $n = 4$). C, to determine phosphatidyl serine exposure, cells described in B were stained with PI and FITC-Annexin V and analyzed by flow cytometry. D, caspase-3 activity was found by using the fluorochrome FITC-DEVD-FMK in the cells described in B. E, HeLa cells mock transfected or transfected with the indicated HA-tagged peptide aptamers (A0, A8, A17) were either left untreated or treated with cisplatin (CDDP, 25 $\mu\text{mol/L}$), etoposide (ETO, 10 $\mu\text{mol/L}$), or 5-FU (10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours. Apoptosis was measured by phosphatidyl serine exposure, as described in C. $X \pm SD$, $n = 4$; *, $P < 0.05$.

the variable regions of A8 and A17, respectively, also inhibited the HSP70 chaperone activity. P17 was able to block HSP70 chaperone activity, yet failed to inhibit HSP90 (Fig. 3F). P8 exhibited a rather moderate inhibitory activity on the HSP70 chaperone function (Fig. 3F).

HSP70-binding peptide aptamers induce tumor regression *in vivo*

Next, we found whether A8 or A17 inhibited tumor growth *in vivo*. B16F10 melanoma cells were stably transfected with the aptamer expression vectors (A8, A17, and as a control, A0) and were injected subcutaneously into syngeneic C57/BL6 mice (9 mice/group). Stable expression of the peptide aptamers did not significantly alter the basal level of HSP70 or HSC70 (Fig. 4 and Supplementary Fig. 2). Cells expressing the A0 aptamer, such as wild-type B16F10 cells, formed tumors that rapidly progressed. In contrast, tumors expressing the aptamers A8 or A17 gave rise to smaller tumors that did not progress (Fig. 4A). Mice bearing B16F10-A0, B16F10-A8, or B16F10-A17 tumors were treated with cisplatin (10 mg/kg *i.p.*), given as a single dose on day 6 after the tumor cells injection.

Cisplatin treatment slightly reduced the growth of control tumors (B16F10-A0), yet failed to eradicate these tumors. In contrast, most B16F10-A17 and, less so, B16F10-A8 tumors exhibited a complete response to cisplatin, and most mice remained tumor-free (8 mice of 9 for A17 and 6 of 9 for A8; Fig. 4A). Very similar results were obtained in the rat PROb colon cancer model (Supplementary Fig. 3).

Interestingly, when B16F10-A8, B16F10-A17, and control B16F10-A0 melanoma cells were injected into immunodeficient athymic nude (*nu/nu*) mice, all tumors progressed with similar kinetics (Fig. 4B). Similarly, PROb-A0, PROb-A8, and PROb-A18 colon cancer cells proliferated indistinguishably in athymic nude rats (not shown). To further analyze the immune response induced by peptide aptamers, we conducted immunohistochemical analyses in sections from tumors grown in immunocompetent C57/BL6 mice. When compared with control B16F10-A0 tumors, B16F10-A8 and B16F10-A17 tumors exhibited a stronger infiltration by CD8⁺ T cells and macrophages (Supplementary Fig. 4 and Supplementary Table 1), suggesting that HSP70 inhibition in tumor cells can trigger an antitumor immune response (9, 21). This is

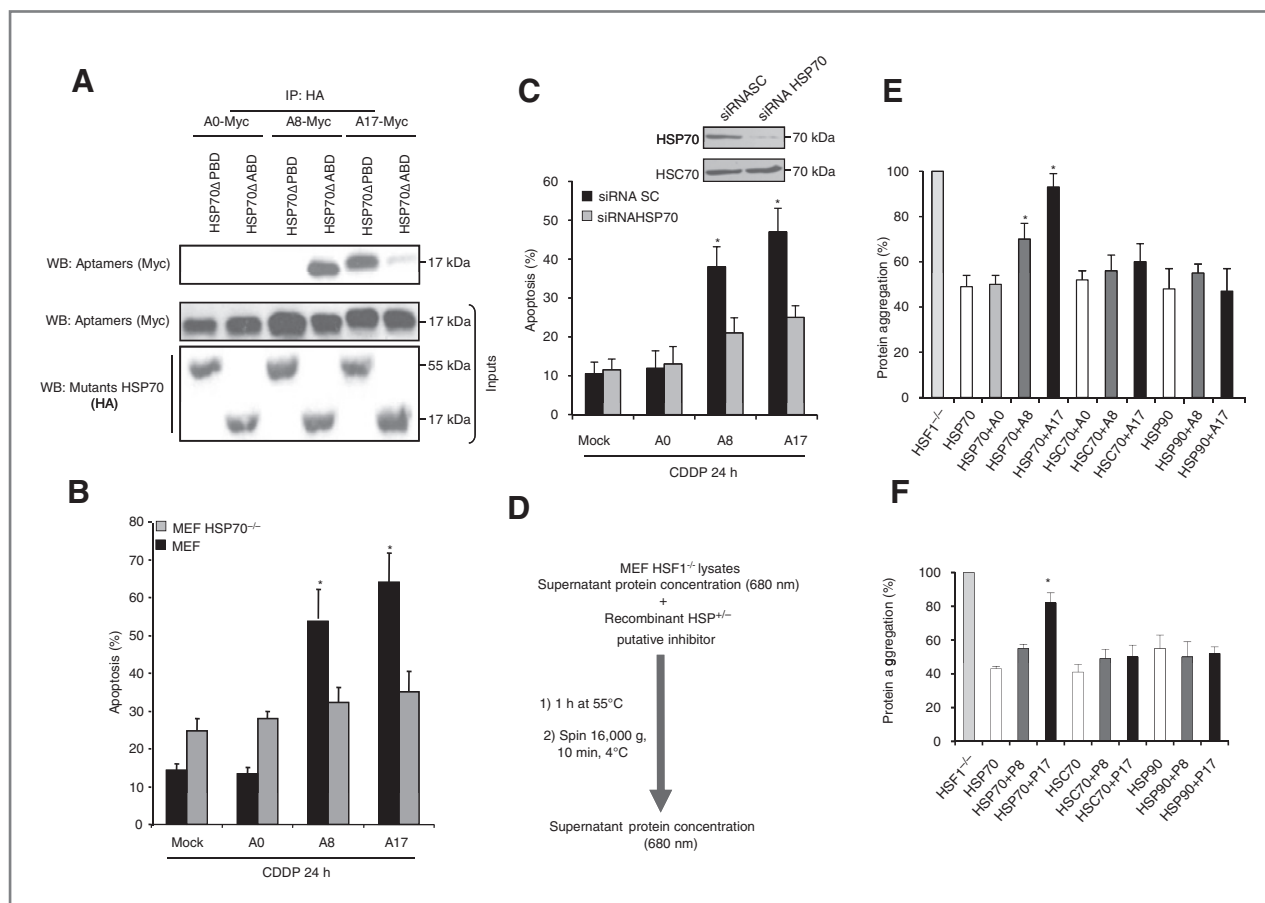


Figure 3. Aptamers A8 and A17 bind to distinct domains of HSP70 and are specific for inducible HSP70. **A**, coimmunoprecipitation done between HSP70 protein, containing either the ATP-binding (HSP70ΔPBD) or the PBD domain (HSP70ΔABD), and the HSP70 peptide aptamers. **B**, wild-type MEF cells or MEF HSP70^{-/-} were transfected with indicated aptamers and treated with cisplatin (25 μmol/L, 24 hours). Apoptosis was measured by Hoechst 33342 staining ($X \pm SD$, $n = 3$). **C**, HeLa cells were transfected first with a siRNAHSP70 or a scrambled control (siRNA SC) and then, 24 hours later, with the indicated aptamers. Apoptosis was measured after cisplatin treatment (25 μmol/L, 24 hours) by Hoechst 33342 staining ($X \pm SD$, $n = 3$). **D**, scheme of the *in vitro* protein thermolability assay to evaluate chaperone activity. Recombinant HSP70, HSP90, or HSC70 were added, with or without HSP70 peptide aptamers, to protein extracts from HSF1^{-/-} MEF cells. The mixture was heated at 55°C for 1 hour. The ratio between the amount of soluble proteins before and after heating allowed us to quantify protein aggregation. **E**, the inhibitory effect of A8 and A17 on HSP70 antiaggregation activity was quantified as described in **D**. **F**, the inhibitory effect of purified peptides P8 and P17 on HSP70 chaperone activity was measured as in **D**. Each bar is the mean value of 4 different experiments. *, $P < 0.05$.

in accordance with our recent work, showing that HSP70 is abundantly expressed in the surface of exosomes secreted by cancer cells and is essential for the activation of the immunosuppressive functions of myeloid cells (31).

P17 sensitizes to apoptotic cell death *in vitro*

HSP70 peptide aptamers synthesis/purification in sufficient quantities for their study *in vivo* in a more therapeutic, established tumor setting was difficult because of their poor solubility. Therefore, we decided to test whether we could use the 8- or 13-amino acid peptides from the variable region of the aptamers (Table 1). As mentioned above (Fig. 3F), the synthetic peptides P8 and P17, corresponding to the variable regions of A8 and A17, were able to inhibit the HSP70 chaperone activity in a cell-free assay. Further, the addition in the culture medium of P17 peptide (100 ng/mL), but not P8, was also able to sensitize B16F10 (Fig. 5A) and HeLa cells (not

shown) to cisplatin-induced apoptosis. We concluded that although P8 lost the apoptosis-sensitizing properties of A8, P17 kept the HSP70 inhibitory and chemosensitizing properties of A17 (Figs. 3F and 5A). This differential effect might relate to the stability of peptides in the experimental medium. Although the peptides P0, P8, and P17 could be perfectly detected just after their addition in the culture medium (they gave the expected monoisotopic m/z values), only the P17 peptide was still detected by mass spectrometry analysis as late as 1 hour after its addition (Supplementary Fig. 5A). The increased stability of P17 might relate to its ability to associate with plasma lipoproteins (32, 33). Plasma lipoproteins were incubated for 1 hour at 37°C with P0, P8, or P17 and 4 fractions containing VLDL (elution volume: 6–8 mL), LDL (elution volume: 8–12.5 mL), HDL (elution volume: 12.5–17 mL), or unbound proteins that were separated by gel filtration chromatography (Supplementary Fig. 5B). Although P0 and P8

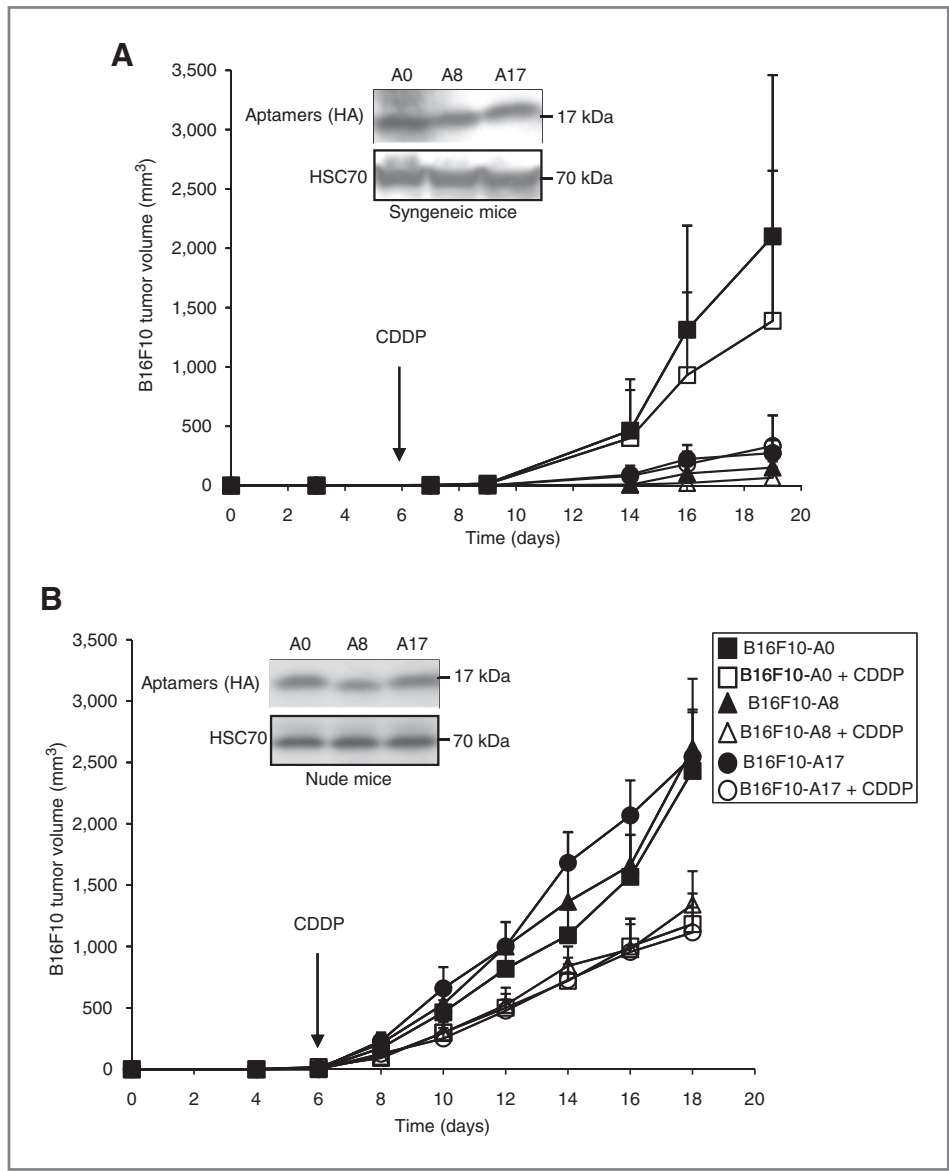


Figure 4. A8 and A17 aptamers decrease the size of mouse melanoma B16F10 tumors in syngeneic but not in nude animals. A, B16F10-A0-control (□, ■), B16F10-A8 (Δ, ▲), and B16F10-A17 transfected cells (●, ○) were injected s.c. on day 0 into C57/BL6 mice (2×10^5 cells/mouse; 9 mice per group). At the indicated time, cisplatin was administered (white symbols) as a single dose (10 mg/kg, i.p.). The tumor size was measured at the indicated time-points and the mean ($X \pm$ SD) tumor volumes were graphed. B, B16F10-A0 (□, ■), B16F10-A8 (Δ, ▲), and B16F10-A17 (●, ○) cells (2×10^5) were s.c. injected into nude mice. The size of the tumors in the animals that were left untreated (black symbols) or treated with cisplatin (white symbols) was measured every 2 days (9 animals/group).

were only detected in the lipoprotein-free/unbound fraction, P17 associated with plasma VLDL, LDL, and HDL (Supplementary Fig. 5C).

The chemical inhibitor of HSP70, PES, has been shown to induce autophagic cell death (19). We have, therefore, compared the cell death type induced by PES and P17 when combined with cisplatin treatment. We have found that although a clear vacuolization characteristic of autophagic cell death with the absence of caspase-3 activation could be observed in B16F10 cells sensitized to cisplatin by PES, no morphologic signs of autophagic cell death could be observed in the cells sensitized by P17 (Fig. 5B, right and left panels). In contrast, P17 induced the appearance of obvious signs of apoptosis (apoptotic bodies, chromatin condensation, and caspase-3 activity; Fig. 5B). We next studied whether P17 kept the ability of A17 to bind to the HSP70 ATP-binding domain. To do that, we linked the tridecapeptide to a biotin and carried

out coimmunoprecipitation experiments *in vitro* with purified P17 and HA-tagged HSP70 or HSP70ΔPBD proteins. We found that P17-biotin was able to associate with both HSP70 and HSP70ΔPBD and, interestingly, when ATP (100 μmol/L) was added in the immunoprecipitation buffer, P17 maintained its binding ability (Fig. 5C). This may suggest that either ATP does not physically interfere with the P17 association with the HSP70 ATP-binding domain or, alternatively, that P17 binds with higher affinity than ATP.

Antitumor and immunogenic effect of P17 in tumor-bearing mice

We next tested the peptides P8 and P17 in intratumor injections in animals already bearing a tumor of approximately 90 mm³. Mice carrying B16F10 subcutaneous melanoma were injected intratumor with the P8 and P17 peptides (50 μg/kg, diluted in PBS). Peptide injections were repeated

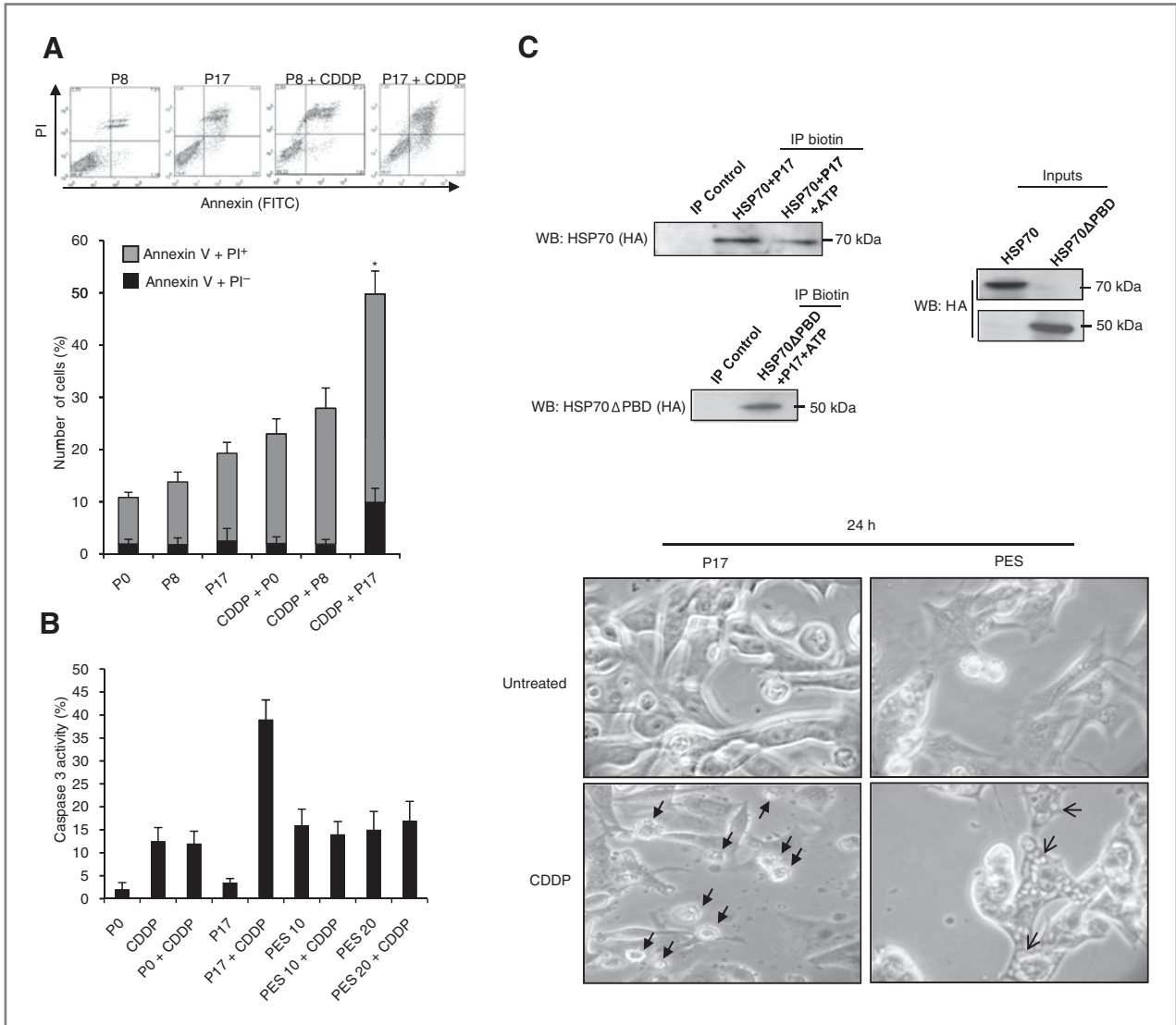


Figure 5. P17, from the variable region of A17, sensitizes B16F10 cells to apoptosis. **A**, B16F10 cells were treated with P0, P8, or P17 (100 ng/mL) and cisplatin (CDDP, 25 μmol/L). After 24 hours, cell death was determined by PI and Annexin V staining (flow cytometric analysis). **B**, right, B16F10 cells, either treated with P17 (100 ng/mL) or with PES (20 μmol/L), were subsequently treated with cisplatin (25 μmol/L, 24 hours) and subjected to microscopic analysis. Indicated with arrows are the vacuoles and the apoptotic bodies observed. Left, caspase-3 activity found by using the fluorochrome FITC-DEVD-FMK. *, $P < 0.05$. **C**, HA-tagged HSP70 or HSP70ΔPBD (100 ng, produced by a TNT-coupled transcription/translation system) was incubated with P17 (biotin-tagged, 1 μg) in the presence or absence of ATP (100 μmol/L). Immunoprecipitation of P17 (biotin) was followed by HSP70 immunoblotting. IP control, nonrelevant IgG antibody. Inputs indicate the amount of HSP70 and HSP70ΔPBD added in the immunoprecipitation mixture. IP, immunoprecipitation.

every day until the end of the experiment. Cisplatin (10 mg/kg; Fig. 6A) or 5-FU (50 mg/kg; Fig. 6B) was added i.p. as a single dose on the day after the first intratumor injection of the peptides. As shown in Figure 6A and B, local administration of P17, but not P8, induced a very significant regression of the tumors that was almost complete when the animals were also treated with cisplatin or 5-FU.

In a more therapeutic setting, we next administered the peptides systemically. Mice carrying B16F10 subcutaneous melanoma (tumor size of approximately 20–40 mm³) were injected i.p. (Fig. 7A) or i.v. (Supplementary Fig. 6) with P8 or

P17 peptides (3 mg/kg). Peptide injections were repeated every other day. Half the animals were also treated with cisplatin (10 mg/kg), given i.p. as a single dose. P17 (but not P8) was efficient in reducing the size of the tumors, particularly when the tumors were growing in immunocompetent animals (Fig. 7A and Supplementary Fig 6) and less so when they were growing in athymic *nu/nu* mice (Fig. 7B), underscoring the importance of the immune system for the therapeutic efficacy of P17.

Immunohistochemical analyses of tumor sections 12 days after the first i.p. injection of the peptides into tumor-bearing

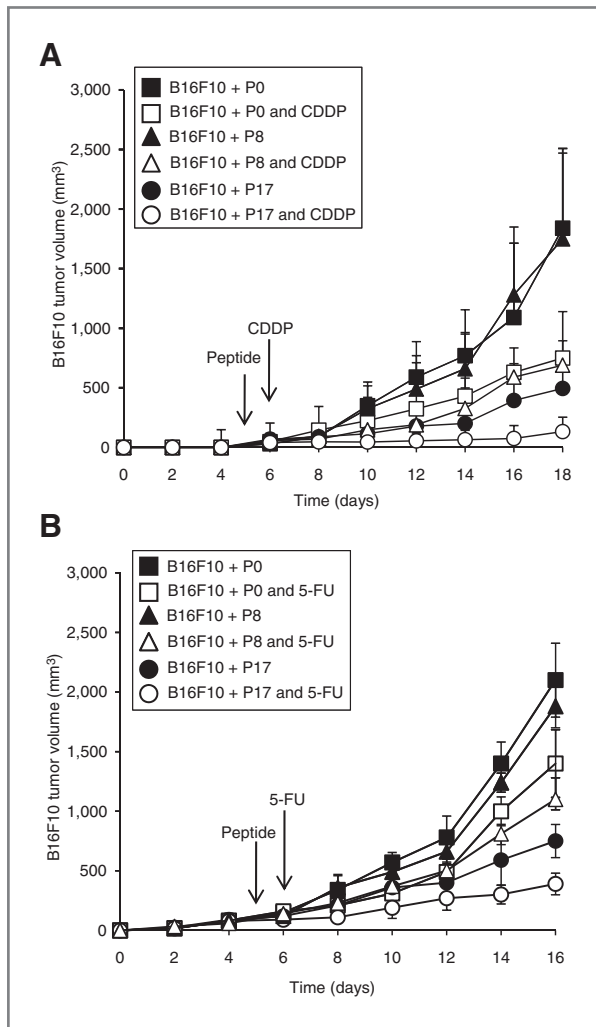


Figure 6. Intratumor injection of P17 induces a strong tumor regression. A and B, B16F10 cells (5×10^4 cells) were injected s.c. on day 0 into C57/BL6 mice. On day 5 (tumor size approximately 90 mm³), animals started to receive P0 (□, ■), P8 (△, ▲), or P17 (●, ○) via intratumoral injection (50 μg/kg, peptides were dissolved in PBS, and injections were repeated every day). On day 6, half the animals were treated with (A) cisplatin (CDDP, 10 mg/kg) or (B) 5-FU (50 mg/kg) with both i.p. administrated as a single dose. The tumor size was measured at the indicated time-points and the mean tumor volumes were graphed ($X \pm SD$, 6 animals/group). The white symbols represent the tumors from animals treated with CDDP (A) or 5-FU (B).

mice confirmed that tumors from animals treated with P17 exhibited a stronger infiltration by T cells, macrophages, and dendritic and NK cells than tumors treated with P0 or P8 (Fig. 7C and Table 2). Since, *in vitro*, P17 sensitized to apoptotic cell death (Fig. 5A and B), we studied its ability, after its i.p. administration, to induce apoptosis in the tumor sections. P17 treatment significantly induced apoptosis in the tumors, whereas P8 hardly had any effect (Fig. 7D). Therefore, the amount of apoptosis in the tumors correlated well with the increase in immune cells infiltrating the tumor (Fig. 7C) and the magnitude of the tumor regression (Fig. 7A). Interestingly,

although i.p. injection of P17 induced the tumor cells apoptosis, it has no significant toxicity in the mice intestinal progenitor cells, one of the most sensitive cells to different stresses (34; Supplementary Fig. 7).

In conclusion, P17 is an efficient antitumor agent. The fact that P17 but not P8 is active *in vitro* and *in vivo* may be related to its ability to bind plasma lipoproteins (Supplementary Fig 5 A–C). This association may protect the peptide from proteolysis. Indeed, and as compared with free peptides, plasma lipoproteins are known to reside much longer in the intravascular compartment with mean residence times reaching several days (35), and as a consequence, extending the half-life of lipoprotein-bound compounds *in vivo*. In addition, lipoprotein receptors might facilitate the cellular uptake of lipoprotein-bound peptides.

Concluding remarks

HSP-targeting drugs have recently emerged as potential anticancer agents, driven by the consideration that HSP may have oncogene-like functions and likewise may mediate a "nononcogene addiction" of stressed tumor cells that must adapt to a hostile microenvironment (36). Cancer cells must extensively rewire their metabolic and signal transduction pathways, thereby becoming dependent on proteins that are dispensable for the survival of normal cells. Unfortunately, the sole drugs that are thus far clinically available are inhibitors of HSP90, with most of them being geldanamycin derivatives such as 17AAG. We, and others, have validated HSP70 as a promising target for cancer therapy, using antisense molecules, a HSP70-binding construction derived from AIF (ADD70), and in this work, peptide aptamers that are specific for inducible HSP70. The cytotoxic effect of HSP70 sequestration is particularly strong in transformed cells yet is undetectable in normal, nontransformed cell lines or primary cells (8, 9). The specificity is explained by the constitutive expression of inducible HSP70 in most cancers, which is needed for the survival of tumor cells (37). This is confirmed in the present work since we have shown that inactivation of HSP70 by our peptide P17 induces apoptosis in tumor cells but does not affect the progenitors' intestinal cells' survival (Supplementary Fig. 7).

Unlike the recently reported PES (19), the aptamer that we isolated as the one to be most efficient in the inhibition of HSP70 chaperone activity, A17, binds to the HSP70 ATP-binding domain. HSP70 peptide aptamers did not have any toxicity on cultured cells *in vitro* yet strongly increased cellular sensitivity to toxic stimuli such as cisplatin. However, *in vivo*, the expression of the HSP70 peptide aptamers, or the injection of the derived peptide P17, was sufficient to induce tumor cell death. One possible explanation for this discrepancy might be that tumor cells growing *in vivo* are exposed to a more stressful microenvironment (i.e., lack of nutrients and/or oxygen) than cells cultured *in vitro*, explaining their increased dependence on (or "addiction" to) inducible HSP70.

The anticancer response induced by HSP70-targeting peptides, relied heavily on the contribution of the cellular immune system, as shown by the massive infiltration of macrophages, T lymphocytes, and dendritic and NK cells into the tumors

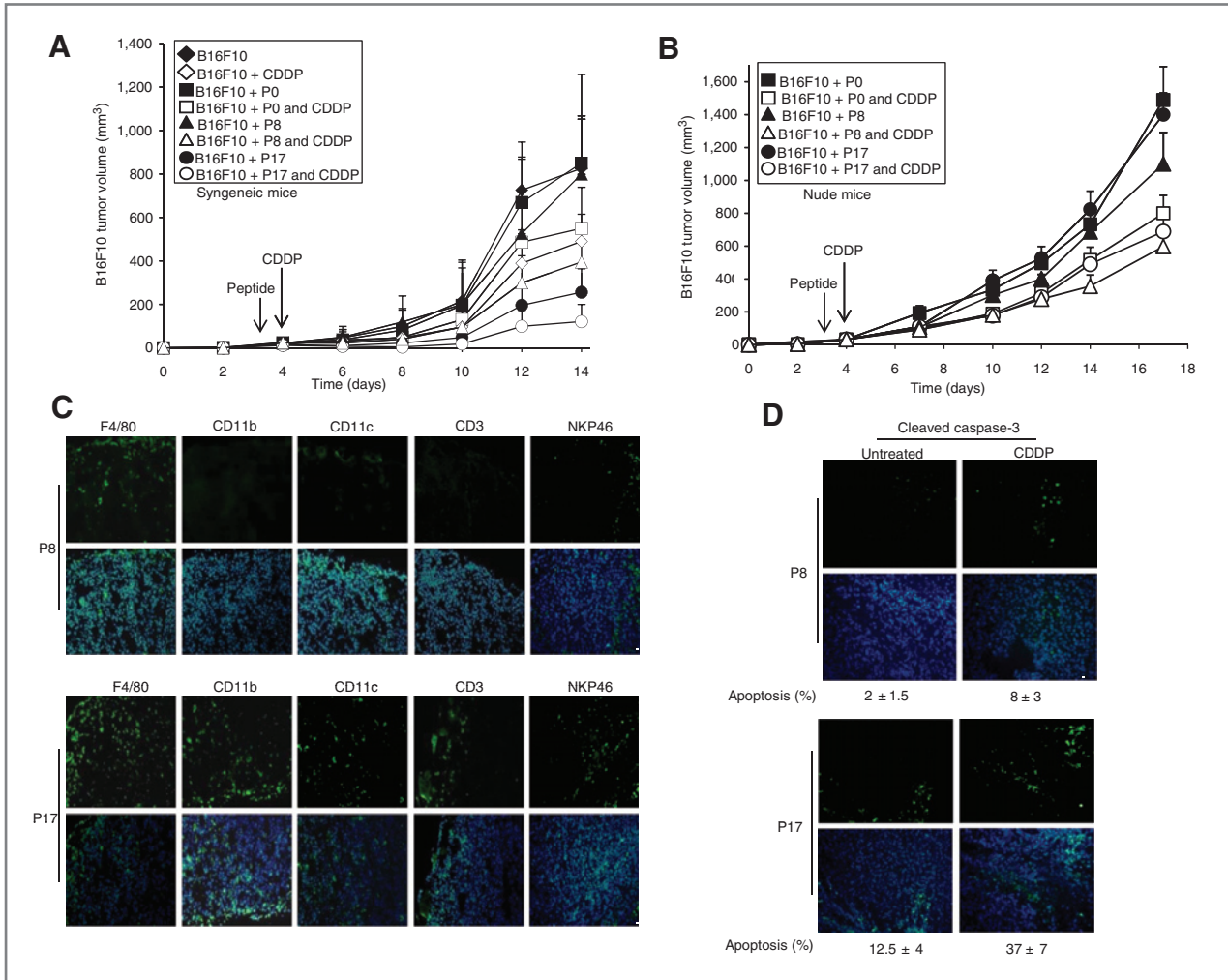


Figure 7. P17 induces tumor regression in mice and induces the development of an antitumor immune response. A and B, B16F10 cells were injected s.c. on day 0 into C57/BL6 mice (A) or nude mice (B). On day 3, animals started to receive P0 (□, ■), P8 (△, ▲), or P17 (●, ○) on intraperitoneal injection (3 mg/kg, dissolved in PBS). Peptide injections were repeated every other day. On day 4, half the animals were treated with cisplatin being i.p. administered as a single dose (10 mg/kg). The tumor size was measured at the indicated time-points, and the mean tumor volumes were graphed ($X \pm SD$, 6 animals/group). The white symbols represent the tumors from animals treated with cisplatin. C, tumor sections were performed 12 days after injection of P8 or P17 into syngeneic mice. T cells, macrophages, monocytes, and dendritic and NK cells were labeled using CD3, F4/80, CD11b, CD11c, and NKP46 antibodies, respectively. DAPI overlay images are shown. Six different tumors from mice treated with P8 or P17 were analyzed. A representative image is shown. D, apoptosis was determined by the use of an activated caspase-3 antibody in tumor sections described in C. DAPI overlay images are shown. (Scale bar, 10 $\mu\text{mol/L}$).

treated by HSP70 peptide aptamers. This is an interesting observation that relaunches the debate on the immunogenic role of inducible HSP70 (38). Cytosolic HSP70 purified from distinct tumors can elicit tumor-specific immunity by functioning as a vehicle for antigenic peptides (39). The immunogenic and antiapoptotic functions of HSP70 may have opposite effects since tumor cell death plays a central role in inducing a specific immune response (40). However, we have recently shown that HSP70 expressed in the surface of exosomes produced by cancer cells is responsible for the activation of the immunosuppressive functions of myeloid cells (31). Therefore, inactivation of this external HSP70 can

allow the induction of an immune antitumor response, such as the one we find in this work.

The pharmacologically most relevant finding of this work is the discovery that the 13-amino acid peptide (P17) from the variable region of A17 reproduces the HSP70-blocking chaperone activity and antitumor properties of A17 *in vitro* and *in vivo*. Because of their low molecular weight and high water solubility, small peptides are likely to be cleared within a few minutes from the bloodstream through renal filtration. Binding to lipoproteins can be a way of extending their half-life and to increase the cellular uptake (35). We have found that P17, but not P8, binds to plasma lipoproteins, correlating with its

Table 2. Immunohistochemical analyses of tumor-infiltrating inflammatory cells in mice treated with P17

	B16F10-P0	B16F10-P0 + CDDP	B16F10-P8	B16F10-P8 + CDDP	B16F10-P17	B16F10-P17 + CDDP
CD11c	0	0	4 ± 2	6 ± 3.5	17 ± 4	27 ± 4.8
F4/80	5 ± 3.5	3 ± 1.5	17 ± 3.9	19 ± 5	29 ± 4.8	47 ± 3.1
CD11b	0	0	0	0	37 ± 3.3	44 ± 5.4
CD3	0	0	0	0	23 ± 6	28 ± 3.9
NKp46	0	0	3 ± 2	6 ± 1.5	15 ± 3	27 ± 5

NOTE: Quantitative evaluation of antigen expression in tumor sections 12 days after the first i.p. injection of P0, P8, or P17 into syngeneic mice. T cells, macrophages, monocytes, and dendritic cells were labeled using CD3, F4/80, CD11b, CD11c, and NKp46 antibodies, respectively. Labeled cells were counted from 300 cells chosen randomly in different microscopic fields (6 mice per group).

stability and antitumor efficacy. Therefore, P17, which can be easily synthesized and administered systemically, is a promising compound that may deserve further preclinical as well as clinical evaluation in phase I trials.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank E. Solary for helpful discussions and A. Fromentin for technical assistance.

Grant Support

This work was supported by the Ligue contre le cancer (Equipes labellisées), Cancéropôle Ile-de-France, Institut National du Cancer, European Commission's Seventh Framework Programme (SPEDOC 248835) (C. Garrido and G. Kroemer), Fondation pour la Recherche Médicale (G. Kroemer), and Conseil Régional de Bourgogne (C. Garrido). A.L. Rérole has a fellowship from the Ligue contre le Cancer. C. Garrido and G. Kroemer groups have the label de «La Ligue Contre le Cancer».

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received April 27, 2010; revised August 31, 2010; accepted September 14, 2010; published OnlineFirst January 11, 2011.

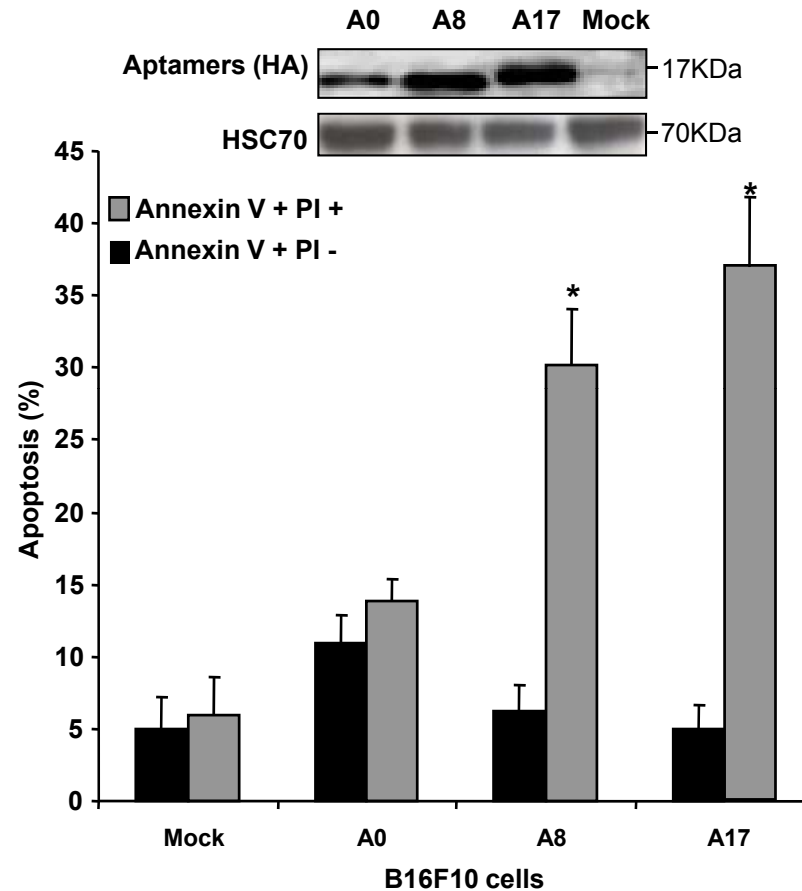
References

- 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.
- Murakami H, Pain D, Blobel G. 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J Cell Biol* 1988;107:2051–57.
- 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.
- Seo JS, Park YM, Kim JI, Shim EH, Kim CW, Jang JJ, et al. T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:582–7.
- Volloch VZ, Sherman MY. Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene* 1999;18:3648–51.
- Jaattela M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer* 1995;60:689–93.
- Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 1998;79:468–75.
- 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 U S A* 2000;97:7871–6.
- Gurbuxani S, Bruey JM, Fromentin A, Larmonier N, Parcellier A, Jaattela M, et al. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene* 2001;20:7478–85.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000;2:469–75.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:839–43.
- Chiosis G. Discovery and development of purine-scaffold Hsp90 inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2006;6:1183–91.
- Chiosis G, Timaui MN, Lucas B, Munster PN, Zheng FF, Sepp-Lorenzino L, et al. 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.
- Neckers L, Neckers K. Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Expert Opin Emerg Drugs* 2002;7:277–88.
- Usmani SZ, Bona R, Li Z. 17 AAG for HSP90 inhibition in cancer—from bench to bedside. *Curr Mol Med* 2009;9:654–64.
- Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 2003;22:6669–78.
- Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, Cande C, Hammann A, Morales MC, et al. Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res* 2003;63:8233–40.
- Steele AJ, Prentice AG, Hoffbrand AV, Yogashangary BC, Hart SM, Lowdell MW, et al. 2-Phenylacetylenesulfonamide (PAS) induces p53-independent apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* 2009;114:1217–25.
- Leu JI, Pimkina J, Frank A, Murphy ME, George DL. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell* 2009;36:15–27.

20. Brunet Simioni M, De Thonel A, Hammann A, Joly AL, Bossis G, Fourmaux E, et al. Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene* 2009;28:3332–44.
21. Schmitt E, Maingret L, Puig PE, Rerole AL, Ghiringhelli F, Hammann A, et al. Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer Res* 2006;66:4191–7.
22. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005;202:919–29.
23. de Thonel A, Vandekerckhove J, Lanneau D, Selvakumar S, Courtois F, Hazoume A, et al. HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood* 2010;116:85–96.
24. Bickle MB, Dusserre E, Moncorge O, Bottin H, Colas P. Selection and characterization of large collections of peptide aptamers through optimized yeast two-hybrid procedures. *Nat Protoc* 2006;1:1066–91.
25. Abed N, Bickle M, Mari B, Schapira M, Sanjuan-Espana R, Robbe Sermesant K, et al. A comparative analysis of perturbations caused by a gene knock-out, a dominant negative allele, and a set of peptide aptamers. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:2110–21.
26. Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, Brand K, Rohde M, Leist M, et al. Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res* 2002;62:7139–42.
27. Kim YS, Alarcon SV, Lee S, Lee MJ, Giaccone G, Neckers L, et al. Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial. *Curr Top Med Chem* 2009;9:1479–92.
28. McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:7523–8.
29. Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, et al. *HSP1* is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *Embo J* 1999;18:5943–52.
30. Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 2001;15:1118–31.
31. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 2010;120:457–71.
32. Lins L, Piron S, Conrath K, Vanloo B, Brasseur R, Rosseneu M, et al. Enzymatic hydrolysis of reconstituted dimyristoylphosphatidylcholine-apo A-I complexes. *Biochim Biophys Acta* 1993;1151:137–42.
33. Hanson CL, Ilag LL, Malo J, Hatters DM, Howlett GJ, Robinson CV. Phospholipid complexation and association with apolipoprotein C-II: insights from mass spectrometry. *Biophys J* 2003;85:3802–12.
34. Bach SP, Williamson SE, O'Dwyer ST, Potten CS, Watson AJ. Regional localisation of p53-independent apoptosis determines toxicity to 5-fluorouracil and pyrrolidinedithiocarbamate in the murine gut. *Br J Cancer* 2006;95:35–41.
35. Welty FK, Lichtenstein AH, Barrett PH, Dolnikowski GG, Schaefer EJ. Interrelationships between human apolipoprotein A-I and apolipoproteins B-48 and B-100 kinetics using stable isotopes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1703–07.
36. 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.
37. Hantschel M, Pfister K, Jordan A, Scholz R, Andreesen R, Schmitz G, et al. Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress Chap* 2000;5:438–42.
38. 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.
39. Multhoff G. Heat shock proteins in immunity. *Handb Exp Pharmacol* 2006:279–304.
40. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13:54–61.

Supplementary Figure 1

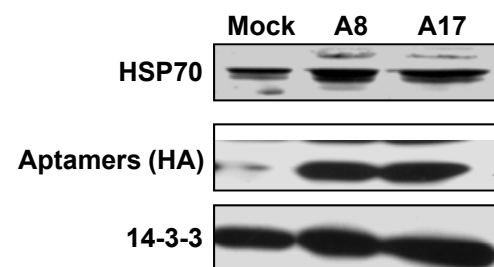
Aptamers A8 and A17 sensitize to apoptotic cell death



B16F10 cells either mock transfected or transfected with the indicated peptide aptamers (HA-tagged) were not treated or treated with cisplatin (25 μM, 24h). Apoptosis was measured by counting cells with condensed and fragmented nuclear chromatin after cell staining with Hoechst 33342 dye ($X \pm SD$, $n=4$). Upper blots, western blot showing the expression of the aptamers in the different transfected cells.

Supplementary Figure 2

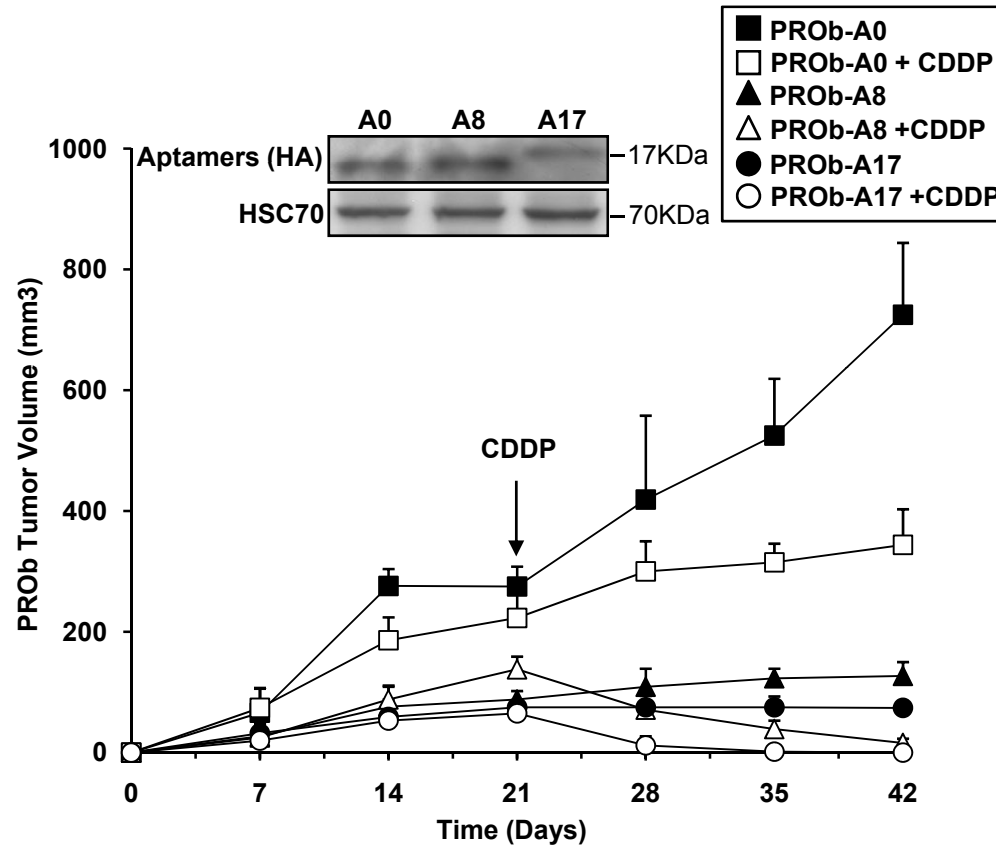
HSP70 peptide aptamers expression do not affect endogenous HSP70 levels



Western blot showing the expression of endogenous HSP70 in B16F10 cells either mock transfected or stably transfected with A8 or A17. 14-3-3 is used as a loading control.

Supplementary Figure 3

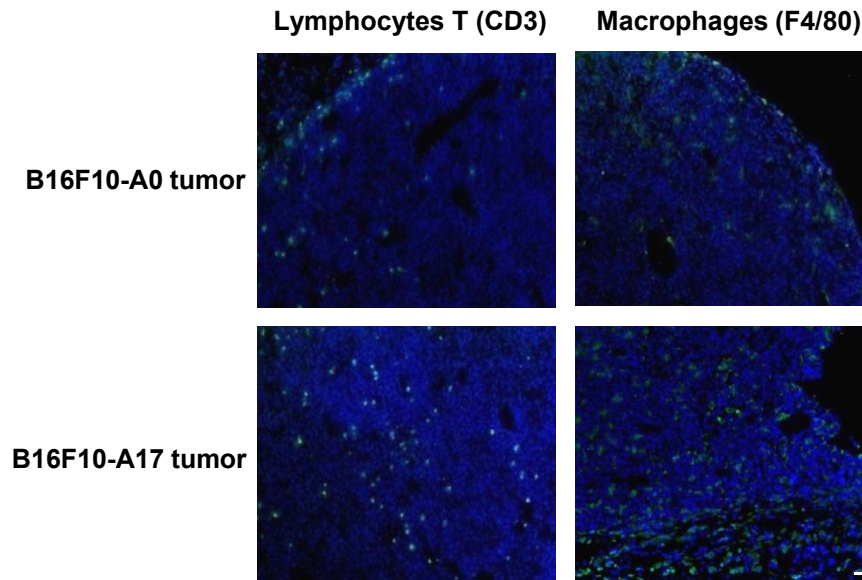
A8 and A17 peptide aptamers decrease the size of rat colon cancer PROb tumors.



PROb-A0-control (squares), PROb-A8 (triangles) and PROb-A17 transfected cells (circles) were injected s.c. on day 0 into BDIX rats (1×10^6 cells/rat, 9 rats per group). At the indicated time, cisplatin was administered (white symbols) as a single dose (10 mg/Kg, i.p.). The tumor size was measured at the indicated time points and the mean ($X \pm SD$) tumor volumes were graphed.

Supplementary Figure 4

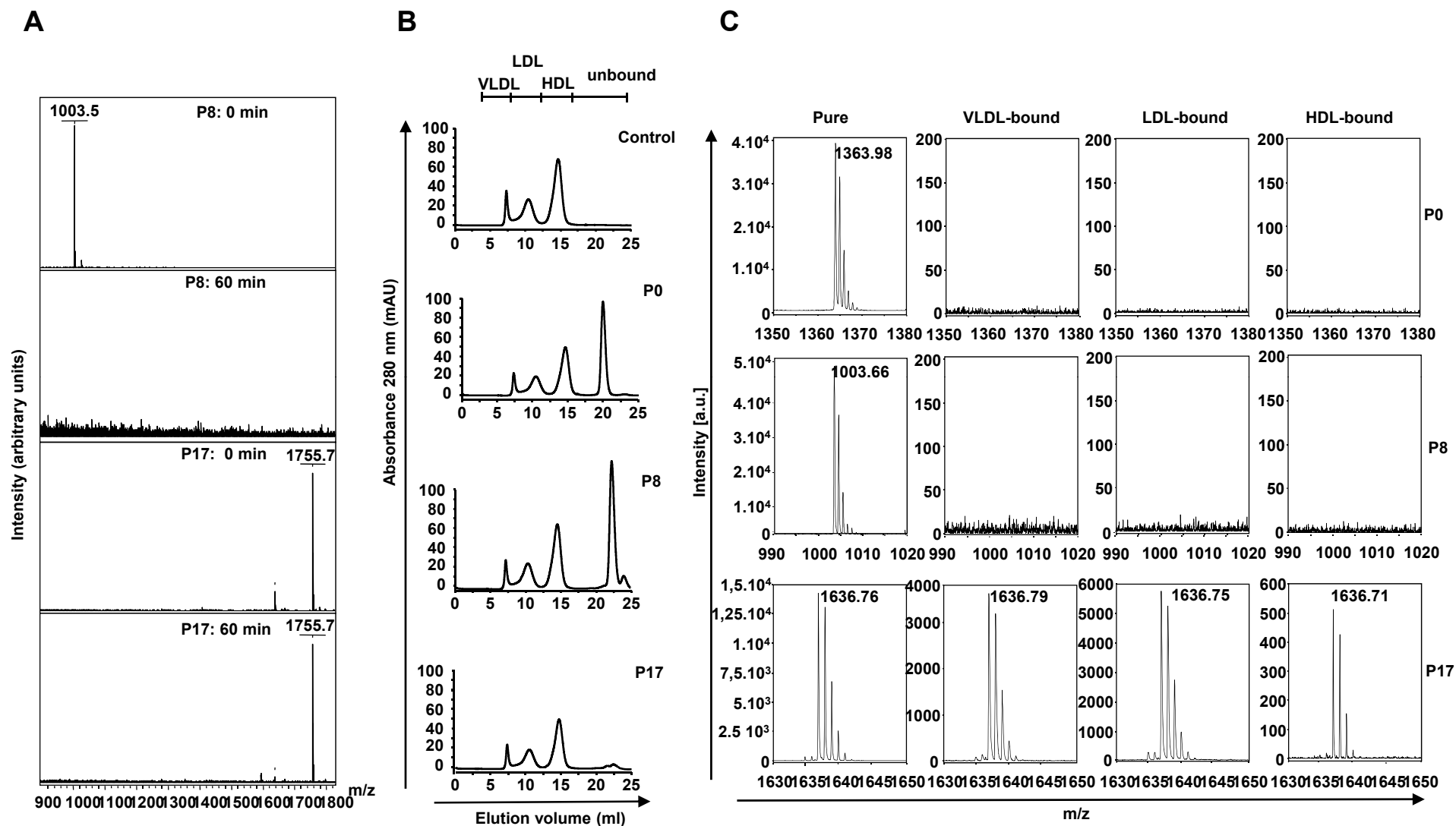
A17 induces the development of an anti-tumor immune response



Tumor sections were performed 12 days after s.c. injection of B16F10-A0 or B16F10-A17 into syngeneic mice. T-cells and macrophages were labeled using CD3 and F4/80 antibodies, respectively. Six different tumors were analyzed. A representative image is shown. (- Scale bar 10 μ M).

Supplementary Figure 5

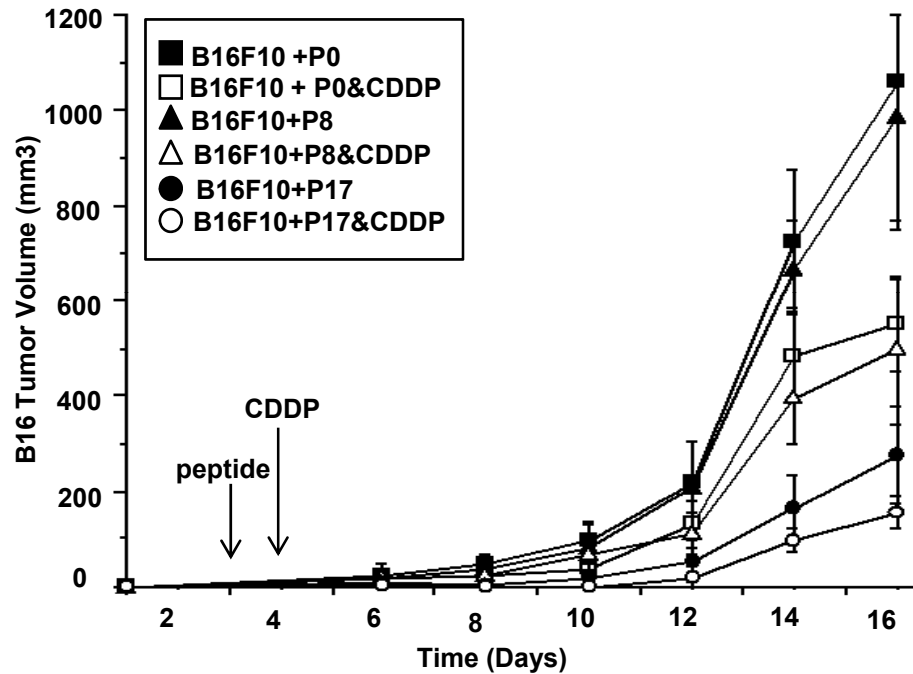
P17 is stable and binds to lipoproteins



(Hela cells were exposed to P0, P8 or P17 (100 ng/ml). A) The presence of P0, P8 or P17 in the medium after 1 h of their addition was analyzed by mass spectrometry. B) Plasma lipoproteins were passed through a Superose 6-HR column on an FPLC system, and fractions containing VLDL, LDL, HDL or free proteins (unbound) were recovered. Control, not aptamer added. C) Lipoprotein-bound proteins were spotted on target plates and analyzed by MALDI-TOF. Each spectrum is the sum of 100 to 250 shots acquired in the 25-kV positive reflectron mode. Presence of P0, P8 and P17 in lipoprotein fractions was screened between 950 to 1050 Da, 1350 Da to 1380 Da and 1630 Da to 1650 Da m/z values, respectively. In each panel, major peak corresponds to the monoisotopic $[M+H]^+$ ion of the isotopic cluster.

Supplementary Figure 6

Intra-venous injection of P17 induces tumor regression in mice

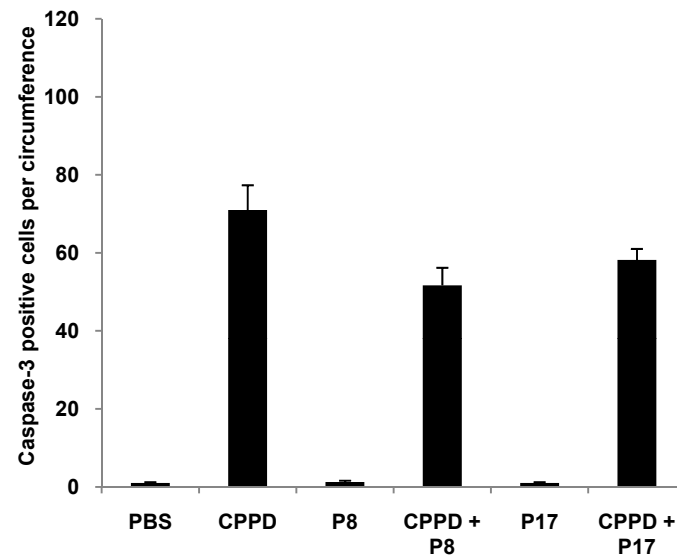


B16F10 cells were injected s.c. on day 0 into C57/BL6 mice. At day 3, animals started to receive the peptides (dissolved in PBS) P0 (squares), P8 (triangles) or P17 (circles) on intra-venous injection (3 mg/Kg every two days). At day 4, half the animals were treated with cisplatin administered as a single dose (10 mg/Kg, i.p.). The tumor size was measured at the indicated times points and the mean tumor volumes were graphed ($X \pm SD$, 6 animals/group). The white symbols represent the tumors from animals treated with cisplatin.

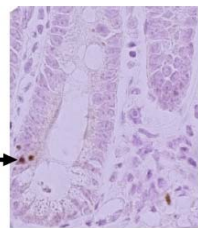
Supplementary Figure 7

Absence of the significant increase in apoptosis in intestinal progenitor cells

A



B



A) P8, P17 or PBS was i.p. administered in mice (5 mg/Kg. 6 animals per group) in the morning and, in half of the animals, CDDP was i.p injected (10 mg/Kg) in the evening of the same day. Active caspase-3 positive cells per circumference was quantified in small intestine 24 h latter. The differences observed are not significant ($p>0.05$). B) Illustrative image of active caspase-3 positive cells in progenitor compartment.

Supplementary Table 1

	B16F10-A0	B16F10-A0 +CDDP	B16F10-A8	B16F10-A8 +CDDP	B16F10-A17	B16F10-A17 +CDDP
CD11c	0	0	0	0	17 ±4.7	27 ±7.7
F4/80	12 ±0.8	15 ±2.8	17 ±3.1	25 ±5	55 ±5.9	63 ±4.6
CD11b	3 ±1	9 ±2.3	12 ±1.9	19 ±3	53 ±5.2	59 ±3.2
CD3	5 ±2	9 ±1.9	15 ±2	17 ±1.4	33 ±3.1	43 ±4.9

Immunohistochemical analyses of tumor-infiltrating inflammatory cells. Quantitative evaluation of antigen expression in tumor sections was performed 12 days after s.c. injection of B16F10-A0, B16F10-A8 or B16F10-A17 cells into syngeneic mice. T-cells, macrophages, monocytes and dendritic cells were labeled using CD3, F4/80, CD11b and CD11c antibodies, respectively. Labeled cells were counted from 300 cells chosen randomly in different microscopic fields (6 mice per group).

Conclusion

Dans ce travail, nous avons démontré que seulement deux aptamères peptidiques (A8 et A17) sur les 17 sélectionnés, sont capables de sensibiliser les cellules cancéreuses à la mort par apoptose induite par le cisplatine ou le 5-FU. Ces deux aptamères ciblent des parties différentes de HSP70. Nous avons démontré par immunoprecipitation que A8 lie le domaine de liaison au peptide (PBD) tandis que A17 lie préférentiellement le domaine de liaison à l'ATP (ABD). C'est un atout, car en général les inhibiteurs des HSPs neutralisent la protéine en liant leur ABD.

De plus, nous avons optimisé ces aptamères en réduisant leurs tailles afin de se rapprocher d'un candidat-médicament administrable en thérapie anticancéreuse. Pour ce faire, nous n'avons retenu que les régions variables des aptamères peptidiques correspondant aux séquences variables de 8 ou 13 acides aminés qui se lient spécifiquement à HSP70. Nous avons pu démontrer que seulement P17 (dérivé de A17) conserve, non seulement sa capacité à lier HSP70, mais aussi son efficacité tant en culture cellulaire que *in vivo* de manière comparable à celle des aptamères peptidiques. De manière intéressante, l'effet de P17 est uniquement visible chez les animaux immunocompétents, où il est associé à une augmentation significative de l'infiltration tumorale des cellules lymphocytaires T CD8+ (cellules T cytotoxique), des macrophages, des cellules Natural Killer, des cellules dendritiques. Ceci laisse donc supposer une implication clé du système immunitaire dans la régression tumorale favorisée par l'inhibition de HSP70.

Dans ce premier travail, nous avons mis en évidence trois inhibiteurs spécifiques de HSP70 : A8, A17 et P17 et prouvé leur effets anticancéreux *in vitro* et *in vivo*. De plus ces inhibiteurs potentialisent l'effet des molécules anticancéreuses comme le cisplatine. Ceci suggère la possibilité d'utiliser les inhibiteurs de HSP70 en complément de la thérapie anticancéreuse.

ARTICLE 2 :

Restoring anticancer immune response by targeting tumor-derived exosomes with a HSP70 peptide inhibitor.

Depuis de nombreuses années les chercheurs sont convaincus que pour qu'une chimiothérapie soit efficace, il doit avoir une réponse immunitaire antitumorale efficace. Récemment, il a été identifié des cellules immunitaires capables d'inhiber l'immunité antitumorale. Ces cellules sont nommées cellules myéloïdes suppressives (MDSCs), elles sont capables d'instaurer un environnement immunosuppresseur au sein de l'organisme (Lindau et al., 2013). Les mécanismes d'immunosuppression des MDSCs sont encore mal connus. Cependant, il est à été clairement démontré que les MDSCs suppriment l'activité des lymphocytes T, des cellules dendritiques, des cellules tueuses naturelles. Une étude récente a démontré que les exosomes dérivés des tumeurs sont responsables de l'activation des MDSCs (Chalmin et al., 2010).

Les exosomes, nouveau sujet d'étude en cancérologie, sont sécrétés par toutes les cellules dont les cellules cancéreuses. Les exosomes sont des vésicules de taille nanométrique, considérés comme essentiels pour la communication intercellulaire. Les exosomes ont été décrits comme jouant un rôle très important dans le développement tumoral en favorisant la formation de niche métastatique (Somasundaram & Herlyn, 2012). L'interaction entre les exosomes et les MDSCs a été caractérisée et montre que la protéine de stress HSP70 est essentielle. En effet, l'activation des MDSCs résulte de l'interaction entre HSP70 sur les exosomes et le TLR2 sur les MDSCs, entraînant la stimulation de la voie NF- κ B puis l'activation de la voie STAT3/JAK. Les MDSCs activées vont ensuite inhiber la réponse antitumorale (Chalmin et al., 2010). Nous avons auparavant développé des inhibiteurs spécifiques de HSP70 et démontré leurs effets anticancéreux en neutralisant la forme intracellulaire de HSP70. Nous souhaitons maintenant étudier l'efficacité de ces inhibiteurs sur sa forme extracellulaire, en vue de favoriser la réponse immunitaire antitumorale.

Remarques : Dans cet article, nous utilisons le dérivé peptidique de l'aptamère peptidique A8 appelé P8.1. Cependant, ce produit a été hautement purifié évitant des contaminations par des protéases qui pourraient jouer sur sa stabilité. L'ensemble des expériences *in cellulo* et *in vivo* ont été réalisés avec P8.1. Dans les expériences d'interaction protéine-protéine (Octet) nous utilisons A8 car cela nécessite la fixation de la molécule à un support. La partie constante de l'aptamère est relativement grande et n'est pas impliquée dans l'interaction avec HSP70. Cette stratégie, nous permettra de lier facilement l'aptamère sans perturber l'interaction de l'inhibiteur avec HSP70.

Restoring anticancer immune response by targeting tumor-derived exosomes with a HSP70 peptide inhibitor.

Jessica Gobbo^{1,2}, Guillaume Marcion^{1,2}, Arlette Hamman, Hajare Mjahed^{1,2}, Nicolas Isambert³, Pierre Fumoleau³, François Ghiringhelli^{1,3}, Aurelie de Thonel^{1,2}, Renaud Seigneuric^{1,2,*} and Carmen Garrido^{1,2,3,*},[£].

¹INSERM UMR 866, Faculty of Medicine and Pharmacy IFR 100, Dijon, France.

²University of Burgundy. ³Centre Georges François Leclerc, Dijon, France. ⁴Equipe Labélisée par la Ligue Nationale contre le Cancer

*These authors contributed equally to this work.

[£] Corresponding author:

Carmen Garrido

INSERM UMR866

Faculty of Medicine & Pharmacy

7, boulevard Jeanne d'Arc

21079 Dijon, France

Phone: +33 3 80 39 32 56

Fax: +33 3 80 39 34 34

Email: cgarrido@u-bourgogne.fr

Abstract

We previously showed that: (1) HSP70 is expressed at the membrane of exosomes and via its interaction with toll like receptor 2 (TLR2); (2) HSP70 is able to activate myeloid derived suppressive cells (MDSC). Here, we show that (1) exosomes released from all examined cancer cells express HSP70 at their membrane while exosomes released from normal cells do not; (2) a peptide (P8.1), selected for its higher affinity for HSP70 compared to the one of TLR2 for HSP70, is able to bind to membrane-bound HSP70 and to block its association with TLR2; 3) this HSP70 peptide blocks the ability of tumor-

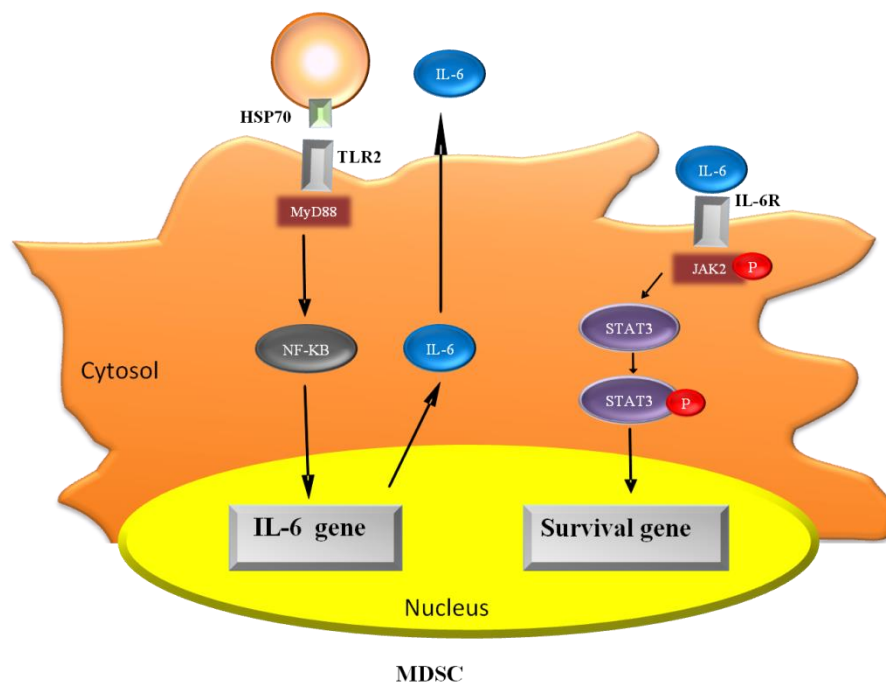
derived exosomes to activate MDSC; 4) *In vivo*, treatment of tumor-bearing mice with P8.1 induces a decrease in the number of MDSC in the spleen and inhibits tumor progression 5) a chemotherapeutic agent like cisplatin increases the amount of HSP70 in tumor-derived exosomes, favoring the activation of MDSC and blocking the effective immune response. All together, we set the proof of principle that a targeted inhibitor of HSP70 such as a peptide may be used in association with classical chemotherapy to restore the development of an anti-cancer immune response.

INTRODUCTION

Diagnostic and surgical resection together with conventional anticancer drugs have highly improved survival in patients with cancer¹⁻³. Unfortunately, morbidity and mortality cancer rates remain high^{3,4}. Currently, a growing body of evidences suggest that the success of an anticancer therapy depends mainly on the anti-cancer immune response efficiency^{5,6}. Recent studies have identified myeloid cells as potent suppressors of tumor immunity and, therefore represent a major limitation for cancer immunotherapy⁷. These cells, named myeloid-derived suppressor cells (MDSC), accumulate in the blood, spleen, lymph nodes, bone marrow and at tumor sites in most patients and in experimental models. MDSC plays a major role in inhibition both adaptive and innate immunity⁸. MDSC are considered as essential actors in the deep immune dysfunction observed in most patients with sizable tumor burdens⁹. Accordingly, the presence of MDSC in cancer patients is correlated with poor survival and tumor progression^{10,11}. How MDSC affect the immune system is still unclear but likely act *via* the suppression of lymphocytes and NK cells activity. MDSC are activated by host- and tumor-secreted factors and, Chalmin *et al.* have recently demonstrated that tumor-derived exosomes (TDE) can also activate MDSC¹².

Exosomes are small nanovesicles (~50-200 nm in diameter) released into the extracellular environment from cells *via* the endosomal vesicle pathway by fusion with the plasma membrane^{13,14}. A broad range of cells secrete exosomes including T/B cells^{15,16}, epithelial¹⁷ and dendritic cells¹⁸ as well as tumor cells. These exosomes are essential for intercellular communication¹⁹. TDE have been described to play a

major role in the formation of primary tumors and metastases²⁰ and to modulate anti-tumor immune responses²¹. Most importantly, MDSC activation depends on the expression of the heat shock protein 70 (HSP70) present at the surface of these TDE^{12,22}. Indeed, MDSC activation results from the interaction between Toll-like receptor 2 (TLR2), present on their surface, and HSP70, expressed by exosomes. This interaction leads to the stimulation of NF- κ B (Nuclear Factor-kappa-B) signaling pathway and then, activation of the signaling pathway STAT3/JAK2 (Janus Kinase) through IL-6 autocrine secretion (Scheme 1). HSP70 is a stress-inducible heat shock protein with intra- and extracellular functions. (1) Intracellular roles of HSP70 include the chaperone function through the stabilization of protein 3D-structures, prevention of protein aggregation by binding to unfolded proteins and, anti-apoptotic functions^{23,24}. HSP70 is overexpressed in many cancer cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs promoting cancer development. Accordingly, the down-regulation of HSP70 is sufficient to kill or sensitize tumor cells to apoptosis induction *in vitro* and can impair tumorigenicity *in vivo*^{25,26}.



Scheme 1: Activation of MDSC

(2) HSP70 has also been found at the plasma membrane of cancer cells BUT not normal cells where it favors the resistance of cancer cells to immune-mediated

destruction^{27,28}. Indeed, in contrast to cancer cells, normal cells express only few HSP70. Since only about 10 % of the total amount of intracellular HSP70 is expressed at the membrane of cancer cells²⁹. Membrane-bound HSP70 presents an extracellular sequence composed of 14 amino acids in the C-terminus region (TKDNNLLGRFELSG or TKD sequence), against which a monoclonal antibody has been recently raised (cmHSP70)³⁰. Injection of this antibody cmHSP70 into mice bearing CT26 tumors, significantly inhibited tumor growth and enhanced the overall survival. These effects were associated with infiltrations of natural killer (NK) cells, macrophages, and granulocytes³¹.

We previously screened for selected peptide aptamers (either 8 or 13 amino acids inserted into *E. coli* thioredoxin scaffold), that were able to bind different regions of HSP70³². A unique feature of these peptide aptamers lies in their doubly constrained target-binding loop^{33,34}, compared to other man-made bio-molecules that consist of peptide sequences fused terminally to a carrier protein. We previously demonstrated that one of the selected peptide aptamer 8 (A8), which binds to the C-terminus region of HSP70, inhibits the chaperone activity of HSP70 and displays strong anti-cancer properties in syngeneic animal's models but not in nude mice³².

In the present study, we have first detected HSP70 at the surface of exosomes isolated from rodent to human cancer cell lines. In parallel, we isolated the minimal amino acid sequence of the aptamer variable region, A8, able to bind the TKD region of HSP70 that we called P8.1. Then, we characterized P8.1 as a specific inhibitor of membrane-bound extracellular HSP70 and demonstrated that this peptide, by directly targeting HSP70 at the exosomes surface from the different cancer cell lines, blocks MDSC activation, thereby restoring an efficient anti-tumoral immune response *in vivo*.

RESULTS AND DISCUSSION

Tumor derived exosomes (TDE) from cancer cells lines express HSP70 in the membrane

Chalmin *et al* previously showed that only exosomes from CT26 mouse colon cancer cell line expressed HSP70 on their membrane which was responsible for

MDSC activation¹². Here, we wanted whether the expression of this membrane-bound form of HSP70 could be generalized from human to rodent cancer cell lines.

To detect the presence of HSP70 at the surface of exosomes, we first used a standard transmission electronic microscope (TEM). We evaluated the release of exosomes in culture media from 4 different cancer cell lines (HCT116 and SW480 human colon cancer, CT26 mouse colon carcinoma and B16F10 mouse malignant melanoma) and in two non-cancerous cell lines (MEF: mouse embryonic fibroblast and PrCE : human prostate cells). As shown in Figure 1A, we were able to detect secreted exosomes in culture media of cancerous (B16F10, CT26, HCT116 and SW480) and non-cancerous cell lines (MEF). However, extracellular HSP70 was detectable only at the surface of exosomes derived from cancer cell lines (Figure 1A and not shown). This result was further confirmed by two other techniques i.e biolayer interferometry (BLI, Octet Red instrument, Forté Bio) (Figure 1B) and flow cytometry (FACS) (Figure 1C). To avoid any artifact related to the presence of others nanovesicles potentially co-purified with exosomes, we measured the expression of specific markers of exosomes in all samples such as Flotillin-1, CD81 (Figure 1D). Paralleling the analysis of membrane-bound HSP70 in the exosomes, we checked the expression of membranar HSP70 in the B16F10 and HCT116 by immunofluorescence and FACS analysis (Supplementary Figure 1A and 1B). We observed that membrane-bound HSP70 was only detected in cancer cell lines compared to normal cells. Since only about 10% of the total amount of HSP70 is generally expressed at the cell surface, this could explain why only cancer cells and tumor-derived exosomes (TDE) present HSP70 at their membrane³¹.

Altogether, we validated in some human and rodent cancer cell lines the release of exosomes expressing HSP70 at their surface.

A8 peptide associates with membrane-bound HSP70 in exosomes and blocks HSP70 ability to associate with TLR2.

The membrane-bound HSP70 is characterized by the presence of a specific extracellular C-terminus sequence called TKD sequence, which participates to the pro-tumorigenic effect of HSP70³¹. Peptide aptamers are selected by their ability to bind different regions of HSP70. These peptides aptamers have the particularity of being very stable, soluble, easy to produce and much smaller than an antibody.

Since the aptamer A8 was the only one able to bind the C terminus domain of HSP70³², we wondered whether it could interact more specifically with the TKD region. Thus, we co-incubed exosomes with a specific antibody recognizing the TKD sequence as a blocking antibody (cmHSP70), and then, we compared binding the extracellular membrane-bound HSP70 at TDE alone or co-incubed with cmHSP70. We demonstrated by BLI that A8 could efficiently bind extracellular membrane-bound HSP70 (Figure 2B).

Activation of MDSC by exosomes is mediated *via* the binding of extracellular HSP70 from TDE to the TLR2 expressed on MDSC. In fact, A8 could block the interaction between TLR2 and HSP70 *in vitro*. To that end, TLR2 was incubated with HSP70 and the peptide aptamer A8 at different concentrations (from 0.3 μ M to 1.8 μ M). While HSP70 immunoprecipitates with TLR2 this interaction was inhibited in a dose dependent manner by the peptide aptamer A8 (Figure 2A). In parallel, the chaperone activity of HSP70 was measured by luciferase assay and we obtained, as expected, a similar pattern of inhibition induced by this peptide aptamer (Supplementary Figure 2).

To further evaluate the inhibitory effect of A8, we measured the constants of dissociation (K_D) by biolayer interferometry (BLI). We immobilized A8 or TLR2 on the surface of the biosensor and determined their K_D , with either the peptide aptamer or HSP70. The K_D of HSP70 for TLR2 or A8 was 2.92 μ M and 2.2 nM respectively (Figure 2C and 2D). These data indicate that HSP70 displays a lower affinity for TLR2 than for A8, which could explain why A8 prevents the interaction between HSP70 and TLR2.

P8.1, a derived peptide of A8, blocks the ability of tumor-derived exosomes to activate MDSC

We decided to isolate a derived peptide from peptide aptamer A8 that we called P8.1. We first checked whether the new purified peptide P8.1 was still able to associate with the C-terminus region of HSP70³². We were able to confirm this interaction by co-immunoprecipitation (Figure 3A). Next, we evaluated the ability of the peptide P8.1, to prevent the activation of MDSC, which is mediated by the interaction of their receptor TLR2 with TDE expressing HSP70. Activation of MDSC are observed by IL6 secretion and the STAT3 phosphorylation status, two well-known

markers³⁶ (Scheme 1). The activation of MDSC, which is TLR2/MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene (88))-dependent, involved the production and released by an autocrine pathway of IL-6³⁷. Once released, IL-6 triggers the activation of its receptor and the phosphorylation of STAT3:

We measured the effect of P8.1 on the IL-6 secretion by MSC2 (myeloid suppressive cells 2, MDSC established cell line). MSC2 were incubated in the presence or absence of TDE (from B16F10 cells) and/or P8.1. Supernatants were harvested and secreted IL-6 was quantified by ELISA.

We found that, as expected, exosomes derived from tumor cells stimulate the secretion of IL-6 induced by MSC2 cells. Notably, this IL-6 production was inhibited by P8.1 when added in presence of the TDE (Figure 3B). This result strongly suggests that P8.1 is able to block MDSC activation through the TLR2 signaling pathway.

Then, we checked the activation of the STAT3/JAK2 signaling pathway, by analyze the STAT3 phosphorylation status by western-blot in these MDSC cell line. MSC2 cells were incubated in the presence of TDE isolated from the supernatant of four different cancer cell lines (CT26, B16F10, HCT116 and SW480) with or without P8.1. We did not observe any phosphorylation of STAT3 in MSC2 alone, indicating that they are not activated at basal level. In the presence of TDEs, we observed a clear induction of STAT3 phosphorylation at 4h and 6h of incubation (Figure 3C and supplementary 3A). In contrast, for all cancer cell lines tested, we found that, incubation of the TDE with P8.1 peptide abrogates their ability to activate STAT3 in the MSC2 (Figure 3B). It is worth noting that the treatment of MSC2 by P8.1 alone has no effect on STAT3 activation and do not display any cytotoxic activity (Supplementary 3B).

To confirm that the inhibitory effect of P8.1 peptide on MSC2 activation is due to its direct interaction with extracellular C-terminus domain of HSP70 at the exosomes surface, we tested the effect of another peptide named P17. P17 is known to inhibit HSP70 activity *via* its association with the ATP binding domain of HSP70, located in the intracellular N-terminus region²⁶. As shown in Supplementary Figure 3C, the peptide P17, in contrast to P8.1, did not interfere with the ability of TDE to induce the activation of STAT3 in MCS2. These results confirm that P8.1 blocks

TDE-induced activation of MDSC *via* its association with the TKD, extracellular part of membrane HSP70.

We checked, also by flow cytometry, whether P8.1 could affect the survival of MSC2. During 24h, MSC2 were incubated alone or co-incubated with B16F10-TDE and/or P8.1. As shown Figure 3D, we did not detect any significant difference in the cell death of MDSC in the different conditions used.

Altogether, these results show that activation of MDSC by exosomes from human and rodent cancer cell lines can be inhibited by the binding of the peptide P8.1 to membrane-bound HSP70 which prevents the interaction of HSP70 from TDE with TLR2 from MSC2.

P8.1 prevents the activation of MDSC *in vivo* and improves cisplatin chemotherapeutic effect

P8.1 is able to inhibit MDSC activation *in vitro*, we tested if P8.1 could also block the immunosuppressive effect of MDSC *in vivo* cancer model. We performed subcutaneous injection at day 0 of B16F10 cells or media as a control in C57/BL6 mice. When tumor size reached about 0.9 mm³ (around day 5), mice were treated by i.p. with a control peptide or P8.1 every two days until the end of the experiment. After, 18 days, we analyzed the percentage of MDSC present in mice spleen by FACS using specific markers Gr1 and CD11b and measured the tumor growth every two days. We found 2.5 % of MDSC in control mice (Ctl group) in agreement with literature, whereas in mice bearing a tumor and treated with PBS (PBS group) we observed a six-fold increase in the percentage of MDSC. Importantly, this increase was strongly reduced in mice bearing tumors that were treated by P8.1 (Figure 4A). Accordingly, the size of the tumors significantly decreased in presence of P8.1 (Figure 4B).

Anticancer drugs could increased the release of exosomes ²². Here, we tested if cisplatin treatment increased the secretion of exosomes expressing membrane-bound HSP70. By FACS analysis, we observed that exosomes expressing HSP70 increased after treatment with cisplatin compared to non-treated cells (Figure 4C). Then, we checked the percentage of MDSC in spleen after chemotherapy. While tumor-bearing mice treated with cisplatin (10 mg/kg, i.p; Figure 4A) displayed 9% of

MDSC, the tumor-bearing mice treated with both P8.1 peptide and cisplatin, displayed only 2.7% of MDSC in the spleen like control mice. This decrease of MDSC percentage is correlated with a strong tumor regression (Figure 4B). Then, we checked that the low percentage of MDSC observed following the co-treatment with cisplatin and P8.1 is indeed associated with a decrease in MDSC activation. We analyzed the MDSC activation status in spleen-derived cells, by measuring phosphorylated STAT3 level. While treatment with peptide control increased the phosphorylation of STAT3, we did not detect any STAT3 phosphorylation in MDSC isolated from the spleen of animals treated with both cisplatin and P8.1 (Figure 4A), thus indicating their absence of their activation.

Altogether, our *in vitro* and *in vivo* results suggest that P8.1 peptide can directly block HSP70 : TLR2 interaction, thereby inhibiting the STAT3/JAK2 signaling pathway and the subsequent activation of MDSC. As a result, the immunosuppressive effect of MDSC is impaired and the anti-tumoral immune response might be restored.

CONCLUDING REMARKS

HSP70 expressed in the membrane of exosomes has been shown to be responsible for activating MDSC. MDSC have been subject of a particular scrutiny for playing a critical role in cancer. Here, we show that HSP70 is also expressed at the surface of exosomes derived from mouse and human cancer cells but not from their normal counterparts. Cancer cells accumulate mutations, violate physiology and acquire sets of hallmarks³⁸ and therefore required a constitutive high level of the chaperone HSP70 for their survival/maintenance. Since only 10% of the total amount of intracellular HSP70 is expressed at the membrane, this most likely explains why exosomes from normal cell are devoid of HSP70. Yet, how this anchorage take place is still unknown but it is demonstrated that the end of the C-terminus domain of HSP70 remains extracellular.

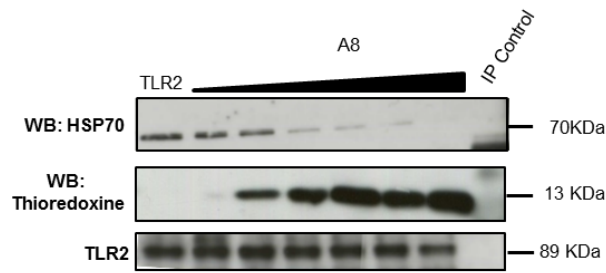
There is a growing body of evidences that an efficient chemotherapy must rely on an efficient anticancer immune response^{39,40}. MDSC as immunosuppressive cells play a key role in cancer progression and have been the subject of intense investigations. Previous works have shown that HSP70 expressed at the membrane of TDE are responsible for the activation of these MDSC. Moreover, we show that

chemotherapeutic treatment like cisplatin - known to increase the level of HSP70 at the plasma membrane of cancer cells – increased also HSP70 at the surface of TDE, which suggest that cisplatin might favor MDSC activation. In that way, cisplatin has been described as a non-immunogenic drug with a limited efficacy⁴¹. With the aim of blocking TDE-HSP70, we have selected a peptide P8.1 that binds to the TDK region of HSP70 and, thereby blocks the ability of this membrane-bound HSP70 to activate MDSC. This peptide inhibitor of HSP70 by interfering with the immune suppressive functions of TDE may thus improve the efficacy of anticancer drugs. Indeed, we demonstrated that cisplatin combined with the P8.1 peptide decreased tumor growth and favorite anticancer immune response providing the proof of principle that the peptide P8.1 may be useful for improving the efficacy of chemotherapy. The advantages of peptides over the blocking antibody cmHSP70, besides the tolerances issues antibodies can induce, are that peptides are not immunogenic, much smaller and easier to produce. And P8.1 seems non toxic *in vivo*.

Notably, P8.1 biodistribution experiments after systemic administration demonstrate that the peptide localizes mainly in the tumor area⁴², which is likely due to the fact that tumors abundantly express HSP70. Therefore a peptide like P8.1 could confer greater tumor specificity than for instance folic acid. Considering the general role of HSP70 in different cancers, the approach demonstrated here might be extended to any cancer types with their chemotherapy set-ups.

Finally, towards the selection of patients that would most benefit from this multipurpose targeted HSP70 inhibition, we demonstrate that HSP70 could be used as a biomarker for cancer. We demonstrate that we can capture exosomes from human cancer cell lines using membrane-bound HSP70 as bait. Now to proof of principle for the feasibility of the approach, we started a prospective study with the anticancer Centre Leclerc in breast cancer patients to determine whether the presence of exosomes presenting HSP70 in the membrane is predictive of patients outcome.

A



B

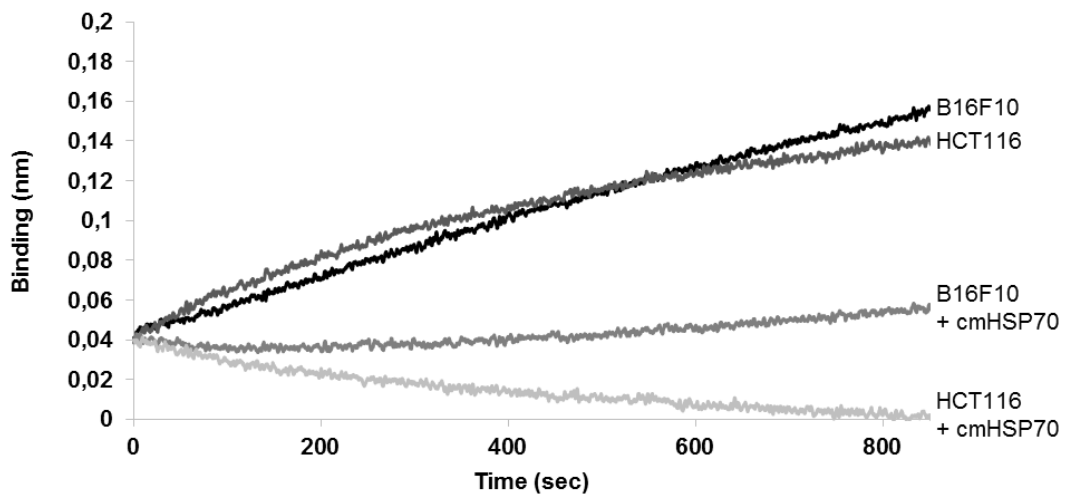


Figure 2. A8 interacts with the extracellular c-terminus domain of HSP70 and blocks HSP70 /TLR2 association. (A) Immunoprecipitation of TLR2 in the presence of increased concentrations of A8 (from 0.3 μ M to 1.8 μ M) was followed by HSP70 immunoblotting. IP control, no relevant IgG antibody. (B) The binding of exosomes (number 1.10^6), derived from the B16F10, HCT116 cell lines alone or co-incubed with blocking antibody (cmHSP70) to immobilized biotinylated A8, was determined by biolayer interferometry

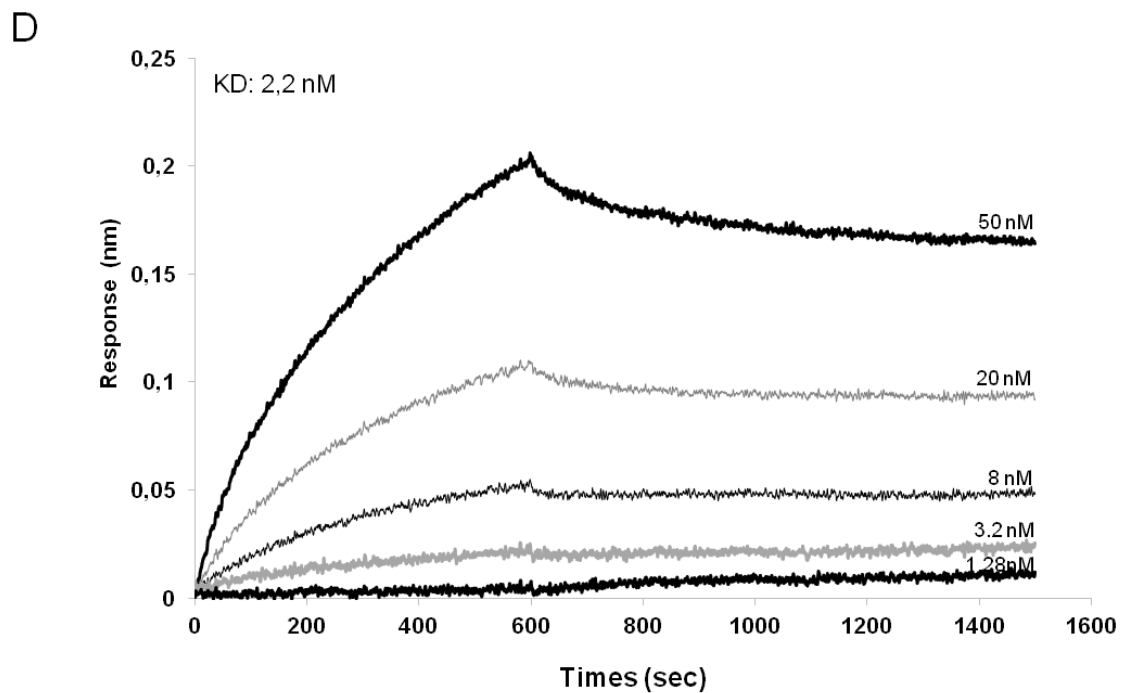
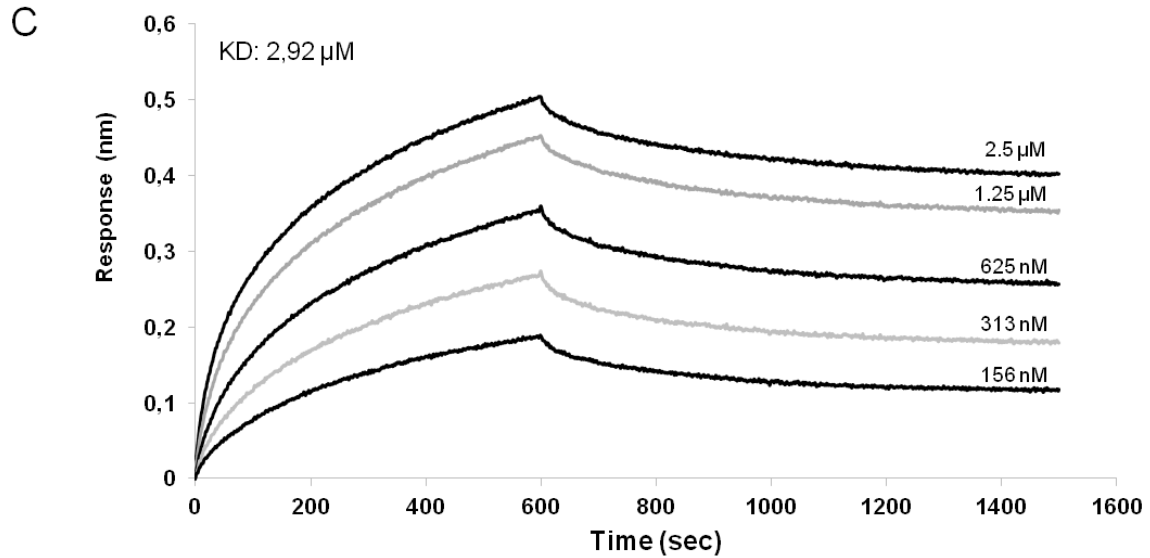


Figure 2. P8.1 interacts with the extracellular c-terminus domain of HSP70 and blocks HSP70 /TLR2 association (C) Association and dissociation curves of HSP70 (concentration range from 2.5 μ M to 156 nM) with biotinylated TRL2 immobilized on streptavidin sensor tips. Curves represent the mean values of triplicate measurements of each concentration. (D) Association and dissociation curves of HSP70 (concentration range from 50 nM to 1.28 nM) with biotinylated A8 immobilized on streptavidin sensor tips. Curves represent the mean values of triplicate measurements of each concentration.

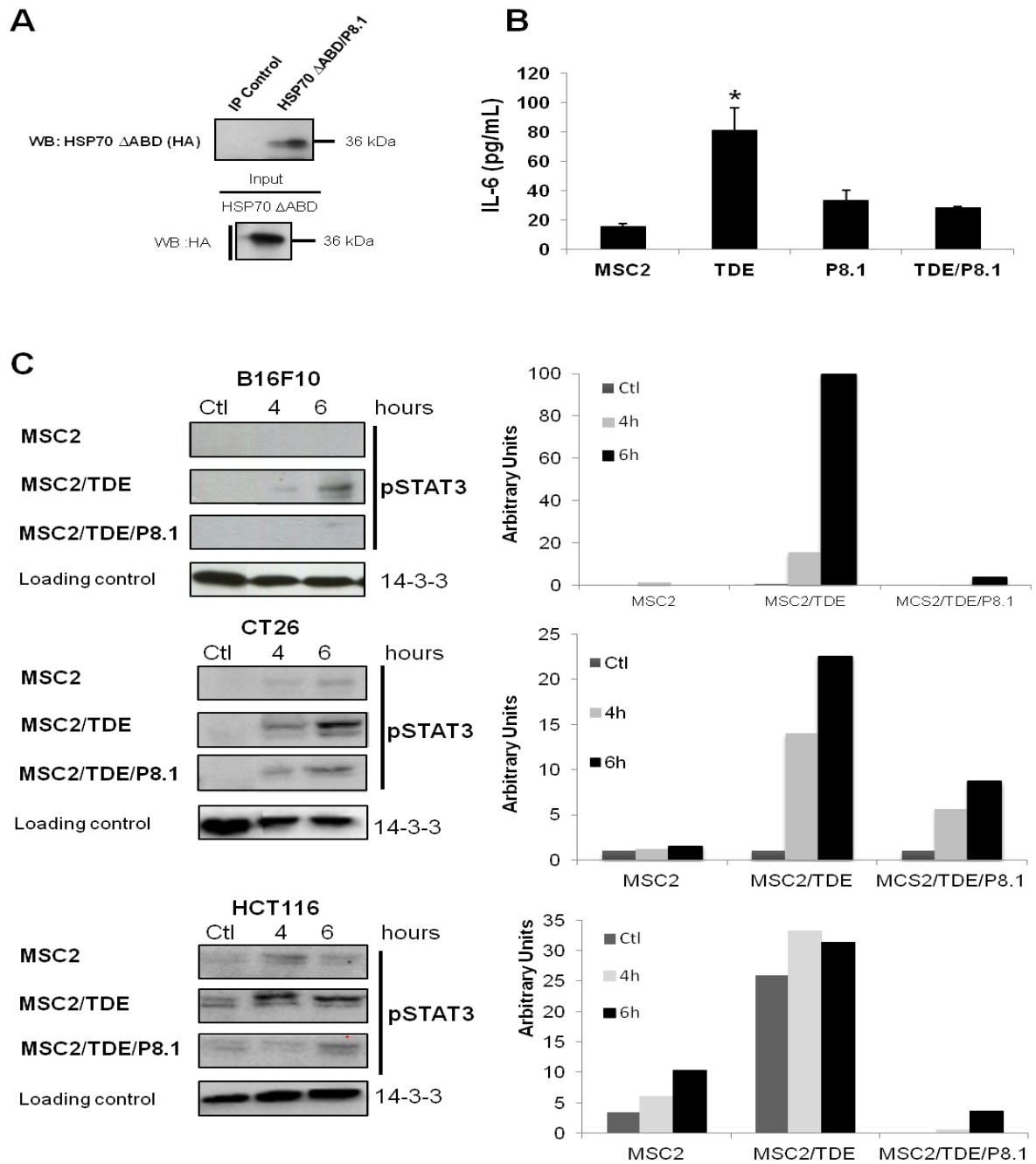


Figure 3. P8.1 blocks the activation and proliferation of MSC2 cells. (A) Purified P8.1 peptide at 0.9 μ M was incubated with HSP70 protein in which the ATP-binding N-terminus domain has been deleted called HSP70 Δ ABD (100 ng, produced by a TNT-coupled transcription/translation system). Immunoprecipitation (IP) of P8.1 (biotin tagged, 1 μ g) was followed by HSP70 immunoblotting. IP control: non relevant IgG antibody. Inputs indicate the amount of HSP70 Δ ABD present in the immunoprecipitation mixture. (B) IL-6 concentration was determined by ELISA in the supernatant of MSC2 cells incubated or not with exosomes (from B16F10) in the presence or absence of P8.1 (during 24h). *, $p < 0.05$, (n=3). (C) A representative image of a western blot showing the kinetics of STAT3 phosphorylation in MSC2 cells incubated or not with exosomes isolated from B16F10, CT26 or HCT116 cells together with a peptide control (TDE) or P8.1 (TDE/P8.1). In the right panels, the amount of pSTAT3 was quantified by densitometric analysis. *, $p < 0.05$.

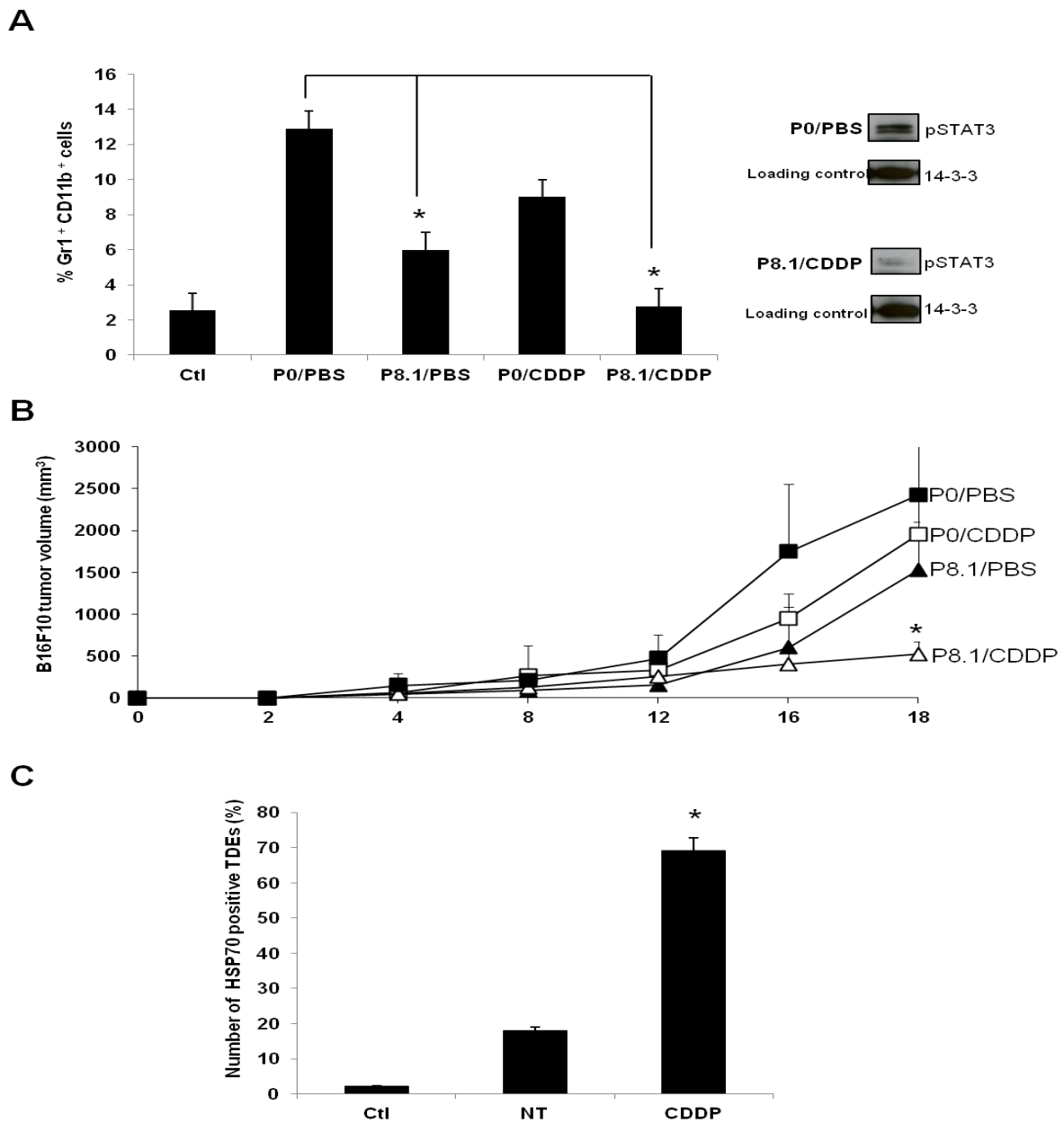
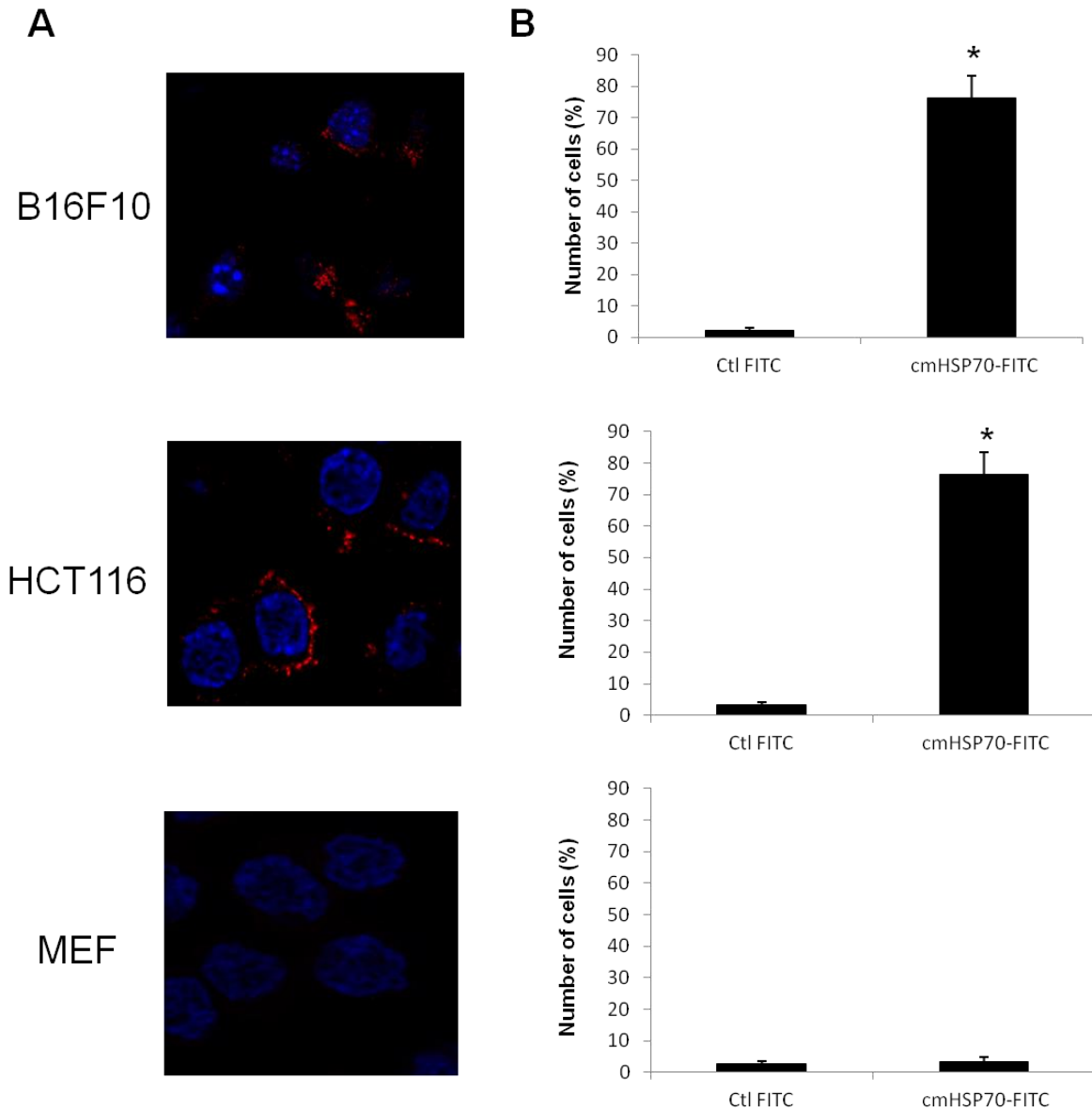


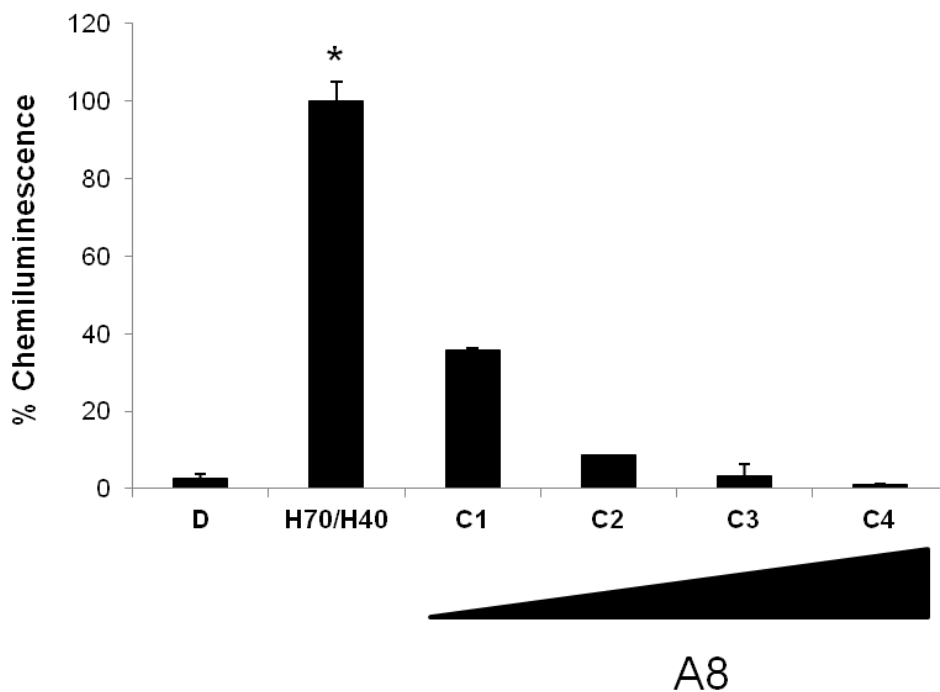
Figure 4. P8.1 can improve cisplatin effect and block activation of MDSC cells. (A) Flow cytometry analysis of percentage of Gr1⁺ CD11b⁺ cells in spleen collected in mice without tumor (Ctl) or tumor-bearing mice treated by P0 (3 mg/kg) (P0/PBS), or tumor-bearing mice treated with P8.1 (3 mg/kg) or tumor-bearing mice treated with cisplatin (CDDP, 5mg/mL) or tumor-bearing mice co-treated with P8.1 and cisplatin (P8.1/CDDP), (n=6) and a representative western of pSTAT3 in spleen MDSC. (B) Analysis of tumor growth after subcutaneous flank injection of B16F10 (melanoma cells, 5x10⁴ cells/per mice on day 0 in mice. On day 4, animals started to receive P0 or P8.1 (3 mg/kg were dissolved in PBS, I.p injection). On day 5, half the animals were treated with cisplatin as a single dose (CDDP, I.p injection, 5 mg/mL). The tumor size was measured every two days (6 animals per group). The white symbols represent the tumors from animals treated with cisplatin. (C) TDE-HSP70 isolated from B16F10 cells treated or not with cisplatin (CDDP, 25 μ M) was determined by flow cytometry using cmHSP70-FITC. Data represent percentage of MFI \pm SD (n=3); *, p<0.05.

Supplementary Figure 1



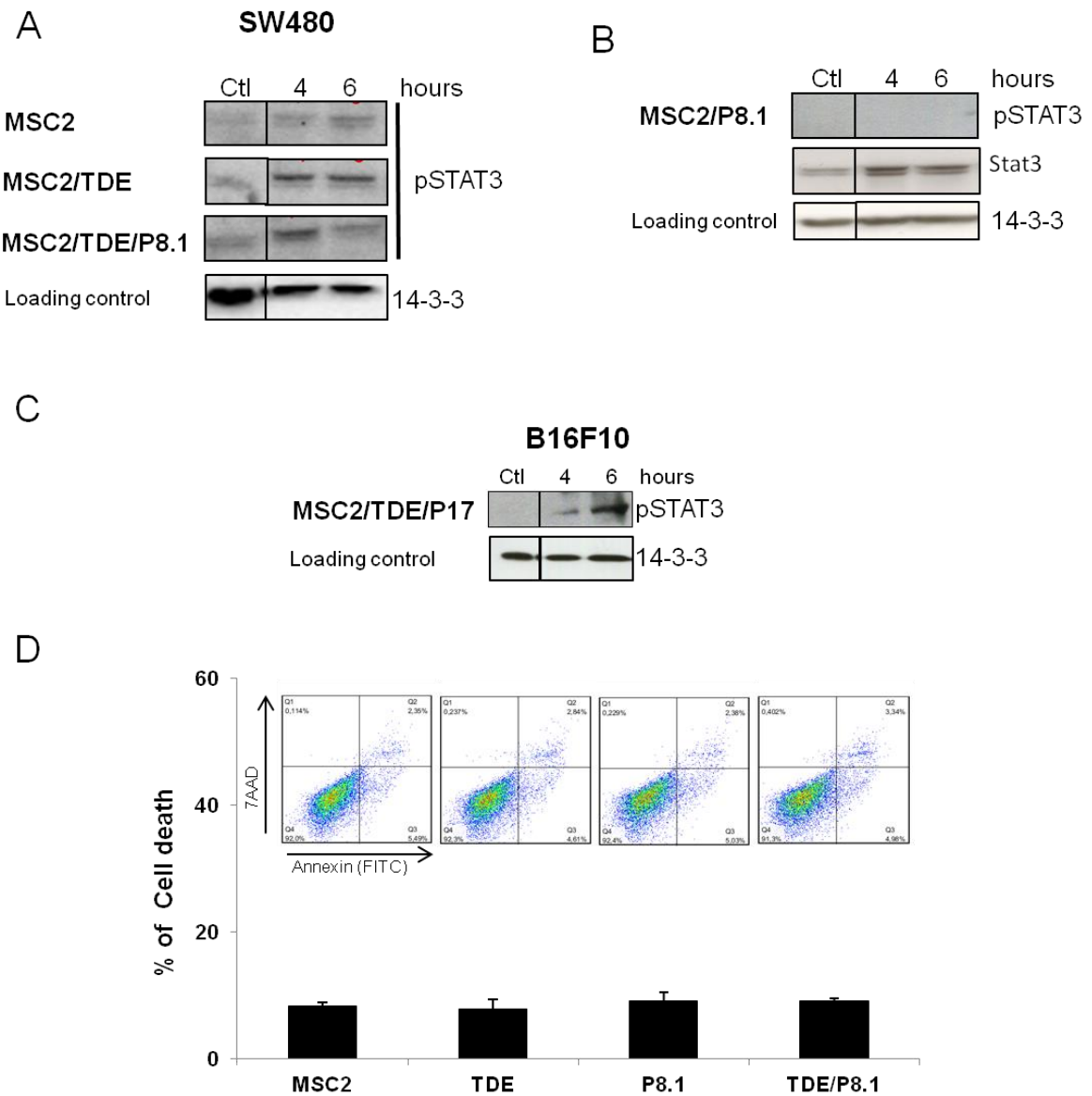
Supplementary Figure 1: HSP70 is expressed on cancer cells but not on normal cells. (A) Expression of HSP70 in B16F10, HCT116 and MEF cells was detected by indirect immunofluorescence microscopy using anti-cmHSP70 antibody (Red). Nuclear cells were staining by DAPI. (B) Membrane-bound-HSP70 in B16F10, HCT116 and MEF cells were determined by flow cytometry. Data represent percentage of MFI \pm SD (n=3); insert shows representative FACS histogram. *, $p < 0.05$.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2: A8 block HSP70 activity in vitro. Denatured luciferase was incubated in the presence or absence of human HSP70/HSP40 and in the presence of A8 (from C1 to C4 5 to 50 μ M) for 1 hour at 25°C at the following ratios (luciferase: HSP70:HSP40 (1:10:2)). Following incubation, the luciferase substrate D-luciferin was added and within 10 minutes the total light units emitted were collected for 10 seconds at 560 nm using a Wallac (Victor 3) spectrophotometer. *, $p < 0.05$.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3: P8.1 blocks the activation MCS2 cells and do not induce MSC2 cell death. (A) Expression of pSTAT3 in MCS2 cells alone or incubated with exosomes from SW480 cells together with a peptide control (TDE) or P8.1 (TDE/P8.1) was determined by western blotting. (B). Expression of STAT3 in MCS2 cells incubated with P8.1 was determined by western blotting (C) Expression of pSTAT3 in MCS2 cells alone or incubated with exosomes from B16F10 cells in the presence or absence of peptide P17 (bind to ABD of HSP70) was determined by western blotting. (D) MSC2 cells were treated with TDE, P8.1 or TDE/P8.1. After 24 hours, cell death was determined by 7AAD and annexin V (FITC).

Material and Methods

Cells and products

B16F10 mouse melanoma cell line, CT26 human colon cancer cell line, HCT116 and SW480 human colorectal cancer cell lines were cultured in RPMI 10% foetal bovine serum (FBS, Lonza) Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were cultured in DMEM 10% FBS (Lonza). All cell lines provided by American Type Culture Collection (ATCC). MSC2 cell line (myeloid suppressor cell 2) was a gift from Vincenzo Bronte (Istituto Oncologico, Padova, Italy). MSC2 was cultured in RPMI 10% FBS. Absence of mycoplasma contamination was assayed every week.

The peptide aptamer (A8) and peptides (P8.1 or P8.1-biotin and P17) from the variable region of the aptamers were synthesized and highly purified by Proteogenix. They were reconstituted and diluted in PBS at the indicated concentrations. Recombinant HSPs were from StressGen (EnzoLife). Recombinant TLR2 was from R&D Systems. Cisplatin (Sigma-Aldrich) was diluted in PBS and used to a final concentration of 25 $\mu\text{mol/L}$.

Exosome purification

B16F10, CT26, HCT116 and SW480 cells were cultured for 48h or 24h with cisplatin (CDDP) treatment in medium depleted from serum-derived exosomes by overnight centrifugation at 100,000g. Then, supernatants were collected from cell lines and sequentially centrifuged at 300g for 10 minutes (4°C) and then at 2000g for 10 minutes. Exosomes were isolated at 100,000g for 70 minutes and washed once in PBS. Pellets were resuspended in 200 μl of PBS. The concentration of exosomal proteins was quantified by Lowry assay (Biorad). All steps were realized in sterile condition.

Immunoprecipitation

For the *in vitro* coimmunoprecipitation, we used P8.1 (biotin-tagged) or A8 or TLR2 recombinants proteins. HSP70WT and HSP70 Δ ABD (both HA-tagged) was produced with the TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) as follows: 1 mg of template plasmid was added to the reaction mixture and incubated at 30°C for 90 minutes. TLR2 was incubated with HSP70WT alone or both HSP70 and A8 (from 0.3 μM to 1.8 μM). Immunoprecipitation were analysed by western blot as described below.

Western blotting

Proteins were separated in a 8% or 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes using a wet transfer apparatus (Bio-Rad). Membrane were saturated 1h with 5% (w/v) non-fat dry milk or BSA, and probed overnight with the corresponding primary antibodies: anti-HA-tag was from Covance (Eurogentec); anti-thioredoxin (Sigma), anti-TLR2 (Santa Cruz), anti-HSP70 (Enzo life), anti-Stat3 (Santa Cruz), anti-pSTAT3 (Cell signalling), anti-CD81 (Ebioscience), anti-flotilin-1 (BD Biosciences) and anti-14-3-3 (Santa Cruz). Then, the membranes were incubated for 1 h with appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and revealed with ECL (Amersham).

Transmission Electron microscopic (TEM)

The exosome suspension (30µl) was added to a collodion-carbonated nickel-200 grids and fixed with paraformaldehyde 4%. Then, the sample was saturated 10 minutes with XX, washed with PBS and labelled with cmHSP70 (*Multimmune, Germany*) during to 2 hours. After washing with PBS supplemented with 1% BSA, exosomes were labelled with a secondary antibody coupled with a 10 nm gold beads. A post-fixation step was performed with a 2% glutaraldehyde solution and then stained with 3% phosphotungstic acid. The sample was observed with a Hitachi H-7500 electronic microscope equipped with an AMT camera.

Flow Cytometry

Exosomes were bound to surfactant-free white aldehyde-sulfate latex beads (3 µM, Invitrogen) and concentrated at 1.10^4 beads/µL. We incubated 30 µg exosomes with beads suspension for 15 min and then for 1h at room temperature (RT) in final volume of 1 mL PBS. Beads were saturated with glycine (100 mM) for 30 minutes at RT. Then, they were washed twice with PBS supplemented by 3% of FBS. Exosomes or cancer cells were labelled by a classical staining with control isotype or cmHSP70-FITC (*Multimmune, Germany*) antibodies. Analyses were performed on a LSRII flow cytometer (BD, Bioscience).

Biolayer interferometry (BLI)

Protein-protein interaction experiments were conducted at 25°C in PBS with an Octet Red instrument (Forté Bio, Menlo Park, CA, USA) by biolayer interferometry (BLI). The ligand (cmHSP70 or A8 or TLR2) was biotinylated using EZ-Link NHS-PEG₄-biotin (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Germany) according to the manufacturer's protocol and immobilized at a concentration of 20 µg/ml on streptavidin sensors (ForteBio, Menlo Park, CA, USA). These functionalized biosensors were dipped into black Greiner 96-well microplates agitated at 200 g and filled with a solution of 200 µL containing the analyte. All sensorgrams were corrected for baseline drift by subtracting a control sensor exposed to running buffer only. Each K_D was determined with a 1:1 stoichiometry model using a global fit with Rmax unlinked by sensor (Forte Bio, Data analysis software version 7.1.0.36).

MSC2 functional assay

Five millions of MSC2 cells incubated or not with exosomes isolated from B16F10, CT26, HCT116 or SW480 cells together with a peptide control (TDE) or P8.1 (TDE/P8.1) during 4h or 6h. Cells were isolated and pSTAT3 was analyzed by western blotting.

Tumor growth analysis in vivo

Exponentially growing B16F10 were harvested and resuspended in an RPMI medium without FBS. *In vivo* studies were performed in wild-type C57/BL6 mice (Charles River). B16F10 cells (5.10⁴ cells) were injected s.c. into the right flank. Tumor volumes were evaluated every 2 days. The animals were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie, France. All experiments were approved by the Comité d'Éthique de l'Université de Bourgogne.

MDSCs cell isolation and analysis

Single-cell suspensions were prepared from spleens, and red cells were removed using ammonium chloride lysis buffer. Gr-1⁺ cells were isolated from spleens of different group of tumor-bearing mice or naive mice by labeling the cells with PE Cy7 Ab to Gr-1, then using magnetic PE Cy7 beads and LS MACS columns (Miltenyi Biotec). For extracellular staining of immune markers, single-cell suspensions were prepared. We incubated 1.10⁶ freshly prepared cells resuspended in PBS with fluorochrome-coupled CD11b antibody

(eBioscience). All events were acquired by a BD Bioscience LSR-II device and analyzed with FlowJo (Tree Star).

Immunofluorescence

B16F10 ($25 \cdot 10^3$ cells), HCT116 ($5 \cdot 10^4$ cells) and MEF ($3 \cdot 10^4$ cells) were seeded in 24 well-dishes which were pretreated for 10 minutes with Poly-L-Lysin (P4707, Sigma Aldrich). 24h later, cells were washed with PBS and labelled with cmHSP70 antibody (1:200) for 1 h at 4°C. After washing, cells were fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C for 10 min and washed once. Then, cells were saturated for 30 minutes with BSA 3% and incubated with a secondary antibody labelled with Alexa-568 (1:1000) at 4°C for 1h. For experiment, cover glasses were mounted on a drop of Mounting Medium containing Dapi (Duo82040, Sigma Aldrich) for 15 minutes in the dark on a microscopy slide (045796, Dutscher). Slides were imaged using a CDD equipped up right microscope (Zeiss) and 63x, 1.4NA objective.

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

MSC2 cells were incubated alone or co-incubated with exosomes from B16F10 cells or/ and P8.1 peptide (during 24h). Then, the supernatant was collected and centrifuged at 300g at 4°C for 5 min and analyzed with IL-6 ELISA assay (BD biosciences) according to the manufacturers' protocol.

Refolding luciferase assay

Luciferase was denatured with denaturing buffer during 30 minutes at RT. Denatured Luciferase was incubated in the presence or absence of human HSP70/HSP40 or in the presence of A8 (from 5 μ M to 50 μ M) for 1 hour at 25°C at the following ratios (luciferase:HSP70:HSP40 (1:10:2)). Following incubation, the luciferase substrate D-luciferin was added and within 10 minutes the total light units emitted were collected for 10 seconds at 560 nm using a Wallac (Victor 5) spectrophotometer. (n=3).*, p<0.05.

Statistical Methods

Results are expressed as means \pm SEM from at least three independent experiments. Values were analyzed using student's t test. All p values were obtained using two-tailed tests and error bars in the graphs represent 95% confidence intervals. Quantitative data were analyzed using the GraphPad Prism program. Statistical significance, p <0.05, are denoted with *.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National du Cancer, European Commission's Seventh Framework Programme (SPEDOC 248835) (C. Garrido), the *Agence Nationale de la Recherche* and the *Institut National du Cancer, and the Conseil Regional de Bourgogne* (C. Garrido). H. Majhed has a fellowship from SPEDOC. J. Gobbo has a fellowship from the Ligue contre le Cancer. Carmen Garrido team is labeled by *La Ligue Nationale contre le Cancer* and LabEx LipSTIC. We thank the FEDER for their financial support.

References

1. Birtle, A. Maximizing survival in metastatic castrate-resistant prostate cancer: a clinical viewpoint. *Expert review of anticancer therapy* **13**, 89–99 (2013).
2. Pasini, F., Fraccon, A. P. & DE Manzoni, G. The role of chemotherapy in metastatic gastric cancer. *Anticancer research* **31**, 3543–54 (2011).
3. Siegel, R. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **62**, 220–41
4. Kigawa, J. New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer. *Yonago acta medica* **56**, 43–50 (2013).
5. Liu, Y. *et al.* Inhibition of p300 impairs Foxp3+ T regulatory cell function and promotes antitumor immunity. *Nature Medicine* 1–7 (2013). doi:10.1038/nm.3286
6. Chhabra, A. & Mukherji, B. Death Receptor-Independent Activation-Induced Cell Death in Human Melanoma Antigen-Specific MHC Class I-Restricted TCR-Engineered CD4 T Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (2013). doi:10.4049/jimmunol.1202350
7. Galdiero, M. R. *et al.* Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* (2013). doi:10.1016/j.imbio.2013.06.003
8. Khaled, Y. S., Ammori, B. J. & Elkord, E. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. *Immunology and cell biology* (2013). doi:10.1038/icb.2013.29
9. Nagaraj, S. *et al.* Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease. *Cancer research* **69**, 7503–6 (2009).
10. Serafini, P., Borrello, I. & Bronte, V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in cancer biology* **16**, 53–65 (2006).
11. Serafini, P. *et al.* Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **53**, 64–72 (2004).
12. Chalmin, F. *et al.* Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. **120**, 457–471 (2010).
13. Bobrie, A. & Théry, C. Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal? *Biochemical Society transactions* **41**, 263–7 (2013).
14. Ostrowski, M. *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology* **12**, 19–30; sup pp 1–13 (2010).

15. McLellan, A. D. Exosome release by primary B cells. *Critical reviews in immunology* **29**, 203–17 (2009).
16. Knight, A. M. Regulated release of B cell-derived exosomes: do differences in exosome release provide insight into different APC function for B cells and DC? *European journal of immunology* **38**, 1186–9 (2008).
17. Kapsogeorgou, E. K., Abu-Helu, R. F., Moutsopoulos, H. M. & Manoussakis, M. N. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis and rheumatism* **52**, 1517–21 (2005).
18. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology* **9**, 581–93 (2009).
19. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* **9**, 654–9 (2007).
20. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine* **18**, 883–91 (2012).
21. Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **12**, 1659–68 (2011).
22. Lv, L.-H. *et al.* Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *The Journal of biological chemistry* **287**, 15874–85 (2012).
23. Balaburski, G. M. *et al.* A modified HSP70 inhibitor shows broad activity as an anticancer agent. *Molecular cancer research : MCR* (2013). doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0547-T
24. Lanneau, D. *et al.* Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of cellular and molecular medicine* **12**, 743–61 (2008).
25. Schmitt, E. *et al.* Chemosensitization by a Non-apoptogenic Heat Shock Protein 70-Binding Apoptosis-Inducing Factor Mutant Chemosensitization by a Non-apoptogenic Heat Shock Protein 70-Binding Apoptosis-Inducing Factor Mutant. 8233–8240 (2003).
26. Rérole, A.-L. *et al.* Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer research* **71**, 484–95 (2011).
27. Rappa, F. *et al.* HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: an overview. *Anticancer research* **32**, 5139–50 (2012).
28. Multhoff, G. *et al.* A STRESS-INDUCIBLE 72-kDa HEAT-SHOCK PROTEIN (HSP72) IS EXPRESSED ON THE SURFACE OF HUMAN TUMOR CELLS ,. **279**, 272–279 (1995).

29. Jegou, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters* **332**, 275–85 (2013).
30. Multhoff, G. Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. **43**, 229–237 (2007).
31. Stangl, S. *et al.* Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 733–8 (2011).
32. Baines, I. C. & Colas, P. Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug discovery today* **11**, 334–41 (2006).
33. Seigneuric, R., Gobbo, J., Colas, P. & Garrido, C. Targeting cancer with peptide aptamers. *Oncotarget* **2**, 557–61 (2011).
34. Rérole, A.-L. *et al.* Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer research* **71**, 484–95 (2011).
36. Xiang, X. *et al.* TLR2-mediated expansion of MDSCs is dependent on the source of tumor exosomes. *The American journal of pathology* **177**, 1606–10 (2010).
37. Kapanadze, T. *et al.* Regulation of accumulation and function of myeloid derived suppressor cells in different murine models of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* (2013). doi:10.1016/j.jhep.2013.06.010
38. Bottoni, P., Giardina, B. & Scatena, R. Proteomic profiling of heat shock proteins: An emerging molecular approach with direct pathophysiological and clinical implications. *Proteomics. Clinical applications* **3**, 636–53 (2009).
39. Andre, F. *et al.* Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 28–33 (2013).
40. Galluzzi, L., Senovilla, L., Zitvogel, L. & Kroemer, G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nature reviews. Drug discovery* **11**, 215–33 (2012).
41. Martins, I. *et al.* Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* **30**, 1147–58 (2011).
42. Coles, D. J., Rolfe, B. E., Boase, N. R. B., Veedu, R. N. & Thurecht, K. J. Aptamer-targeted hyperbranched polymers: towards greater specificity for tumours in vivo. *Chemical communications (Cambridge, England)* **49**, 3836–8 (2013).
43. Hanahan, D., Weinberg, R. A. & Francisco, S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. **100**, 57–70 (2000).

Conclusion

Dans ce travail, nous avons dans un premier temps, isolé des exosomes de quatre lignées cellulaires tumorales murines et humaines. Nous avons pu démontrer que ces exosomes présentent HSP70 membranaire à l'aide de différentes techniques : microscope électronique à transmission, cytométrie en flux et interférométrie (octet). Confirmant que HSP70 extracellulaire est bien exprimée sur les exosomes dérivants des cellules cancéreuses, et non des cellules saines. Par ailleurs, nous avons mis en évidence, un inhibiteur spécifique de HSP70 extracellulaire : P8.1 qui se fixe sur le domaine C-terminal de HSP70 (soit le PBD), domaine exposé vers l'extérieur lorsque HSP70 est insérée dans la membrane. Nous démontrons que P8.1 est capable d'interférer sur l'interaction de HSP70 avec le TLR2, exprimés sur les exosomes et sur les MDSCs respectivement. De fait, HSP70 présente une affinité 1000 fois plus élevée pour P8.1 que pour TLR2. *In cellulo*, lorsque les MDSCs sont mise en présence des exosomes dérivés de cellules B16F10 et de P8.1, nous n'observons plus de phosphorylation de STAT3, ni de production de IL-6, suggérant que l'inhibiteur de HSP70 bloque l'activation des MDSCs et en conséquence leur rôle immunosuppresseur sur les cellules immunitaires effectrices notamment sur les lymphocytes T.

Parallèlement, nous montrons que chez la souris, le co-traitement par le P8.1 et le cisplatine permet de réduire significativement le nombre de MDSCs dans la rate et de bloquer la progression tumorale. Ainsi, P8.1 peut inhiber la forme extracellulaire de HSP70 et restaurer l'immunité anti-tumorale. Ce travail semble indiquer que HSP70 membranaire joue un rôle extracellulaire très important dans le développement de la tumeur en inhibant de manière indirecte les acteurs de la réponse immunitaire. Ceci conforte donc l'hypothèse d'utiliser les inhibiteurs de HSP70 en co-traitement de la chimiothérapie classique. Enfin, ce travail suggère que HSP70 extracellulaire pourrait servir de biomarqueur, puisque nous avons réussi à capturer les exosomes tumoraux par le biais de HSP70. Cela ouvre donc des perspectives très intéressantes dans le diagnostic du cancer.

UN PAS VERS LA CLINIQUE

Comme je l'ai exposé précédemment, le but de nos recherches avec les aptamères peptidiques est de trouver des inhibiteurs de HSP70 efficaces pour être testés en clinique. Les aptamères peptidiques et leurs dérivés peptidiques ont prouvé expérimentalement qu'ils présentaient un potentiel pour aider à lutter contre le cancer, ce qui constitue la première étape préclinique pour ces candidats-médicaments potentiels. Nous avons donc débuté l'étude de la biodistribution des aptamères peptidiques et de ses dérivés peptidiques chez le petit animal. Nous présentons seulement les résultats obtenus les plus avancés concernant les aptamères peptidiques.

Bien évidemment, l'étude préclinique est obligatoire avant tout essai chez l'homme. Les aptamères peptidiques ayant passé la première étape de preuve de concept, nous poursuivons notre démarche qui comprend des études de pharmacodynamique et de pharmacocinétique chez les rongeurs.

Il est en effet nécessaire de caractériser pour nos candidat-médicament l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du candidat-médicament par l'organisme (ADME), ainsi que de connaître les effets secondaires ou leur toxicité sur les organes. Nous avons donc entrepris l'étude de la biodistribution des aptamères peptidiques par imagerie chez le petit animal qui se divise 4 parties :

1-Chimie moléculaire : choix du radiométal et stratégie de marquage

Elle permet de marquer la molécule avec un radioélément pour suivre la biodistribution des aptamères peptidiques par imagerie (sur corps entier puis par organe après sacrifice de l'animal). Cette étape sera réalisée en collaboration avec l'ICMUB (Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, Dijon). Nous avons envisagé une méthode de marquage dite de « marquage indirect » permettant d'encapsuler un radiométal émetteur du signal de manière à éviter son relargage dans l'organisme. Pour cela nous devons utiliser un agent chélatant. Le choix de l'agent chélatant est étroitement lié à l'isotope radioactif qui va être utilisé avec l'imagerie *in vivo*. Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi comme radionucléide l'indium 111 (^{111}In), émetteur de photon gamma. L' ^{111}In est ainsi détectable par imagerie SPECT (*Single Photon Emission Tomography*) (Wadas, Wong, Weisman, & Anderson, 2010), technique d'imagerie médicale nucléaire tomographique basée sur la

scintigraphie qui permet de réaliser des images et des reconstructions en trois dimensions des organes et de leur métabolisme au moyen d'un ensemble de gamma caméras qui tournent autour de l'animal (ou du patient dans le cas d'examen clinique). La période de ^{111}In est de 2,8 jours, ce qui est relativement adapté pour étudier une cinétique de phénomènes biologiques et permettre d'imager à des temps post injection longs (ex : 72h) (Liu, 2008). Relativement accessible, il reste aujourd'hui un radioélément très utilisé pour la validation de molécule et l'obtention de preuve de concept préclinique par imagerie. Son utilisation s'étend également au niveau clinique où il est notamment utilisé pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines. En effet, le produit Octreoscan® (^{111}In -DTPA-Octreotide) a fait ses preuves et est maintenant commercialisé.

Dans cette étude nous avons sélectionné comme agent chélatant les dérivés du DOTA (2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl) tetraacetic acid), et plus particulièrement les systèmes appelés DOTAGA (GA pour *Glutaric Acid*) (Figure 15). Ces molécules macrocycliques possèdent d'excellentes propriétés de complexation vis-à-vis des radiométaux utilisés en imagerie, et notamment l'Indium 111 (Lattuada, Barge, Cravotto, Giovenzana, & Tei, 2011). Afin de lier de manière covalente la biomolécule d'intérêt au DOTAGA, une fonction réactive a été introduite au niveau du macrocycle. Dans un premier temps, nous avons fait le choix de travailler avec les aptamères peptidiques plutôt qu'avec les dérivés peptidiques. Pour les mêmes raisons que citées précédemment, les aptamères peptidiques sont composés d'une région constante, qui n'est pas impliquée dans l'interaction avec HSP70, nous estimons donc pouvoir greffer plus facilement la cage DOTA, en minimisant les risques de toucher la région variable (séquence peptidique d'intérêt), limitant ainsi le risque de modifier l'activité inhibitrice des aptamères peptidiques. Nous avons donc, en collaboration avec l'ICMUB, modifié chimiquement les aptamères peptidiques A8 et A17 avec le motif DOTA seul puis avec le DOTA complexé par l'indium « froid » (non radioactif). A chaque étape, l'activité inhibitrice des aptamères peptidiques sur HSP70 a été contrôlée.

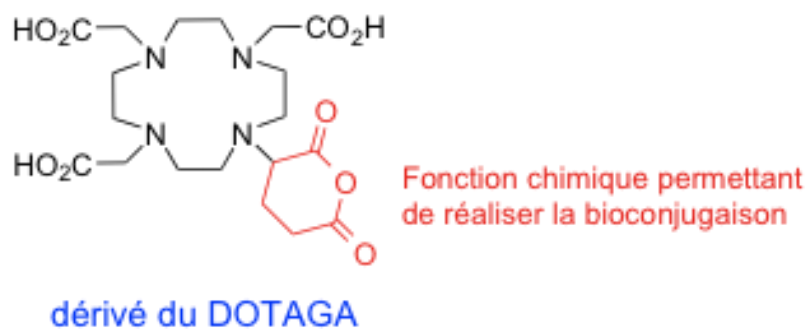


Figure 15 : Structure chimique de l'agent chélatant utilisé pour le marquage des molécules. L'agent chélatant est composé : d'une cage DOTA, permettant la complexation du radiométal et de acide glutarique (GA) permettant le bioconjugaison entre le DOTA et l'aptamère peptidique.

2) Test d'activité de la molécule *in vitro* après la bioconjugaison du radioélément (à froid) :

Cette étape permet de vérifier que les modifications apportées sur la molécule (aptamères peptidiques et ses dérivés) ne modifient pas son l'activité. Pour tester l'action inhibitrice des aptamères, nous avons utilisé un test de renaturation de la luciférase que j'ai mis au point lors de mon doctorat. Brièvement, ce test consiste à (i) dénaturer chimiquement la luciférase (induisant la perte de son activité enzymatique), puis (ii) la mettre en présence du tampon de renaturation comprenant HSP70 et HSP40. Après 1h de renaturation, le substrat de la luciférase, la D-luciférine est ajoutée puis l'intensité lumineuse émise est captée et mesurée par un luminomètre. Cette technique rapide est réalisée en plaque de 96 puits ce qui permet de travailler en volume réduit, économisant ainsi les quantités des produits utilisés (protéines recombinantes, aptamères peptidiques modifiés).

Dans un premier temps, différents taux de greffage ont été testés sur les deux aptamères peptidiques (Figure 16). En effet, un taux de greffage trop important pourrait altérer les propriétés biologiques de la molécule tandis qu'un taux trop faible conduira inévitablement à une diminution du nombre d'agents chélatants ce qui peut réduire la cinétique de radioméallation. Le taux de greffage du DOTA a été déterminé par spectroscopie de masse (MALDI-TOF).

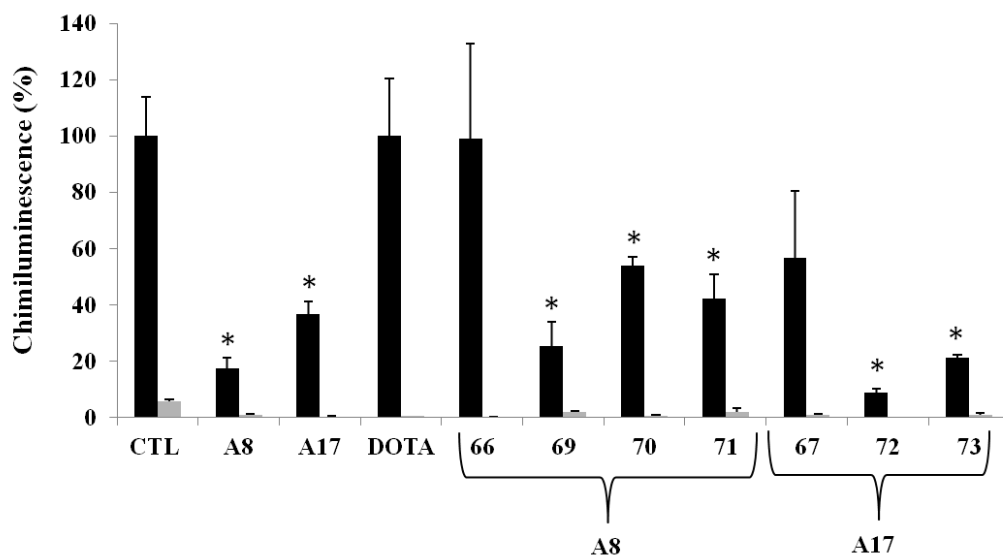


Figure 16 : Test d'activité des aptamères peptidiques modifiés chimiquement par le DOTAGA. Test de renaturation de la luciférase en présence des aptamères peptidiques A8 et A17 modifiés par le DOTAGA. Différents taux de greffage sont testés : Greffage de 2 cages DOTA pour les lots 69, 71 et 67 et greffage d'une cage DOTA pour le lot 66, 70, 72,73. La luciférase dénaturée est incubée avec HSP70/HSP40 (800 nM et 160 nM, respectivement) seule ou avec A8, A17, A8-DOTA, A17-DOTA (8 μ M) pendant 1H à 25°C. Ensuite l'intensité lumineuse est mesurée à 540 nm à l'aide d'un luminomètre (WALLAC Victor 3, PerkinElmer). Pour plus de clarté les conditions contrôles avec HSP70 seule et HSP40 seule ne sont pas représentées ici. ■ en présence de HSP70/ HSP40, ■ condition sans HSP.

Lorsque HSP70 et HSP40 (condition CTL) sont présentes, nous observons 100% de chimiluminescence, ce qui signifie que 100% de la luciférase a été renaturée. Lorsque nous ajoutons A8 ou A17 dans le mélange ce pourcentage passe de 18 à 37 % respectivement, montrant un blocage de la renaturation de la luciférase et donc l'inhibition de HSP70 par les aptamères. Le DOTA, ne présente pas d'effet sur l'expérience. Concernant les aptamères modifiés chimiquement, les lots pour A8 :69, 70, 71 et les lots pour A17 : 72 et 73 gardent leur capacité à neutraliser HSP70. De manière intéressante le lot 72 semble même être plus efficace que A17 seul. Les contrôles pour chaque condition représentée en gris clair, ne présentent pas ou peu de chimiluminescence. Nous démontrons ainsi que la luciférase a bien été dénaturée et que la présence de HSP70 et de HSP40 est essentielle pour la renaturation de la luciférase.

Au regard du test d'activité luciférase sur les aptamères modifiés pour l'imagerie, l'aptamère A17 et plus particulièrement le lot 72 (un seul DOTA) sera retenu pour tester le radiomarquage à froid. Par ailleurs, ce test démontre que l'approche par marquage indirect est tout à fait faisable pour les aptamères peptidiques.

Il est important, pour que les expériences soient reproductibles de travailler toujours sur le même lot d'aptamères modifiés. C'est pourquoi, nous avons cette fois-ci modifié l'aptamère A17 avec le DOTA dans des quantités importantes, nous permettant de réaliser la mise au point du marquage à froid et à chaud et les manipulations d'imagerie *in vivo*. Une petite partie de ce lot modifié par la cage DOTA a été marquée à froid par l'indium et l'activité de l'aptamère (analogue froid du produit qui sera injecté) a été testée comme précédemment (Figure 17).

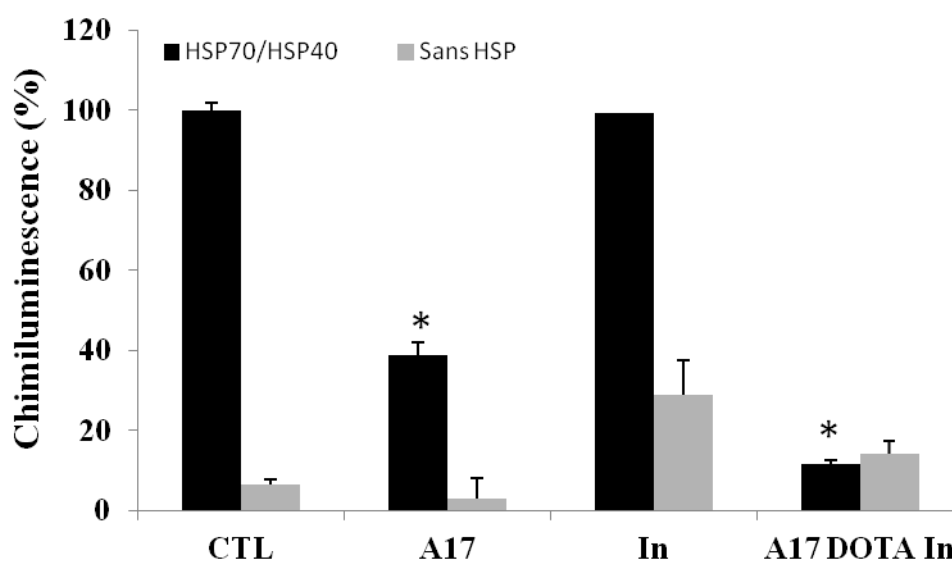


Figure 17 : Test d'activité de A17 marqué par l'indium froid. Test de renaturation de la luciférase en présence de A17 modifié par le DOTAGA incorporant l'In froid. La luciférase dénaturée est incubée avec HSP70/HSP40 (800 nM et 160 nM, respectivement) seule ou avec A17-DOTA In (8 μ M) pendant 1h à 25°C. Ensuite l'intensité lumineuse est mesurée à 540 nm à l'aide d'un luminomètre (WALLAC Victor 3, PerkinElmer). Pour plus de clarté les conditions contrôles avec HSP70 seule et HSP40 seule ne sont pas représentées ici. ■ en présence de HSP70/ HSP40, ■ condition sans HSP.

Nous pouvons observer sur la Figure 17 que l'incorporation de l'indium111 froid ne modifie pas l'activité biologique de A17. Et de manière surprenante, la modification semblerait même potentialiser A17 (A17 : 38 % et A17 DOTA In : 12 %).

Pour conclure, les modifications de l'inhibiteur A17 par l'agent chélatant DOTA complexé ou non à l'indium, n'influent pas sur son activité. Nous pouvons donc passer à la dernière étape avant l'imagerie: le radiomarquage à chaud de l'aptamère.

3) Radiomarquage à chaud : Le but ici est de mettre en place une procédure de radiomarquage efficace et reproductible afin de mener à bien les études *in vivo*. Cette étape sera réalisée en collaboration avec l'ICMUB (Dijon). Des premiers essais ont été réalisés sur la plateforme préclinique du CGFL. L'indium 111 est disponible commercialement sous forme de chlorure d'indium solubilisé dans une solution d'acide chlorhydrique. Nous avons ciblé une activité spécifique de 1GBq/mg, idéal pour mettre en image un petit animal dans les meilleures conditions. Le radiomarquage a été réalisé à différentes concentrations en aptamère peptidique. Ce dernier point est un des paramètres jouant le plus sur la cinétique de radiomarquage : plus la solution est diluée, plus la réaction de radiométallation sera lente. En effet, si l'on compare les résultats obtenus pour une concentration mère de 0.56 mg/mL en aptamère et une concentration de 1.4 mg/mL : dans le premier cas, le rendement du radiomarquage est de 15% maximum malgré une incubation pendant 3h, dans le second cas, le rendement est de 69% après seulement 1h à 37°C (Figure 18). Notons également que le choix du pH de la solution de marquage est également un des paramètres clés à prendre en compte pour atteindre un rendement de radiomarquage élevé.

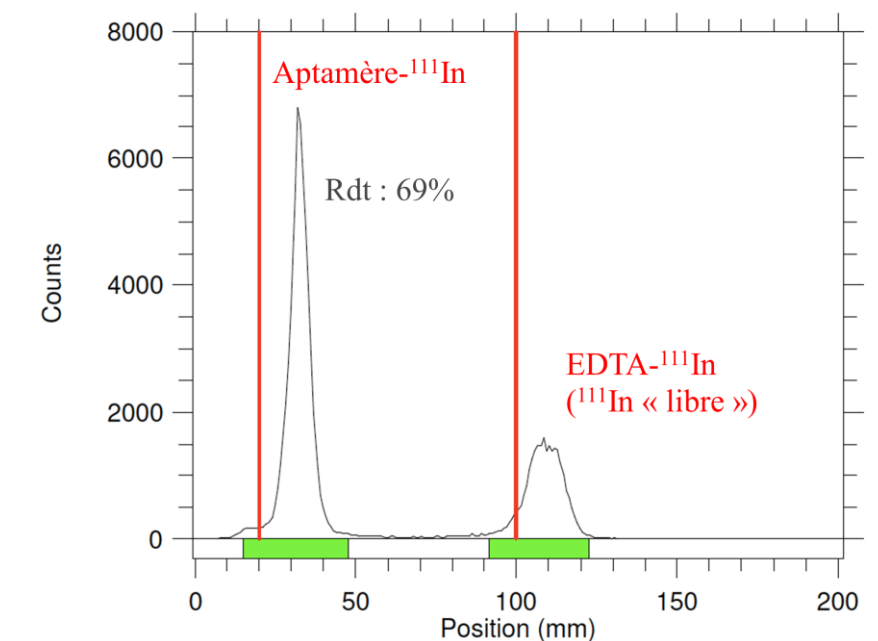


Figure 18 : Radiochromatogramme du composé A17 marqué à l'indium 111. A17-DOTA (1.4 mg/mL) est incubé avec l'indium 111 pendant 1h à 37°C. Puis de l'EDTA (50 mM) est additionné en large excès pour neutraliser l'indium 111 non complexé par le macrocycle DOTA. Le premier pic à 25 mm correspond à A17-DOTA marqué à l'indium 111, le second à 100 nm correspond à l'indium 111 libre piégé sous forme de complexe d'EDTA (DéTECTEUR Bioascan AR2000, Logiciel d'analyse des spectres Winscan 2.0).

Actuellement, nous nous efforçons d'optimiser ces conditions afin de se rapprocher d'un rendement de radiomarquage proche de 90-95%. Néanmoins, l'activité spécifique atteinte actuellement est de 700 MBq/mg, largement correcte pour passer à l'étape *in vivo*.

Les résultats obtenus à chaud bien que préliminaires, sont très encourageants, et permettent de valider la technique de marquage indirect dans ce projet.

- 4) Imagerie et comptage *ex vivo* : cette étape permet de définir l'ADME et la toxicité de notre composé. Cette étape sera réalisée en prestation de service par Pharm'Image (Plateforme d'imagerie, Centre Georges François Leclerc, CGFL, Dijon). Nous avons prévu de faire les images à quatre temps différents : 30 min, 1h, 2h et 24h post-injection.

A ce jour cette étude est arrivée à l'étape du test de radiomarquage à chaud et nous commencerons prochainement la partie imagerie.

Discussion

Mon travail de thèse s'est articulé en deux volets complémentaires : nous avons pu démontrer que la neutralisation de HSP70 intracellulaire et extracellulaire permet de bloquer la croissance tumorale dans des modèles d'animaux sensibilisés par des agents anticancéreux et de favoriser la réponse immunitaire antitumorale, respectivement. Au vue de ces résultats, HSP70 est, de fait une cible prometteuse pour le traitement du cancer.

I. Article 1 : Peptides and aptamers targeting HSP70 : a novel approach for anticancer chemotherapy

Ce travail, nous a permis de mettre en évidence l'efficacité de deux aptamères peptidiques (A8 et A17), ainsi qu'un dérivé peptidique des aptamères (P17), *in vitro* et *in vivo* dans la neutralisation de HSP70 intracellulaire et dans la sensibilisation des cellules cancéreuses à la mort cellulaire induite par le cisplatine ou le 5-FU.

a. Influence de l'administration du traitement de manière endogène versus exogène

In vivo, nous avons obtenu des résultats très encourageants montrant le pouvoir anti-tumoral puissant des aptamères peptidiques et du dérivé P17. Cependant, les aptamères peptidiques (A8 et A17) ne sont pas administrés de manière exogène, mais stablement exprimés dans les modèles de mélanome de souris (B16F10) et du cancer de côlon de rat (Prob) ce qui limite fortement leur utilisation. Le pouvoir anti-tumorigénique des aptamères peptidiques se traduit, dans le cadre d'un co-traitement avec le cisplatine, par une **absence** de croissance de la tumeur (Figure 4A et Supplementary Figure 3). En revanche, lorsque l'inhibiteur est administré de manière exogène, ici le peptide P17 (Figure 6A et 7A), nous observons seulement un **arrêt** de la croissance tumorale. Afin de tester, l'efficacité des aptamères administrés de manière exogène, nous avons choisi de produire l'aptamère A8. Nous avons obtenu, une protéine recombinante hautement purifiée, que nous avons testée en co-traitement avec le cisplatine (afin de faciliter l'entrée de A8, nous utilisons ici « un chariot »), dans des souris porteuses de tumeurs B16F10 (non montrée). Comme attendu dans ces conditions, A8 induit une nette diminution de la croissance tumorale. Cette différence

observée sur la croissance tumorale entre la **transfection stable** *versus* l'administration exogène pourrait s'expliquer par le fait que l'inhibition de HSP70 est **permanente** lorsque les aptamères peptidiques sont transfectés et ce dès le début de la prise tumorale, ce qui n'est pas le cas lors d'un traitement quotidien par l'aptamère recombinant. **HSP70** apparaît donc **primordiale** pour le développement de la **tumeur**. Une autre possibilité serait que la quantité d'aptamère peptidique apportée de façon exogène soit plus faible que celle transfectée et permettraient de neutraliser seulement une majorité de HSP70 intracellulaire. Ces commentaires sont importants à prendre en considération, mais n'enlèvent rien au pouvoir anti-tumoral des aptamères peptidiques.

b. P17, un « candidat-médicament »

Nous avons également démontré que P17, un peptide de seulement 13 acides aminés et composé uniquement de la région variable de A17, bloque HSP70 et présente des propriétés anticancéreuses très intéressantes. P17 ne présente **pas de toxicité** intrinsèque (Supplementary Figure 7) et est capable de **lier les lipoprotéines** dans le sang (Supplementary Figure 5), ce qui augmenterait sa stabilité dans l'organisme et donc sa demi-vie. De plus, P17 peut être produit facilement et administré de façon systémique, supposant que cette molécule pourrait être un « candidat-médicament » à valider en essai clinique.

II. Article 2: Restoring anticancer immune response by targeting tumor-derived exosomes with a HSP70 peptides inhibitor

Ce travail révèle l'importance des effets extracellulaires de HSP70 dans la progression anti-tumorale et donc son impact dans la thérapie anti-cancéreuse.

a. HSP70 à la membrane des cellules cancéreuses peut elle activer les MDSCs ?

L'activation des cellules immunosuppressives (MDSCs) est induite par la protéine de stress HSP70 exprimée à la membrane des exosomes. Or, nous savons que les cellules cancéreuses présentent aussi HSP70 à leur membrane, les données actuelles supposent que l'orientation de HSP70 est la même à la membrane des exosomes qu'à la membrane des cellules cancéreuses. Cela suggère donc que **les cellules cancéreuses** seraient aussi capables

d'activer les MDSCs. Mais à ce jour, rien n'a été démontré. La découverte de l'implication de HSP70 dans l'activation des MDSCs est récente, il est donc possible que l'activation des MDSCs par les exosomes ne se limite pas à l'interaction entre TLR2 et HSP70. En effet, il a été démontré que **les exosomes** peuvent aussi **fusionner** avec la membrane plasmique de la cellule cible ou encore être **internaliser par endocytose** (Tauro et al., 2012; Théry et al., 2009). Ce mécanisme d'internalisation facilité par la présence d'intégrine (LFA-1) à la surface des exosomes conduirait ainsi à la libération du contenu protéique et nucléique dans la cellule, pouvant éventuellement modifier les propriétés de la cellule. De plus, il a été montré que l'interaction de la protéine de stress HSP60 avec TLR2 et TLR4 (deux récepteurs cibles de HSP70) (Vabulas et al., 2001) conduit à l'endocytose du complexe puis à l'activation de différentes voie de signalisation dans la cellule cible. Il est donc probable que l'activation des MDSCs par les exosomes passe par l'interaction entre HSP70 et TLR2 puis par une étape d'internalisation de l'exosome. Les données actuelles ne nous permettent pas de répondre franchement à cette question.

b. Effets activateurs et inhibiteurs des exosomes sur le système immunitaire

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'action de HSP70 membranaire présent sur les exosomes tumoraux. Nous avons démontré qu'il était possible de bloquer l'activation des cellules immunosuppressives (MDSCs) en neutralisant de manière **spécifique** la protéine de stress **HSP70 membranaire** par le peptide **P8.1**, conduisant ainsi à l'arrêt de la croissance tumorale (Figure 4B). Par ailleurs, les exosomes peuvent activer les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les NK, indépendamment de HSP70 (Figure 9, dans introduction). Par conséquent, lorsque nous traitons les souris avec P8.1, nous empêchons l'activation des MDSCs et donc la mise en place d'un environnement immunosuppresseur, toutefois nous n'affectons pas la capacité des exosomes à **activer les cellules immunitaires** responsable de la **réponse immunitaire antitumorale**. Il semble donc possible que dans un contexte cancéreux, les effets activateurs et inhibiteurs des exosomes sur le système immunitaire coexistent. Au final, nous serions dans un **système d'équilibre** entre des cellules immunitaires **activées** (effets activateurs des exosomes) et des cellules immunitaires **inhibées** (effets inhibiteurs des exosomes). Dans ce cas, l'action des cellules immunitaires serait considérée comme nulle, favorisant ainsi le **développement tumoral**. En intervenant avec **P8.1**, nous pouvons supposer que nous **perturbons l'équilibre** de ce système en bloquant l'inhibition des cellules immunitaires, permettant alors de favoriser la

réponse anti-tumorale. En revanche dans ce travail, il reste à démontrer la présence des cellules immunitaires effectrices dans les tumeurs qui témoignerait de cette réponse immunitaire anti-tumorale. Dans cette optique, nous effectuerons des marquages d'immunohistochimie sur les cellules T, les cellules dendritiques, les macrophages et les NK.

c. Action indirecte de P8.1

Actuellement, les **MDSCs** sont considérées comme des **cibles thérapeutiques** potentielles dans la thérapie anticancéreuse (Kao et al., 2011; Poschke & Kiessling, 2012). Malheureusement, leur déplétion est impossible. En effet, ces cellules ne présentent pas de marqueurs membranaires uniques. De fait, une approche non spécifique est utilisée, visant à détruire les MDSCs activées, à l'aide d'agents anticancéreux (Nagaraj et al., 2009). Ce travail présente donc un avantage majeur par rapport à l'approche utilisée pour dépléter les MDSCs. En effet, nous agissons **en amont de l'activation** des MDSCs, et de **manière spécifique** sur les MDSCs. Nous démontrons que le pourcentage de MDSCs dans la rate d'une souris porteuse de tumeur co-traitée par le P8.1 et le cisplatine est identique au pourcentage de MDSCs trouvé dans la rate de souris contrôle sans tumeur (Figure 4A). Ainsi, le peptide **P8.1** agirait sur deux cibles thérapeutiques dans le domaine de la cancérologie : **HSP70** (action directe) et les **MDSCs** (action indirecte).

III. Discussion générale

a. HSP70, une potentielle cible thérapeutique

i. Vectorisation des inhibiteurs de HSP70

Afin de favoriser l'entrée des aptamères peptidiques et des peptides dans la cellule cancéreuse, nous avons utilisé un « chariot » commercial. Dans l'objectif final de mener ces inhibiteurs en clinique, nous devons absolument nous affranchir de ce « chariot ». C'est pourquoi, nous avons dans un premier temps essayé de **vectoriser** les inhibiteurs de HSP70 dans des liposomes de synthèse en collaboration avec le Dr Yann Pellequer (Laboratoire de Pharmacie galénique et de biopharmacie, Besançon). Malheureusement, jusqu'à présent et malgré plusieurs tentatives, aucun résultat n'a pu être obtenu *in vitro*. Cependant, nous n'abandonnons pas cette stratégie. En effet, notre groupe fait partie du projet Labex LipSTIC, qui a pour but de développer de nouveaux traitements anti-cancéreux plus efficaces et mieux

tolérés grâce à une vectorisation de médicaments via les lipoprotéines. Le projet est encore à ses débuts, mais nous plaçons de grands espoirs dans ce dernier.

Une autre possibilité, pour la vectorisation des inhibiteurs de HSP70, serait de se servir des **exosomes** afin de les utiliser comme vecteur pour délivrer des médicaments. En effet, les exosomes présentent de nombreux avantages. Ils sont de petites tailles, ils peuvent être endocytés par les cellules et ils sont composés en leur centre d'une partie hydrophile, permettant de transporter des molécules solubles (A17, P17 et des agents anticancéreux).

L'utilisation des exosomes comme **nano-vecteur** a déjà montré son efficacité *in vivo* dans la thérapie anticancéreuse (Ottenhausen et al., 2013; van den Boorn, Dassler, Coch, Schlee, & Hartmann, 2013). En effet, l'équipe de Michael Chopp a démontré que l'injection d'exosomes modifiés avec leurs molécules d'intérêt réduit significativement la croissance tumorale dans le cerveau du rat (Katakowski et al., 2013). Dans cette optique, nous pourrions donc utiliser les exosomes pour délivrer les **aptamères peptidiques ou les peptides** aux cellules cancéreuses. Il a été démontré que la fonctionnalisation du nano-vecteur avec un anticorps reconnaissant une protéine extracellulaire sur des marqueurs spécifiques des cellules cancéreuses, améliore la spécificité et augmente l'efficacité thérapeutique. Il serait donc intéressant de fonctionnaliser la surface des exosomes avec l'aptamère peptidique A8 ou le peptide P8.1 pour **cibler activement** les cellules cancéreuses. L'utilisation des exosomes comme système de délivrance de molécules anticancéreuses semble être une stratégie à potentiel thérapeutique, cependant de nombreuses études restent encore à faire pour valider ce modèle pour la vectorisation de nos inhibiteurs de HSP70.

ii. Inhibition de HSP70 intracellulaire et extracellulaire : action synergique ?

Dans ce travail, nous avons traité de manière indépendante l'inhibition de HSP70 intracellulaire et extracellulaire, mais ces deux aspects pourraient se rejoindre. En effet, comme détaillé précédemment, la présence de HSP70 à la surface des exosomes est directement corrélée à la présence de HSP70 à la membrane des cellules cancéreuses qui est elle-même corrélée à l'expression cytoplasmique de HSP70. Il est considéré que seulement environ 10 % de HSP70 cytoplasmique est capable de relocaliser à la membrane. Nous avons montré, dans notre première étude, que **les aptamères peptidiques**, après pénétration dans les cellules cancéreuses, s'associent à HSP70 intracellulaire et **inhibent** ses **propriétés anti-apoptotiques**. Nous pouvons donc penser que la formation d'un **complexe HSP70/aptamère**

peptidique (A8/A17) ou peptide (P17) puisse directement **empêcher le passage de HSP70** à la membrane des cellules cancéreuses, en séquestrant HSP70 dans le cytoplasme. Ce qui aurait comme conséquence directe, l'absence de HSP70 à la surface des exosomes. En effet, comme démontré dans l'article 2, lorsque HSP70 est neutralisée sur les exosomes, nous favorisons la réponse immunitaire antitumorale. Dans l'article 1, nous avons observé une **augmentation** significative de l'infiltration des **cellules immunitaires** dans les tumeurs traitées par les aptamères peptidiques ou P17 (Figure 7C, Table 2, suppl. Figure 4 et suppl. table 1). Plus précisément, nous trouvons une infiltration des lymphocytes T, des macrophages, des NK et des cellules dendritiques qui sont les cibles directes des MDSCs (Figure 11 dans l'introduction). Nous pouvons donc envisager que, dans nos conditions, les exosomes libérés par les cellules cancéreuses **traitées par A17 ou P17** ne présentent **plus HSP70 à la membrane**. De ce fait, les **MDSCs ne sont plus activées** et sont incapables d'inhiber les cellules immunitaires effectrices. Toutefois, pour valider cette hypothèse, il reste à mesurer l'expression membranaire de HSP70 sur les cellules cancéreuses et les exosomes tumoraux après traitement par les aptamères peptidiques (ou les dérivés peptidiques).

Par ailleurs, **A17** (et son dérivé P17) semble cibler spécifiquement la forme **intracellulaire** de HSP70, alors que **A8** (et son dérivé P8.1) apparaît plus spécifique de la forme **extracellulaire**. Le **co- traitement** par A8 (ou P8.1) et par A17 (ou P17) sous une forme vectorisé (afin de favoriser son entrée dans la cellule) semble prometteur. Nous espérons dans ce cas obtenir de meilleurs résultats sur la croissance tumorale.

iii. Effet synergique du co-traitement avec les inhibiteurs de HSP70 et le cisplatine

Par ses fonctions chaperons et anti-apoptotiques, HSP70 induit une résistance des cellules cancéreuses aux agents anticancéreux. Nous avons pu démontrer que **l'inhibition de HSP70** au niveau intracellulaire ou extracellulaire par les aptamères **potentialise** l'effet des **agents anticancéreux** comme le cisplatine. Lorsque les cellules cancéreuses sont soumises au co-traitement avec l'aptamère peptidique et le cisplatine, HSP70 est neutralisée et ne peut plus exercer ces fonctions protectrices, ce qui favorise l'effet pro-apoptotique du cisplatine. Par ailleurs, il a été démontré que les cellules exposées à des stimuli cytotoxiques tels que le cisplatine présentaient une augmentation de la fluidité membranaire (Rebillard et al., 2007). En effet, la membrane plasmique constitue la première barrière cellulaire que rencontrent les agents antinéoplasiques pour agir sur les cellules cancéreuses. Cette augmentation de **fluidité** membranaire par le cisplatine semble être **transitoire**, mais pourrait permettre de faciliter

l'**entrée** de molécules thérapeutiques comme nos aptamères peptidiques, dans la cellule cancéreuse, favorisant ainsi l'inhibition intracellulaire de HSP70 et donc l'effet cytotoxique du cisplatine. Enfin, **l'inhibition de HSP70** par les aptamères peptidiques pourrait **lever** la **résistance** des cellules cancéreuses aux agents anticancéreux, justifiant ainsi l'utilisation de ces inhibiteurs en **association** avec **les chimiothérapies** actuelles.

iv. Y a-t-il un avantage à combiner les inhibiteurs des HSPs ?

Nous avons découvert des inhibiteurs spécifiques de HSP70 avec des effets anticancéreux très intéressants. Comme présenté dans l'introduction, il a été démontré que **l'inhibition de HSP90** en clinique **augmentait** généralement l'expression de **HSP70** (Bottoni et al., 2009). HSP70 présente un rôle de survie dans un contexte pathologique beaucoup plus important que HSP90. De ce fait, HSP70 pourrait limiter les effets des inhibiteurs de HSP90. Il semble donc pertinent, à la vue de nos résultats, de tester la combinaison des inhibiteurs de HSP70 avec d'autres inhibiteurs de HSPs (HSP90, HSP27). Par ailleurs, il a été démontré que le cisplatine inhibe l'activité chaperon de HSP90 (Rosenhagen et al., 2003). En effet, HSP90 en présence du cisplatine ne serait plus capable de se dimériser pour réaliser son cycle chaperon conduisant à une augmentation de la dégradation de ses protéines clientes notamment des protéines oncogéniques (Bagatell & Whitesell, 2004; L. Xiao, Lu, & Ruden, 2006). Dans nos deux articles, nous avons utilisé *in vivo* le cisplatine en co-traitement avec les inhibiteurs de HSP70. Nous pouvons donc supposer en accord avec les études menées par le Pr Rosenhagen que le **co-traitement** avec les aptamères peptidiques et cisplatine permettrait **de bloquer** non seulement **HSP70**, mais aussi **HSP90**. Cependant, cette inhibition de HSP90 semble être non spécifique, il serait donc très intéressant d'entreprendre des expériences *in vitro*, puis *in vivo* pour tester l'effet du traitement combiné des aptamères peptidiques avec le 17-AAG (inhibiteur spécifique de HSP90) seul ou en présence d'agents chimiothérapeutiques. Ces **associations** permettraient **d'optimiser** la qualité des **traitements anticancéreux** en diminuant les concentrations des agents chimiothérapeutiques et donc leurs effets secondaires, tout en conservant une efficacité de traitement comparable, voir meilleure.

b. HSP70 un biomarqueur potentiel

Comme présenté dans l'introduction, HSP70 est présent sous 3 formes dans l'organisme: libre, sur les cellules tumorales circulantes et sur les exosomes Nous avons

démontré qu'il était possible de capturer les exosomes tumoraux par le biais de HSP70. Ainsi, il serait donc envisageable d'utiliser **HSP70** en tant que **biomarqueur** pour la biodétection dans le **cancer**. HSP70 comme biomarqueur, pourrait être essentielle dans le domaine de la cancérologie, à plusieurs niveaux : (i) pour la détection éventuellement précoce de la maladie permettant une meilleure, et plus rapide, prise en charge du patient (ii) pour le suivi de la maladie (évaluer l'efficacité des traitements et adapter la thérapie en fonction des résultats obtenus). Dans ce travail, nous avons montré qu'il était possible de **capturer les exosomes** tumoraux dérivés de lignées cancéreuses humaines à l'aide de **l'anticorps cmHSP70**, reconnaissant spécifiquement la forme extracellulaire de HSP70. Concernant les cellules tumorales humaines circulantes, j'ai pu participer dans le cadre d'un projet européen (SPEDOC) à l'élaboration d'une plateforme de détection extrêmement sensible pour isoler ces cellules circulantes. Le concept de ce projet, basé sur une **technique optique** dite de résonance de plasmons de surface (technologie utilisée par le Biacore), consiste à **analyser** quelques gouttes de **sang d'un patient**, dans des canaux de quelques microns de large (cellule de microfluidique). A l'intérieur de ces canaux sont déposées des nanostructures en or de quelques millimètres d'épaisseurs, recouvertes dans notre cas par **l'aptamère peptidique A8** capable d'interagir spécifiquement avec HSP70 extracellulaire. Ces nanostructures fonctionnalisées vont ainsi permettre de capturer les **cellules circulantes tumorales** exprimant HSP70 lors de leur passage. Nous espérons ainsi capturer les cellules tumorales de patients et corréler le nombre de ces cellules au stade de développement de la tumeur. A ce jour, nous avons obtenu des résultats encourageants. Il est intéressant de noter que dans le cadre de ce projet, nous utilisons **l'aptamère A8** non plus comme un outil thérapeutique mais comme **un outil de diagnostic**, élargissant ainsi l'intérêt porté sur nos aptamères peptidiques.

Conclusions et perspectives

La protéine de stress HSP70 joue un rôle majeur dans le développement de la tumeur ainsi que dans la résistance des cellules cancéreuses aux agents anti-cancéreux. De nombreuses investigations ont d'ailleurs été lancées en vue de générer des inhibiteurs de HSP70. Cependant, aucun de ces inhibiteurs semble vraiment spécifiques de cette HSP (Evans, Chang, & Gestwicki, 2010) et un seul inhibiteur est arrivé en phase d'essai clinique: la molécule MKT-077. Mon travail de thèse s'intègre ainsi parfaitement dans la détermination de nouveaux inhibiteurs spécifiques de HSP70.

Jusqu'à présent, la plupart des inhibiteurs de HSP70 développés étaient des molécules chimiques. Dans ce travail, nous avons eu une toute autre approche qui consistait à développer des inhibiteurs peptidiques: des aptamères peptidiques et leurs dérivés. Mon travail de thèse a permis d'identifier quatre inhibiteurs de HSP70 : A8, A17, P17 et P8.1. Ces inhibiteurs ont pour avantage de cibler différentes parties de HSP70, A17 ou P17 lient le ABD (ATP binding domain) alors que A8 ou P8.1 lient le PBD (peptide binding domain). Ce ciblage différentiel présente un atout non négligeable dans l'inhibition de HSP70 car il permettrait d'inhiber de façon préférentielle HSP70 sous sa forme intracellulaire ou extracellulaire (Figure 19). De plus, nous avons prouvé chez l'animal l'efficacité de ces aptamères peptidiques et leurs dérivés seuls ou en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques et confirmé l'importance d'un système immunitaire intègre et actif dans le traitement du cancer.

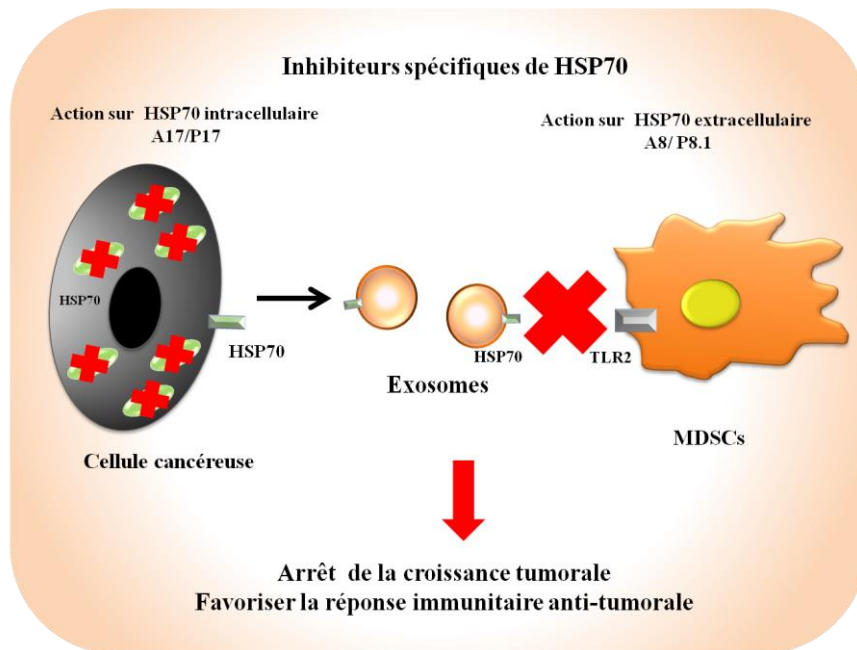


Figure 19 : Synthèse de mes travaux de thèse. Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence 4 inhibiteurs spécifiques de HSP70. A17 et P17 capable d'inhiber HSP70 intracellulaire et A8 et P8.1 inhibant préférentiellement HSP70 extracellulaire. Ces inhibiteurs ont pour effet de stopper la croissance tumorale et de favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale.

De nombreuses perspectives découlent de ce projet en vue de mesurer l'efficacité de ces aptamères et dérivés peptidiques en clinique. Tout d'abord, il est essentiel de poursuivre l'étude de la biodistribution de A17 en optimisant les conditions de radiomarquage de A17 afin de passer à l'étape d'imagerie chez le petit animal. Par ailleurs, les résultats obtenus avec A8 (et le dérivé peptidique P8.1) sont aussi très encourageants donc une étude de biodistribution sera également réalisée. Ensuite, dans le but d'améliorer la pénétration des aptamères peptidiques ou des peptides dans les cellules cancéreuses, nous devons entreprendre dans le cadre du projet Labex LipSTIC (Lipoprotéines et santé : prévention et traitement des maladies inflammatoires non vasculaires et du cancer), la vectorisation des inhibiteurs avec des molécules biocompatibles pour la clinique. Enfin, compte tenu des résultats cliniques encourageants obtenus avec les inhibiteurs de HSP90 et pour pallier aux effets secondaires observés (effets compensatoires sur HSP70), nous réaliserons des traitements combinant ces inhibiteurs de HSPs entre eux et/ou en association avec des agents anti-cancéreux.

Enfin, pour valoriser ce travail, il est essentiel de montrer la pertinence clinique de ces inhibiteurs de HSP70 et, tout d'abord, en démontrant la présence chez les patients cancéreux d'exosomes tumoraux exprimant HSP70 à leur membrane. Dans un premier temps, les

exosomes seront isolés chez des donneurs sains à partir d'échantillons de sang ou d'urine. L'urine a pour avantage d'être une méthode de prélèvement non invasive. Etant donné qu'il n'existe actuellement aucun protocole standard d'isolation des exosomes dans le sang ou dans l'urine, cette étude préalable nous permettra de déterminer les meilleures conditions d'échantillonnage (stockage, conditions de prélèvement). Cette phase a d'ailleurs déjà débutée et nos premiers résultats d'isolement des exosomes sont très encourageants (Figure 20). Dans un second temps, nous vérifierons par différentes techniques (microscopie électronique, cytométrie en flux, interférométrie (Octet)) que HSP70 est bien présente à la membrane des exosomes tumoraux. Une fois le protocole bien établi, nous commencerons par une étude prospective chez les patients atteints d'un cancer du sein triple négatif, en collaboration avec le CGFL de Dijon. En parallèle, des études corrélatives entre le taux d'expression de HSP70 sur les exosomes et le grade, stade et/ou évolution des tumeurs seront entreprises afin de déterminer si HSP70 peut servir de biomarqueur dans le cancer.

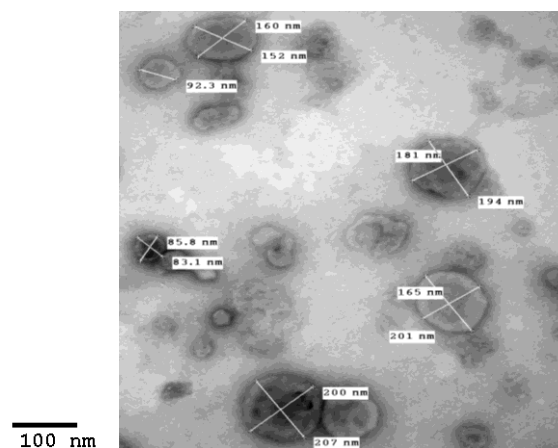


Figure 20 : Exosomes isolés de l'urine d'un donneur sain visualisés par microscopie électronique à transmission. Nous trouvons des exosomes en grande quantité dans l'urine humaine. Nous pouvons remarquer que ces derniers présentent une hétérogénéité de taille. La caractérisation des exosomes chez les patients cancéreux semble donc réalisable.

Pour conclure, mon travail de thèse, avec la découverte des peptides aptamères et leurs dérivés, a permis de mettre en évidence de nouveaux inhibiteurs spécifiques de HSP70. Les aptamères peptidiques et leurs dérivés sont ainsi de nouveaux outils thérapeutiques dans le cancer. Ils pourraient également servir d'outil de diagnostic dans le cancer. Cette double fonctionnalité de nos aptamères peptidiques, permet d'envisager l'utilisation de ces derniers dans le domaine de la théranostique qui consiste à coupler le diagnostic à la thérapie.

Annexes

Annexe 1 :

Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, Jego G, Wanherdrick K, Joly AL, Buhard O, **Gobbo J**, Penard-Lacronique V, Zouali H, Tubacher E, Kirzin S, Selves J, Milano G, Etienne-Grimaldi MC, Bengrine-Lefèvre L, Louvet C, Tournigand C, Lefèvre JH, Parc Y, Tiret E, Fléjou JF, Gaub MP, Garrido C, Duval **Nat Med.2011.**

Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis

Coralie Dorard^{1,2}, Aurélie de Thonel^{3,4}, Ada Collura^{1,2}, Laetitia Marisa⁵, Magali Svrcek^{1,2,6}, Anaïs Lagrange^{1,2}, Gaetan Jégo^{3,4}, Kristell Wanherdrick^{1,2}, Anne Laure Joly^{3,4}, Olivier Buhard^{1,2}, Jessica Gobbo^{3,4}, Virginie Penard-Lacronique⁷, Habib Zouali⁸, Emmanuel Tubacher⁸, Sylvain Kirzin⁹, Janick Selves⁹, Gérard Milano¹⁰, Marie-Christine Etienne-Grimaldi¹⁰, Leila Bengrine-Lefèvre¹¹, Christophe Louvet¹¹, Christophe Tournigand¹¹, Jérémie H Lefèvre^{2,12}, Yann Parc^{2,12}, Emmanuel Tiret^{2,12}, Jean-François Fléjou^{1,2,6,13}, Marie-Pierre Gaub¹⁴, Carmen Garrido^{3,4,15,16} & Alex Duval^{1,2,16}

Heat shock proteins (HSPs) are necessary for cancer cell survival. We identified a mutant of HSP110 (HSP110 Δ E9) in colorectal cancer showing microsatellite instability (MSI CRC), generated from an aberrantly spliced mRNA and lacking the HSP110 substrate-binding domain. This mutant was expressed at variable levels in almost all MSI CRC cell lines and primary tumors tested. HSP110 Δ E9 impaired both the normal cellular localization of HSP110 and its interaction with other HSPs, thus abrogating the chaperone activity and antiapoptotic function of HSP110 in a dominant-negative manner. HSP110 Δ E9 overexpression caused the sensitization of cells to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-fluorouracil, which are routinely prescribed in the adjuvant treatment of people with CRC. The survival and response to chemotherapy of subjects with MSI CRCs was associated with the tumor expression level of HSP110 Δ E9. HSP110 may thus constitute a major determinant for both prognosis and treatment response in CRC.

The human tumor phenotype referred to as MSI arises because of defects in the DNA mismatch repair (MMR) system^{1–3}. MSI was first observed in inherited tumors associated with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and later in sporadic colon, gastric and endometrial cancers (for a review, see ref. 4). The normal function of the MMR system is to recognize and repair the errors that arise during DNA replication, as well as to repair some forms of DNA damage. It is now well established that MMR deficiency is not in itself a direct transforming event and that MSI tumors develop through a distinctive molecular pathway characterized by the genetic instability of numerous microsatellite repeat sequences throughout the genome⁴. Most oncogenic alterations found in MSI tumors are thus somatic mutational events that affect coding repeated sequences. The majority of published articles on the mechanisms underlying MSI carcinogenesis have involved the study of CRC. These revealed that MSI CRCs is a distinctive group from the major tumor type called chromosomal

instability (CIN) or microsatellite stable (MSS) (for review, see ref. 5). In addition to the genetic instability in coding repeats, MSI tumor cells accumulate hundreds of alterations in noncoding microsatellite repeats throughout the genome⁶, but the functional consequences of these mutations have yet to be thoroughly investigated.

Although MSI cancers are considered to represent a distinct tumor entity, there is still no specific therapeutic approach that takes into account the unique mode of cell transformation seen within these tumors. MSI CRCs have been consistently reported to show an improved prognosis and a different response to chemotherapeutic agents^{7,8}. The reasons underlying these clinical observations are still poorly understood. Here we identified HSP110 as a target gene for mutation in MSI CRCs. HSP110 is a conserved and abundant molecular chaperone whose expression is induced by a specific set of stress conditions. HSP110 accumulates abnormally in cancer cells, and this is believed to enhance

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe 'Instabilité des Microsatellites et Cancers', Paris, France. ²Université Pierre et Marie Curie Paris, Paris, France. ³INSERM, Dijon, France. ⁴University of Burgundy, Dijon, France. ⁵Programme 'Cartes d'Identité des Tumeurs', Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France. ⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France. ⁷INSERM, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁸Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Fondation Jean Dausset, Institut de Génétique Moléculaire, Paris, France. ⁹INSERM, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France. ¹⁰Laboratoire d'Oncopharmacologie, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France. ¹¹Service d'Oncologie Médicale, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France. ¹²AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. ¹³AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Tumorothèque Cancer Est, Paris, France. ¹⁴INSERM, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, Strasbourg, France. ¹⁵Centre Hospitalier Universitaire Dijon, Dijon, France. ¹⁶These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to A.D. (alex.duval@inserm.fr) or C.G. (cgarrido@u-bourgogne.fr).

Received 23 February; accepted 1 August; published online 25 September 2011; doi:10.1038/nm.2457

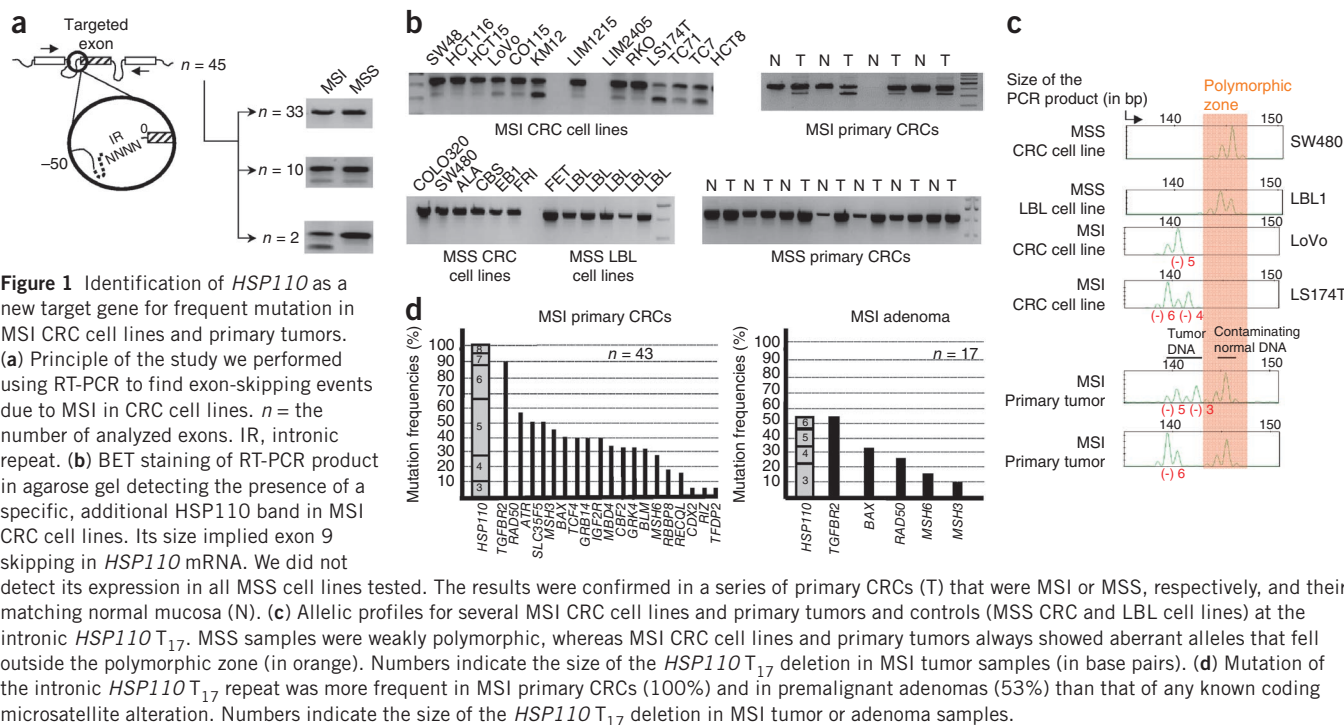


Figure 1 Identification of *HSP110* as a new target gene for frequent mutation in MSI CRC cell lines and primary tumors. **(a)** Principle of the study we performed using RT-PCR to find exon-skipping events due to MSI in CRC cell lines. n = the number of analyzed exons. IR, intronic repeat. **(b)** BET staining of RT-PCR product in agarose gel detecting the presence of a specific, additional *HSP110* band in MSI CRC cell lines. Its size implied exon 9 skipping in *HSP110* mRNA. We did not detect its expression in all MSS cell lines tested. The results were confirmed in a series of primary CRCs (T) that were MSI or MSS, respectively, and their matching normal mucosa (N). **(c)** Allelic profiles for several MSI CRC cell lines and primary tumors and controls (MSS CRC and LBL cell lines) at the intronic *HSP110* T_{17} . MSS samples were weakly polymorphic, whereas MSI CRC cell lines and primary tumors always showed aberrant alleles that fell outside the polymorphic zone (in orange). Numbers indicate the size of the *HSP110* T_{17} deletion in MSI tumor samples (in base pairs). **(d)** Mutation of the intronic *HSP110* T_{17} repeat was more frequent in MSI primary CRCs (100%) and in premalignant adenomas (53%) than that of any known coding microsatellite alteration. Numbers indicate the size of the *HSP110* T_{17} deletion in MSI tumor or adenoma samples.

their survival^{9–12}. It is strongly expressed in colon cancer cells¹³, and gene expression profile analysis of primary CRC has linked *HSP110* expression with metastasis and poor prognosis¹⁴.

We show in this work that a T_{17} mononucleotide repeat located in intron 8 of *HSP110* was systematically mutated in MSI CRC cell lines and primary tumors. The shortening of this repeat in tumor DNA correlated with increased synthesis of an aberrant *HSP110* transcript due to exon 9 skipping, to the detriment of wild-type *HSP110* mRNA. The mutant transcript encoded a truncated isoform of *HSP110*, referred to as *HSP110* Δ E9. The overexpression of *HSP110* Δ E9 in CRC cells severely affected the function of *HSP110* chaperone in a dose-dependent manner. *HSP110* Δ E9 expression also increased the sensitivity to anti-cancer agents such as oxaliplatin and 5-fluorouracil (5-FU), which are routinely prescribed in the adjuvant treatment of CRC patients. In agreement with these *in vitro* findings, the survival of people with MSI CRC was associated with the tumor expression level of *HSP110* Δ E9.

RESULTS

HSP110 T_{17} intronic DNA microsatellite mutations in MSI CRC

To find new mutations with a putative role in MSI-driven carcinogenesis, we analyzed the expression pattern of 45 candidate exons located downstream of an intron containing a mononucleotide repeat sequence of at least eight nucleotides in the vicinity of the splice acceptor site (Supplementary Table 1 and Fig. 1a). The search was undertaken by nonquantitative RT-PCR using a set of human MSI and MSS CRC cell lines ($n = 20$; 13 MSI, 7 MSS). A total of 43 exons were found to have the same expression pattern in MSI and MSS cancer cell lines (Fig. 1a). In the remaining two cases (*MRE11* (current symbol *MRE11A*) and *HSP110*), the presence of an additional PCR product was only detectable in MSI CRC cell lines. This was due to exon 5 skipping in *MRE11* (data not shown), as reported elsewhere⁶, and exon 9 skipping in *HSP110* (Fig. 1b and data not shown). We found the presence of this additional *HSP110* RT-PCR product to be specific to MSI primary colorectal tumor samples

(Fig. 1b). We did not detect it in a series of nontumor human cell lines used as additional MMR-proficient controls (lymphoblastoid cell lines, LBLs; $n = 20$) (Fig. 1b). Among subjects with primary MSI CRC, amplification of the additional RT-PCR product was restricted to MSI tumor tissues and was never observed in matching normal mucosal samples (Fig. 1b).

Next, we determined the mutational status of the *HSP110* T_{17} DNA repeat located upstream and near the splice acceptor site in intron 8 (Supplementary Fig. 1). Allelic profiles of this noncoding repeat were analyzed using fluorescence genotyping in our panel of MSI and MSS CRC cell lines and primary tumors, as well as in control LBLs to assess its polymorphic status (Supplementary Table 2). Overall, we found that this sequence was weakly polymorphic in MMR-proficient samples (Fig. 1c), whereas it was systematically mutated in 13 of 13 (100%) MSI CRC cell lines and in 43 of 43 (100%) MSI CRC primary tumors. The allelic deletions ranged from three to eight base pairs beyond the polymorphic zone (Fig. 1c and Supplementary Table 2). The mutation frequency of *HSP110* T_{17} was higher than that of all coding microsatellite targets reported to date in MSI primary CRC (Fig. 1d). We also detected this mutation in 9 of 17 (53%) adenomas with MSI, although with smaller allelic deletions than observed for MSI primary CRCs (Fig. 1d).

Overexpression of *HSP110* mRNA lacking exon 9 in MSI CRC

We first confirmed by quantitative RT-PCR that the two *HSP110* PCR products observed in MSI cancer cell lines corresponded to *HSP110* alternative mRNAs that contained or lacked exon 9 (Fig. 2a). We quantified both *HSP110* mRNA containing (*HSP110*wt) or lacking exon 9 (*HSP110* Δ E9) in a competitive manner (Supplementary Table 2). We observed that *HSP110* Δ E9 mRNA was weakly expressed in MSS CRC cell lines (below 5–10% of *HSP110*wt mRNA; Fig. 2b). In contrast, *HSP110* Δ E9 mRNA expression was higher in MSI CRC cell lines and was significantly different between MSI ($n = 43$) and MSS ($n = 20$) primary CRCs ($P = 8.5 \times 10^{-5}$; Fig. 2b and Supplementary Table 2).

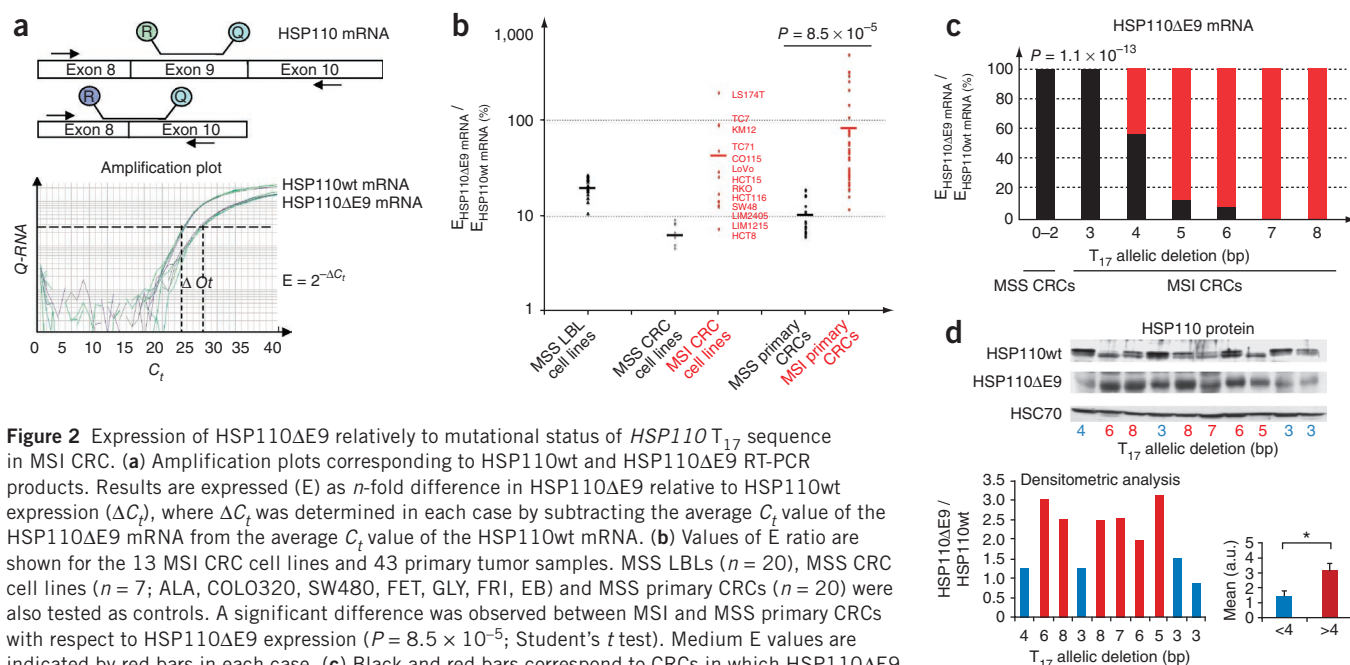


Figure 2 Expression of HSP110ΔE9 relative to mutational status of *HSP110* T_{17} sequence in MSI CRC. **(a)** Amplification plots corresponding to HSP110wt and HSP110ΔE9 RT-PCR products. Results are expressed (E) as n -fold difference in HSP110ΔE9 relative to HSP110wt expression (ΔC_t), where ΔC_t was determined in each case by subtracting the average C_t value of the HSP110ΔE9 mRNA from the average C_t value of the HSP110wt mRNA. **(b)** Values of E ratio are shown for the 13 MSI CRC cell lines and 43 primary tumor samples. MSS LBLs ($n = 20$), MSS CRC cell lines ($n = 7$; ALA, COLO320, SW480, FET, GLY, FRI, EB) and MSS primary CRCs ($n = 20$) were also tested as controls. A significant difference was observed between MSI and MSS primary CRCs with respect to HSP110ΔE9 expression ($P = 8.5 \times 10^{-5}$; Student's t test). Medium E values are indicated by red bars in each case. **(c)** Black and red bars correspond to CRCs in which HSP110ΔE9 mRNA expression was low or high, respectively (below or above the median value calculated in our tumor series; see also **Supplementary Table 2**). The size of the T_{17} deletion was significantly different between these two groups of tumors ($P = 1.1 \times 10^{-13}$; Student's t test). **(d)** Two different HSP110 antibodies (Abs) were used in western blots—one recognizing the C-terminal part of the protein and detecting the α and β HSP110 isoforms (upper blot) and the other targeting the N-terminal part and detecting HSP110ΔE9 (this Ab detects HSP110βE9 only weakly). Error bars correspond to the s.d. of measured densitometric values. $*P < 0.05$. a.u., arbitrary units.

We next investigated whether mutation of the *HSP110* T_{17} intronic DNA repeat might influence the expression of HSP110 in our series of primary CRCs. We found that the length of T_{17} deletion was associated with significantly increased expression of HSP110ΔE9 mRNA, to the detriment of the HSP110wt transcript (**Fig. 2c**; $P = 1.1 \times 10^{-13}$). HSP110ΔE9 mRNA was generally expressed at low levels in MSI tumors showing small T_{17} deletions (3 or 4 bp; **Fig. 2c**), or in MSS tumors that were not mutated. In contrast, it was highly expressed in MSI tumors with larger T_{17} deletions (from 5 to 8 bp; **Fig. 2c**). We confirmed these results at the protein level using western blotting in 10 MSI primary CRCs that showed variable allelic shifts in the T_{17} repeat (**Fig. 2d**; $P < 0.05$). We concluded that mutation of the *HSP110* intronic T_{17} microsatellite was probably the causative event leading to aberrant expression of this chaperone in colorectal tumors.

Altered HSP110ΔE9 chaperone sensitizes cancer cells to die

The skipping of HSP110 exon 9 causes a frameshift that leads to the generation of a premature termination codon in exon 10 of HSP110ΔE9 mRNA (**Supplementary Fig. 1**). HSP110ΔE9 is a truncated protein that contains the N-terminal ATP-binding domain but is devoid of the substrate-binding domain (**Supplementary Fig. 1**). We used several functional assays to understand the role of HSP110ΔE9. We first studied its chaperone activity using a protein thermostability assay that measures the *in vitro* ability of HSP110 to block protein aggregation induced by a heat shock. Although HSP110wt showed antiaggregation activity comparable to other HSPs such as HSP70, HSP110ΔE9 did not demonstrate this chaperone activity (**Fig. 3a**). Interestingly, this effect was dominant negative, because the antiaggregation activity of HSP110wt was abrogated if HSP110ΔE9 was added (**Fig. 3a**). HSP110 has been shown to associate with other chaperones such as HSP70, and this contributes to the overall cell chaperone network. We confirmed here in HCT116 cells that HSP110wt efficiently

interacted with HSP70 and with HSP27, but not with HSP90 (**Fig. 3b**). In contrast, HSP110ΔE9 lost the ability to associate with HSP70 and HSP27 (**Fig. 3b**) but associated strongly with HSP110wt, in line with its dominant-negative effect (**Fig. 3c**). Finally, HSP110ΔE9 showed an altered cellular localization compared to HSP110wt. Although we found the latter both in the nucleus and cytosol, HSP110ΔE9 was restricted to the cytosol (**Fig. 3d**). Further, HSP110ΔE9 was able to block HSP110 translocation into the nucleus (**Fig. 3e**).

In a xenograft mouse model, HSP110ΔE9 expression significantly decreased the tumorigenicity of HCT116 cells (**Fig. 4a**). Because the role of HSPs including HSP110 in cancer has been linked to their antiapoptotic properties, we investigated the effect on apoptosis of the HSP110 truncation. HCT116, LoVo (MSI) and SW480 (MSS) cells were transfected with HSP110wt or HSP110ΔE9, and apoptosis was triggered using TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). As expected, TRAIL induced dose-dependent apoptosis and HSP110wt exerted a protective effect, as demonstrated by the appearance of well-known apoptotic markers including caspase 8 cleavage, caspase 3 activity, cleavage of the caspase 3 target PARP, mitochondrial membrane permeation and nuclear condensation (**Fig. 4b–d** and **Supplementary Fig. 2**). In contrast, HSP110ΔE9 not only lacked the protective properties of HSP110wt but was also able to block its antiapoptotic function in a dose-dependent manner (**Fig. 4c–e**). Probably as a consequence, the overexpression of HSP110ΔE9 in various CRC cell lines (both MSI and MSS) increased their sensitivity to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-FU, two drugs commonly used in the adjuvant treatment of CRC patients (**Fig. 4f**, **Supplementary Fig. 3** and data not shown).

HSP110ΔE9 affects survival and response to chemotherapy

We next investigated the possible clinical relevance of HSP110ΔE9 by evaluating the expression of HSP110ΔE9 mRNA relative to HSP110wt

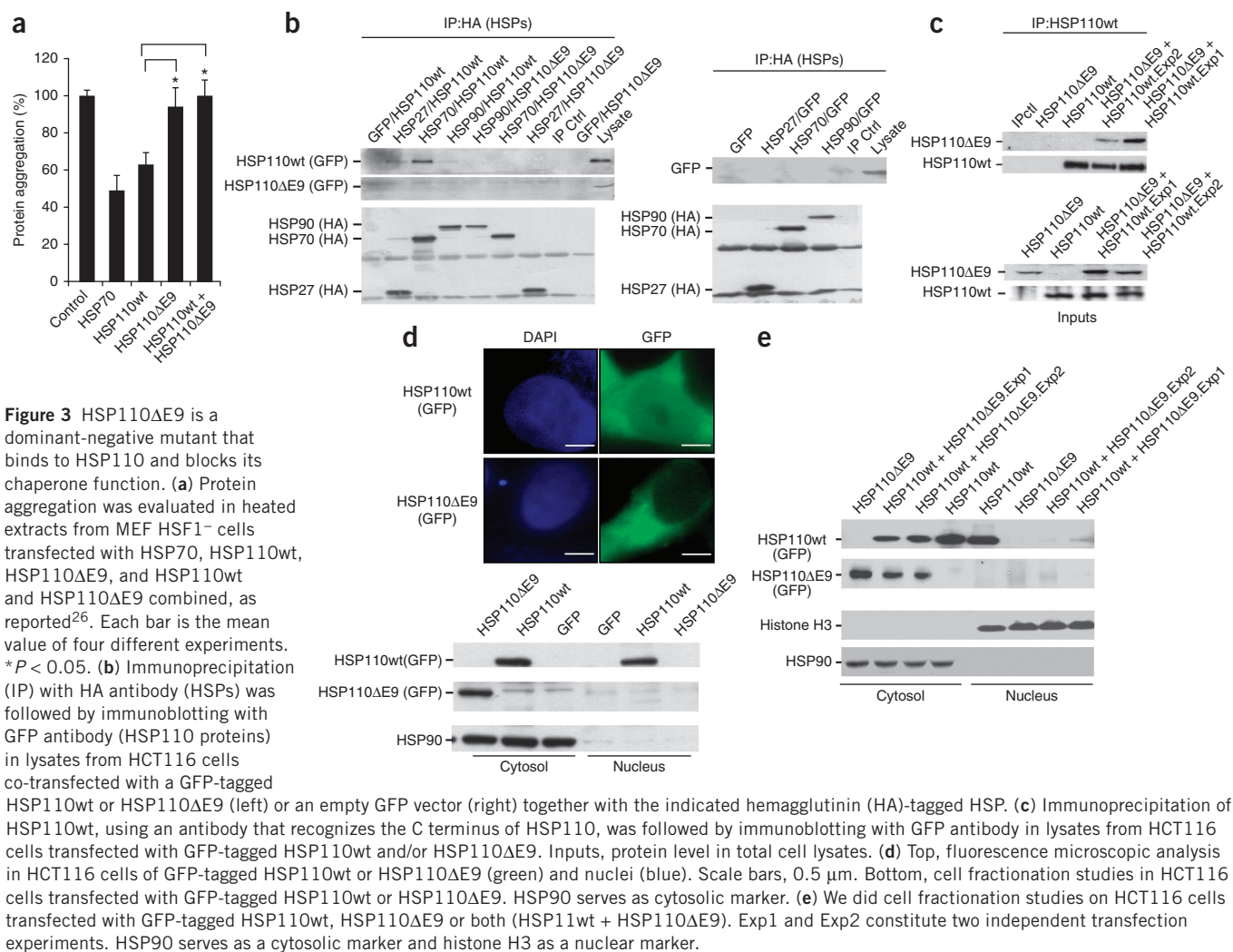


Figure 3 HSP110ΔE9 is a dominant-negative mutant that binds to HSP110 and blocks its chaperone function. **(a)** Protein aggregation was evaluated in heated extracts from MEF HSF1⁻ cells transfected with HSP70, HSP110wt, HSP110ΔE9, and HSP110wt and HSP110ΔE9 combined, as reported²⁶. Each bar is the mean value of four different experiments. **P* < 0.05. **(b)** Immunoprecipitation (IP) with HA antibody (HSPs) was followed by immunoblotting with GFP antibody (HSP110 proteins) in lysates from HCT116 cells co-transfected with a GFP-tagged HSP110wt or HSP110ΔE9 (left) or an empty GFP vector (right) together with the indicated hemagglutinin (HA)-tagged HSP. **(c)** Immunoprecipitation of HSP110wt, using an antibody that recognizes the C terminus of HSP110, was followed by immunoblotting with GFP antibody in lysates from HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt and/or HSP110ΔE9. Inputs, protein level in total cell lysates. **(d)** Top, fluorescence microscopic analysis in HCT116 cells of GFP-tagged HSP110wt or HSP110ΔE9 (green) and nuclei (blue). Scale bars, 0.5 μm. Bottom, cell fractionation studies in HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt or HSP110ΔE9. HSP90 serves as cytosolic marker. **(e)** We did cell fractionation studies on HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt, HSP110ΔE9 or both (HSP11wt + HSP110ΔE9). Exp1 and Exp2 constitute two independent transfection experiments. HSP90 serves as a cytosolic marker and histone H3 as a nuclear marker.

transcript in stage 2 and stage 3 MSI primary CRCs. This was done in an initial retrospective series of subjects ($n = 30$; 20 stage 2 and 10 stage 3; **Supplementary Table 3**) who underwent curative surgical resection of histologically proven MMR-deficient CRC for whom clinical data and appropriate tissue material was available. Stage 2 and stage 3 tumors were stratified into two groups according to their level of HSP110ΔE9 expression (i.e., MSI-HSP110ΔE9^{high} and MSI-HSP110ΔE9^{low} tumors). Our *in vitro* results described above showed a clear sensitization of cancer cells to anticancer agents such as oxaliplatin and 5-FU when the HSP110ΔE9/HSP110wt protein ratio increased (**Supplementary Fig. 4**). Using a HSP110ΔE9/HSP110wt mRNA ratio of 75%, MSI-HSP110ΔE9^{high} subjects showed disease-free survival (DFS) and response to chemotherapy that differed from those of MSI-HSP110ΔE9^{low} subjects. The difference in DFS approached significance for persons with stage 3 MSI CRC and for people who received adjuvant chemotherapy but not for those with stage 2 MSI CRC (**Supplementary Fig. 5**).

To validate the above clinical findings, we did similar analysis on an independent series of subjects with MSI CRC ($n = 54$; 30 stage 2 and 24 stage 3; **Supplementary Table 3**). Here again, a closely related HSP110ΔE9/HSP110wt mRNA ratio (50%) revealed the clinical impact of the HSP110 mutant on survival and response to chemotherapy. This impact was substantial for persons with stage 3 CRC

and for people who received adjuvant chemotherapy (**Supplementary Fig. 5**). The two subject series were combined to obtain greater statistical power. However, significant results were also obtained for subjects with stage 3 MSI CRC when the cutoff point corresponding to 75% was used for both series, after necessary normalization of the HSP110ΔE9/HSP110wt ratio for the two series ($P = 0.042$, $N_{\text{HSP110}\Delta\text{E9}^{\text{high}}} = 7$, $N_{\text{HSP110}\Delta\text{E9}^{\text{low}}} = 18$; data not shown). In the overall series, the survival and response to chemotherapy of persons with stage 3 MSI CRC were confirmed in univariate analyses to be associated with the tumor expression level of HSP110ΔE9 (**Fig. 5** and **Table 1**). In multivariate analysis, HSP110ΔE9 was found to be an independent predictor of outcome in persons with MSI CRC (**Table 1** and **Supplementary Table 4**).

DISCUSSION

Like other stress-inducible HSPs, HSP110 protects the cell against adverse conditions. HSP110 also provides specific crucial functions, as *hsp110* gene knockout in both yeast and *Drosophila* is lethal¹⁵. Two different isoforms of HSP110 have been described, HSP110a and HSP110b, but their different functions in the cell, if any, are unknown. HSP110b results from alternative splicing of exon 12 and lacks 43 amino acids from the C-terminal part of HSP110a. Notably, HSP110a and HSP110b isoforms are irrelevant to generation of the truncated

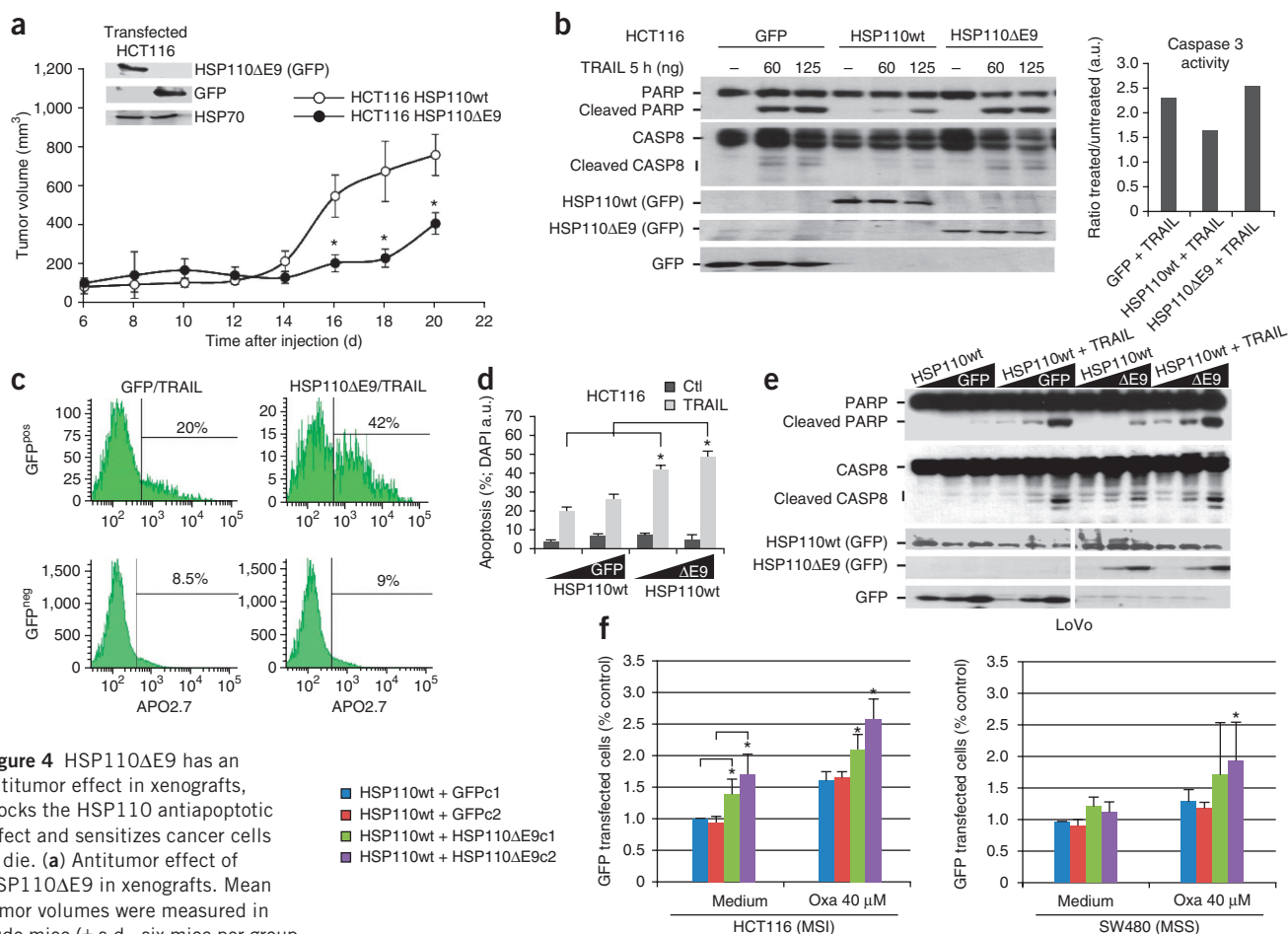


Figure 4 HSP110 Δ E9 has an antitumor effect in xenografts, blocks the HSP110 antiapoptotic effect and sensitizes cancer cells to die. (a) Antitumor effect of HSP110 Δ E9 in xenografts. Mean tumor volumes were measured in nude mice (\pm s.d., six mice per group).

* $P < 0.05$) injected with HCT116 cells transfected either with a GFP vector (open circles) or GFP-tagged HSP110 Δ E9 (filled circles). Inset, expression of the transfected proteins. HSP70 serves as a loading control. (b) Apoptosis was measured by immunodetection of caspase 8 (CASP8) and PARP cleavage (left), or by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of caspase 3 activity (right), in HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt, HSP110 Δ E9 or an empty vector (GFP) and treated with recombinant TRAIL ligand. (c) FACS analysis of apoptosis in GFP-positive (GFP^{pos}, transfected with a GFP-empty vector or HSP110 Δ E9) and GFP-negative (GFP^{neg}, non transfected) HCT116 cells treated with TRAIL. (d) The percentage of apoptosis (chromatin condensation) induced by TRAIL was determined in HCT116 cells transfected with GFP-tagged HSP110wt and increased doses of HSP110 Δ E9 or an empty vector (GFP). (e) Immunoblot of caspase 8 (CASP8) and PARP cleavage in LoVo cells transfected as described in c and treated, when indicated, with TRAIL ligand. (f) HCT116 (MSI) or SW480 (MSS) cells transfected with HSP110wt (1.5 μ g) were co-transfected with two different doses (c1, 0.5 μ g and c2, 1 μ g) of either GFP-empty vector or HSP110 Δ E9. After treatment with oxaliplatin (Oxa, 40 μ M, 48 h), apoptosis was assessed by FACS analysis as in b. * $P < 0.05$. a.u., arbitrary units.

HSP110 Δ E9 form identified here due to exon 9 skipping. HSP110 not only acts as a nucleotide exchange factor for HSP70 (ref. 16) but also possesses chaperone antiaggregation activity. It is approximately fourfold more efficient at binding and stabilizing denatured protein substrates compared to HSC70 and HSP70 (ref. 17). Because of its strong chaperone function, HSP110 is a very good antigen carrier and is therefore used as an extracellular protein in vaccine formulation^{18,19}. HSP110 chaperone activity is independent of ATP but requires the substrate-binding domain of the protein. HSP110 Δ E9 lacks the substrate-binding domain. As a consequence, it has lost its HSP110 antiaggregation chaperone function and is unable to bind HSP70, thereby also losing its function as a nucleotide exchange factor for HSP70 proteins.

A possible explanation for HSP110 overexpression in CRC cells¹³ is that they must extensively rewire their metabolic and signal transduction pathways, thereby becoming dependent on proteins that are dispensable for the survival of normal cells. The tumorigenic properties of HSP110, although not fully understood, may in

part be explained by its antiapoptotic properties^{20,21}. Overexpression of HSP110 has been shown to protect against apoptotic cell death in different cellular models including colon cancer. Inversely, small interfering RNA-mediated depletion of HSP110 induces apoptosis in HCT116 cells¹⁰. Interestingly, we showed in this work that a similar induction of apoptosis in HCT116 cells was achieved by overexpression of the mutant HSP110 Δ E9. We found that significant expression of HSP110 Δ E9 was restricted to colon cancer cells with MSI, thus disadvantaging their survival. Indeed, HSP110 Δ E9 has not only lost the normal HSP110 antiapoptotic properties but also associates with HSP110 to block these protective functions in a dose-dependent manner. Further, when overexpressed in both MSI and MSS CRC cells, HSP110 Δ E9 sensitizes these cells to apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. It is worth noting that these proapoptotic effects are optimized when HSP110 Δ E9 expression is similar to or higher than that of HSP110wt. This probably occurs because each molecule of HSP110 Δ E9 forms a complex with one molecule of HSP110wt, thus neutralizing its function.

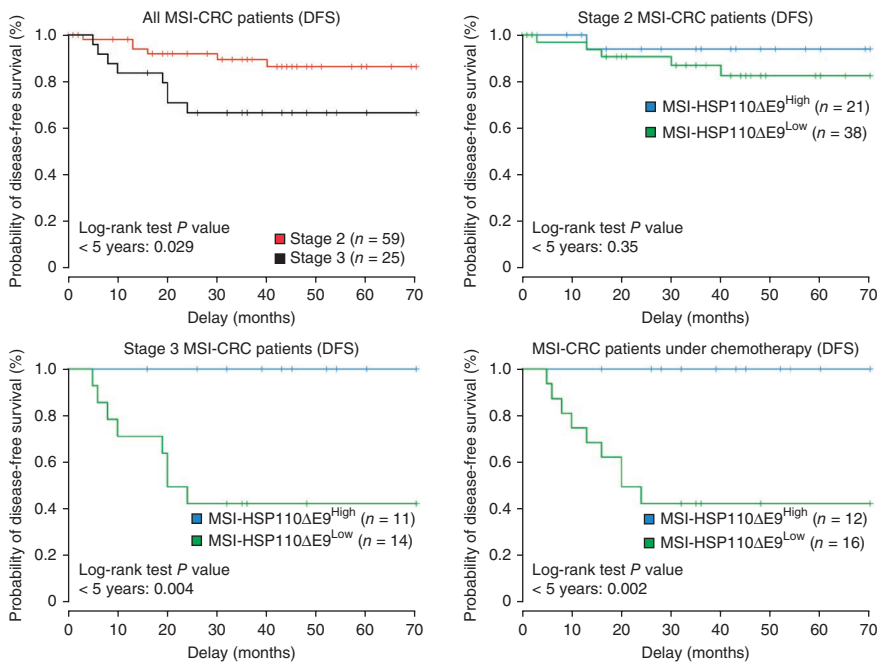


Figure 5 Clinical impact of HSP110ΔE9 expression in people with MSI CRC. Kaplan-Meier univariate analyses of disease-free survival (DFS) in persons with stage 2 or stage 3 MSI CRC are shown according to their HSP110ΔE9 expression. For statistical analyses, only the first 5 years are shown. Subjects from both series were combined using series-specific cutoff points to define HSP110ΔE9 expression classes (75% and 50% for first and second series, respectively).

and dose-dependent proapoptotic effect of HSP110ΔE9 in CRC cells, the 'protective' clinical effect of HSP110ΔE9 is also expected to be progressive and dose dependent, so that the choice of a cutoff point, whatever its threshold, is somewhat artificial. Under these conditions, subjects with MSI-HSP110ΔE9^{high} stage 3 CRC showed excellent survival and response to chemotherapy. This was not observed for subjects with stage 2 MSI CRC, however, presumably because of the low frequency of disease recurrence in this group.

It is unclear why there is selection of the HSP110ΔE9 dominant-negative and proapoptotic mutant in MSI CRCs. A possible explanation is that long, noncoding mononucleotide repeats such as the T₁₇ located in *HSP110* intron 8 are often hot spots for mutations in MSI tumors due to the MMR deficiency^{22,23}. Whereas most of these microsatellites are functionally anonymous, a few are endowed with biological activity. Even though they result in a tumor suppressor effect, frequent mutation of these sequences can occur, as shown in the current work, thus representing the Achilles' heel of the MSI-driven tumorigenic process. Mutation of *HSP110* T₁₇ is detected in 53% of MSI adenomas—a frequency that is comparable to mutation to *TGFBR2* and is an early event in the MSI-driven pathway to cancer²⁴. Nevertheless, these alterations frequently consist of small allelic deletions that may have little effect on HSP110ΔE9 expression in these premalignant tumors. In contrast, all MSI tumors were mutated at T₁₇ and showed accumulation of HSP110ΔE9 at variable levels. Although *HSP110* T₁₇ mutation is an early event, it may therefore impact upon HSP110 function in only a few adenomas. Our hypothesis is that it acts as an anticancer event at a later stage in the progression of MSI colorectal tumors. Those with high expression of HSP110ΔE9 mRNA represent about 30–40% of all subjects with MSI colon tumors. The closely related HSP110ΔE9/HSP110wt mRNA ratios of 75% and 50% were chosen in the two independent series we analyzed, as they maximized the difference in survival between subjects with MSI-HSP110ΔE9^{high} and MSI-HSP110ΔE9^{low}. In line with our *in vitro* transient experiments that showed a progressive

Overall, our results are suggestive of clinical heterogeneity in people with MSI CRC due to a dose-dependent effect of tumor HSP110ΔE9 expression. Because this mutant protein is expressed at variable levels in almost all MSI CRCs, it is likely to constitute a crucial determinant

Table 1 Association of clinical and molecular annotations to outcome (disease-free survival) of MSI CRC patients in univariate and multivariate Cox analyses

Annotation	Value	Univariate			Multivariate		
		H.R.	95% C.I.	<i>P</i> value	H.R.	95% C.I.	<i>P</i> value
Expression HSP110ΔE9/HSP110	Low	8.9	1.2–68	0.035	11.3	1.5–87	0.020
TNM stage	TNM 3	3.1	1.1–8.9	0.038	4.0	1.4–12	0.011
Age	≥70	2.8	0.95–8.4	0.063			
Age at diagnosis	–	1	1–1.1	0.073			
Gender	M	1.2	0.42–3.5	0.71			
Tumor location	Right colon	1.3	0.17–10	0.78			
HNPCC	Yes	0.91	0.31–2.7	0.87			
CIMP	Positive	0.44	0.062–3.1	0.41			
CIN	High	4.2 × 10 ⁻⁹	0–Inf	0.32			
<i>KRAS</i> gene mutation status	Wild type	0.24	0.033–1.7	0.16			
<i>BRAF</i> gene mutation status	Wild type	1.5	0.15–14	0.73			
<i>GRB14</i> gene mutation status	Wild type	0.17	0.019–1.5	0.11			
<i>RAD50</i> gene mutation status	Wild Type	5.3	0.59–48	0.14			
<i>BAX</i> gene mutation status	Wild type	3.8	0.42–34	0.23			
<i>TCF4</i> gene mutation status	Wild type	2.5	0.28–22	0.42			
<i>IGF2R</i> gene mutation status	Wild type	0.78	0.13–4.7	0.78			
<i>CACNA1G</i> methylation status	Unmethylated	2.8	0.39–20	0.31			
<i>NEUROG1</i> methylation status	Unmethylated	2.8	0.39–20	0.31			
<i>RASSF1</i> methylation status	Unmethylated	2.3E+08	0–Inf	0.39			
<i>p16</i> methylation status	Unmethylated	0.55	0.078–3.9	0.56			
<i>SOCS1</i> methylation status	Unmethylated	0.6	0.063–5.8	0.66			
<i>RUNX3</i> methylation status	Unmethylated	0.65	0.092–4.7	0.67			
<i>IGF2</i> methylation status	Unmethylated	1.2	0.17–8.7	0.84			
<i>MGMT</i> methylation status	Unmethylated	0.9	0.15–5.4	0.91			
<i>MLH1</i> methylation status	Unmethylated	0.91	0.15–5.4	0.92			
<i>p14</i> ARF methylation status	Unmethylated	0.9	0.093–8.7	0.93			

CIMP, CpG island methylator phenotype; CIN, chromosomal instability; HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer; H.R., Cox hazard ratio; 95% C.I., 95% confidence interval of H.R. value; modality of the annotation associated to H.R. Multivariate analysis includes only variables that are significant in the univariate analysis (*P* value < 0.05). Shaded boxes indicate significant results (*P* < 0.05).

of prognosis and treatment response in these tumors. We defined a subgroup of subjects with MSI-HSP110ΔE9^{high} that represented approximately one third of all subjects with MSI CRC and who showed excellent survival and response to chemotherapy. A key question will be to determine whether distinct therapeutic protocols could be proposed for persons with MSI CRC showing high or low expression of HSP110ΔE9. In our cohort it was not possible to look separately at those who received 5-FU alone, as most subjects received a combination therapy. Because subjects with MSI-HSP110ΔE9^{high} represent only a small fraction of persons with MSI CRC, these data do not contradict previous results demonstrating that, overall, subjects with MMR-deficient CRC have a worse response to 5-FU than those with MMR-proficient CRC. They are suggestive of clinical heterogeneity in the group of people with MSI regarding response to this drug. We anticipate that HSP110ΔE9 should also show aberrant expression in MSI cancers from other primary locations such as stomach, endometrium and other more recently reported sites²⁵. The targeting of HSPs has also emerged as an interesting sensitization strategy in cancer therapy. Different inhibitors of HSP90, HSP27 and HSP70 (ref. 26) are currently being evaluated in persons with cancer, with some already in phase 2 or 3 clinical trials²⁷. Interestingly, the present work is the first report to our knowledge of an HSP inhibitor that is produced endogenously by the cell. In the future, designing small peptides that mimic the sensitizing function of HSP110ΔE9 and could therefore be readily adapted to improve the treatment of both MSI and MSS tumors may constitute viable therapeutic strategies.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Medicine website.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Carte d'Identité des Tumeurs (CIT) program (<http://cit.ligue-cancer.net/>) from the Ligue Nationale Contre le Cancer and by grants from the Fondation de France (Ref. RAF08005DDA to A.D.), the Institut National du Cancer (INCa) (to A.D. and C.G.), the Conseil Régional de Bourgogne (to C.G.) and the European Commission Seventh Framework Programme (SPEDOC 248835 to C.G.). C.G.'s group is known as 'La Ligue Contre le Cancer'. A.C. is a recipient of an INCa fellowship. We thank B. Iacopetta for critical reading of the manuscript. We thank E. Roux, A. Hamman, E. Fourmaux and E. Bergman for their technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.D. carried out analyses of aberrant splicing events due to MSI in CRC and genetic study of HSP110 in CRC cells and primary tumors. A.d.T. carried out analyses of wild-type and mutated HSP110 chaperone functions in CRC cells. A.C., M.S., A.L., K.W. and O.B. assisted with the mutational screening of primary CRC. J.G. (with G.J. and A.L.J.) carried out mouse work. L.M. carried out the clinical study and survival analyses. H.Z. and E. Tubacher assisted with the *in silico* search of candidate genes containing intronic microsatellite sequences. V.P.-L., S.K., J.S., G.M., M.-C.E.-G., L.B.-L., C.L., C.T., J.H.L., Y.P., E. Turet, J.-F.F. and M.-P.G. provided CRC samples and clinical data. A.D. and C.G. conceived the project, coordinated and directed the study, and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Thibodeau, S.N., Bren, G. & Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**, 816–819 (1993).
2. Aaltonen, L.A. *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* **260**, 812–816 (1993).
3. Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for clonal carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–561 (1993).
4. Duval, A. & Hamelin, R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* **62**, 2447–2454 (2002).
5. Walther, A., Houlston, R. & Tomlinson, I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* **57**, 941–950 (2008).
6. Giannini, G. *et al.* Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene* **23**, 2640–2647 (2004).
7. Sargent, D.J. *et al.* Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3219–3226 (2010).
8. Zaan, A. *et al.* Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann. Oncol.* **21**, 772–780 (2010).
9. Yamagishi, N., Saito, Y. & Hatayama, T. Mammalian 105 kDa heat shock family proteins suppress hydrogen peroxide-induced apoptosis through a p38 MAPK-dependent mitochondrial pathway in HeLa cells. *FEBS J.* **275**, 4558–4570 (2008).
10. Hosaka, S. *et al.* Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci.* **97**, 623–632 (2006).
11. Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y. & Hatayama, T. Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 3215–3223 (2006).
12. Siatskas, C., Underwood, J., Ramezani, A., Hawley, R.G. & Medin, J.A. Specific pharmacological dimerization of KDR in lentivirally transduced human hematopoietic cells activates anti-apoptotic and proliferative mechanisms. *FASEB J.* **19**, 1752–1754 (2005).
13. Kai, M. *et al.* Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol. Rep.* **10**, 1777–1782 (2003).
14. Slaby, O. *et al.* Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol. Rep.* **21**, 1235–1241 (2009).
15. Trott, A., Shaner, L. & Morano, K.A. The molecular chaperone Sse1 and the growth control protein kinase Sch9 collaborate to regulate protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **170**, 1009–1021 (2005).
16. Andréasson, C., Fiaux, J., Rampelt, H., Druffel-Augustin, S. & Bukau, B. Insights into the structural dynamics of the Hsp110–Hsp70 interaction reveal the mechanism for nucleotide exchange activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16519–16524 (2008).
17. Wang, X.Y. *et al.* Targeted immunotherapy using reconstituted chaperone complexes of heat shock protein 110 and melanoma-associated antigen gp100. *Cancer Res.* **63**, 2553–2560 (2003).
18. Manjili, M.H. *et al.* Development of a recombinant HSP110-HER-2/neu vaccine using the chaperoning properties of HSP110. *Cancer Res.* **62**, 1737–1742 (2002).
19. Manjili, M.H. *et al.* HSP110-HER2/neu chaperone complex vaccine induces protective immunity against spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *J. Immunol.* **171**, 4054–4061 (2003).
20. Ceballos, E. *et al.* Inhibitory effect of c-Myc on p53-induced apoptosis in leukemia cells. Microarray analysis reveals defective induction of p53 target genes and upregulation of chaperone genes. *Oncogene* **24**, 4559–4571 (2005).
21. Gotoh, K. *et al.* Apg-2 has a chaperone-like activity similar to Hsp110 and is overexpressed in hepatocellular carcinomas. *FEBS Lett.* **560**, 19–24 (2004).
22. Suraweera, N. *et al.* Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **123**, 1804–1811 (2002).
23. Buhard, O. *et al.* Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J. Clin. Oncol.* **24**, 241–251 (2006).
24. Grady, W.M. *et al.* Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res.* **58**, 3101–3104 (1998).
25. Duval, A. *et al.* The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 5002–5007 (2004).
26. Rêrole, A.L. *et al.* Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer Res.* **71**, 484–495 (2011).
27. Jegou, G., Hazoume, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* published online, doi:10.1016/j.canlet.2010.10.014 (13 November 2010).



ONLINE METHODS

Tumor samples, cell lines. CRC cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (see <http://www.cephb.fr/fr/gacc/>). Primary tumors and normal colonic tissues were obtained from patients undergoing surgery. The MSI status was determined as described²³.

Selection of candidate genes containing intronic DNA repeats. Criteria for selection of candidate genes containing intronic DNA repeats whose instability due to MSI might generate exon skipping or exon retention were: (i) size of intronic repeat (IR) > 7 nucleotides (nt); (ii) beginning of IR < 40 nt before the intron-exon junction; (iii) 'cancer-related' genes; and (iv) genes expressed in CRCs.

Mutation analysis. Tumor DNA from samples was extracted using QIAamp DNA Tissue Kit (Qiagen). Specific primers for HSP110 intron 8 were designed using e-primer3 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/eprimer3.html>). PCR reactions were done in a final volume of 20 μ l containing 100 ng of genomic DNA, 0.15–0.40 μ M of each primer and 1 unit of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 94 °C for 10 min and 40 cycles at 94 °C for 30 s and 57 °C for 30 s. Fluorescent PCR products were run on the ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Real-time quantitative RT-PCR analysis. Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen). RNA integrity was evaluated on a 2100 Bioanalyzer using the RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent). Only samples with intact RNAs were used (28S:18S RNA ratio >1.6, absence of aberrant peaks). Complementary DNAs were synthesized using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). For quantitative RT-PCR, we used the Applied SDS Biosystems analysis software. Primers (5'-GCTACACGAATTCAGCTGTGA-3' and 5'-GAGCAGCATGGTTTCGACTAAA-3') and internal probes were designed using Primer Express (Applied Biosystems) and synthesized by Applied Biosystems. Internal probes were designed to amplify either the HSP110wt (5'-6FAM-TACAGTGTGCAATACTT-3') or HSP110 Δ E9 (5'-VIC-ATGTGCATTACAGTGTC-3') transcripts, allowing competitive detection of HSP110wt and HSP110 Δ E9 transcript. The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95 °C, 10 min, 40 cycles at 95 °C, 15 s, and 60 °C, 1 min.

Plasmids, transfections and immunofluorescence. HSP70 and HSP27 constructs were described elsewhere^{28,29}. The GFP-HSP110 construct was obtained from Addgene. The HSP110 mutant was produced by PCR from GFP-HSP110 vector using the following primers: 5'-CGC GCG CGC AAG ATC TAC ATG TCG GTG GTG GGG-3' (BglII) and 5'-CGC GCG CGC AAG CTT TCA TGA ACA CTG TAA TGC ACA TCC-3' (HindIII). After digestion, mutant HSP110 cDNA was cloned into the EGFP C2 vector. Transfections were done using the Jet PEI reagent (Ozyme). GFP fluorescence was assessed using the Cell Observer station (Zeiss). HSP110 chaperone activity was evaluated using a protein thermolability assay²⁶.

Immunoprecipitation and western blotting. Cytosolic and nuclear extractions were obtained as described²⁸. GFP immunoprecipitates were separated in SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad). Membranes were first probed using primary antibodies: HA tag (Eurogentec), 14-3-3 (Santa-Cruz, TebuBio), HSP110 (N terminus, ab24503; Abcam), HSP110 (C terminus; BD Biosciences) and GFP tag (Millipore). Next, membranes were incubated with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Cell death analysis. Cells (1.5×10^5 cells per well), seeded onto 12-well culture plates, were treated with TRAIL (150–500 ng ml⁻¹) for 4 h, and cell death was measured by Hoechst 33342 staining (Sigma-Aldrich). Following treatment for 48 h with oxaliplatin (20–40 μ M), cells were incubated with antibody specific to Apo 2.7 and apoptotic cells were analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson).

Tumor growth analysis *in vivo*. Control and HSP110 Δ E9-transfected HCT116 cells (4×10^6) were mixed with Matrigel (ref.: 354234; BD Biosciences) and injected s.c. into the right flank of *nu/nu* C57/BL6 mice (Charles River Laboratories). The mice were treated according to the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie, France.

Subjects. Subjects with MSI CRC included those who underwent curative surgical resection of histologically proven MMR-deficient CRC (period: 1998–2003 and 2004–2007 for series 1 and 2, respectively) and for whom clinical data were available and tumor tissue could be retrieved from the tumor collection. Samples from the first series were initially collected to do microarray analyses so that they all contained at least 50% of tumor cells. The study was conducted according to the recommendations of the institutional authorities. All patients underwent surgery at either the Saint-Antoine Hospital (Paris, France), or Clinical Centre de Haute-pierre (Strasbourg, France). Subjects with MSI CRC were treated with FL (fluorouracil plus leucovorin), either alone or in combination with other drugs like oxaliplatin (**Supplementary Table 3**). Recurrence was uniformly assessed by physical examination with biological tests and measurement of carcinoembryonic antigen level, pulmonary radiography, and abdominal ultrasonography or computed tomography every 3 months during the first 3 years after surgery, then every 6 months for 2 years, and then annually. Patient follow-up was defined as the time between surgery and the last hospital contact or disease recurrence.

Statistical analyses. Differences between variables were assessed with the χ^2 or Fisher's exact test, and comparisons of the means with the Student's *t* test. Survival curves were obtained using Kaplan-Meier estimates. For survival curves the log-rank test with an end point at 5 years was used. Univariate and multivariate associations to outcome were done using the Cox regression model.

28. Brunet Simioni, M. *et al.* 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 (2009).

29. Ribeil, J.A. *et al.* Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102–105 (2007).

Annexe 2 :

Quantification of HSP27 and HSP70 molecular chaperone activities.

Gobbo. J, Caroline Gaucher-Di-Stasio, Stéphanie Weidmann, Jean Guzzo and Carmen Garrido. **Methods Mol Biol .2011.**

Chapter 11

Quantification of HSP27 and HSP70 Molecular Chaperone Activities

Jessica Gobbo, Caroline Gaucher-Di-Stasio, Stéphanie Weidmann, Jean Guzzo, and Carmen Garrido

Abstract

Stress-inducible heat-shock proteins (HSPs, like HSP70 and HSP27) are molecular chaperones that protect cells from stress damage by keeping cellular proteins in a folding competent state and preventing them from irreversible aggregation. HSP27 and HSP70 chaperone activities are useful indicators to test chemical products and physical stress impact on protein denaturation, to select HSP inhibitors, or to determine the implication of the chaperone function in other HSP activities, such as apoptosis. We have developed two simple and fast chaperone activity tests for HSP27 and HSP70 that we initially set up to test the effect of potential HSP inhibitors obtained after screening of chemical and small molecule libraries. These chaperone quantification tests are based on the capacity of HSP to counteract chemical or thermal protein aggregation.

Key words: HSP27, HSP70, Chaperone activity, Chemical and thermal aggregation, Screening

1. Introduction

Molecular chaperones were first defined in 1978 by Laskey (1) as proteins that can recognize misfolded or denatured proteins. Heat-shock proteins (HSPs) are powerful chaperones and the expression of some of them is induced in response to a wide range of physiological and environmental stresses. HSP accumulation is necessary for cell survival after thermal, chemical, or physical insults. Hence, it is not surprising that molecular chaperones are implicated in the pathogenesis of many relevant diseases and could be regarded as potential pharmacological targets. HSP27 and HSP70 are the most stress-inducible HSPs. Inducible HSP70 (also called HSP72 or HSPA1) is an ATP-dependent molecular chaperone and

is very low expressed under normal conditions. Like other members of the HSP70 family such as HSC70, HSP70 assists the folding of newly synthesized polypeptides, the assembly of multiprotein complexes, and the transport of proteins across cellular membranes (2–4). Under stressful conditions, elevated HSP70 levels are involved in the correct folding of misfolded or denatured proteins (5). HSP27 (also called HSPB1 and HSPB2) is ATP-independent molecular chaperone that inhibits protein aggregation (6). HSP27 can form oligomers of up to 1,000 kDa. The affinity of HSP27 for the proteins to be chaperoned is modulated by its oligomerization status, the multimer being the competent state (7). The range of oligomerization size and the magnitude of chaperone activity increase as the temperature increases (8, 9). Chaperone activities of HSP27 and HSP70 are complementary to counteract the aggregation or denaturation of proteins after a stress and to contribute to cell survival.

Here, we detailed two screening techniques to monitor eukaryotic HSP27 and HSP70 chaperone activities. These methods were adapted from techniques already described to measure bacterial HSP chaperone activity after a thermal or chemical stress.

Protein aggregation by chemical insult was induced by the reduction of disulfide bond of bovine serum albumin (BSA) using dithiotreitol (DTT). The resulting BSA aggregation is prevented by HSP27. A deficiency in HSP27 chaperone activity results in an increase of turbidity induced by BSA aggregation.

The thermal aggregation is based on protein defolding by temperature resulting in the exposition of charged and hydrophobic surfaces. These surfaces can be recognized by HSP70 that stops the nonspecific aggregation of defolded proteins.

Protein aggregation measurements after chemical stress are better suited for HSP27 while physical stress-induced protein aggregation (i.e., heat shock) seems best suited for HSP70. One possible explanation is that protein aggregation induced by a heat shock may be preceded by progressive proteins' misfolding/denaturation that could be correctly folded by HSP70, thereby preventing their aggregation. In our experimental conditions of chemical insult, protein aggregation might happen too fast for HSP70 to interfere with protein misfolding.

The protein aggregation assays described in this chapter were set up to quantify HSP27 and HSP70 chaperone inhibitors or activators obtained after high-throughput screening. The techniques are also useful to test HSP27 or HSP70 mutants in order to investigate the structure–function dynamism of HSP chaperone activity or to evaluate the implication of the chaperone activity in other HSP functions (i.e., apoptosis). Furthermore, in a more general basis, they could also be used to test the impact of chemical products and physical stress on protein denaturation.

2. Materials

2.1. Cell Culture (Mouse Embryonic Fibroblast HSF1^{-/-}, See Note 1)

1. 25-cm² culture flask.
2. Cell culture medium: DMEM (Lonza).
3. Fetal bovine serum (FBS) (Lonza).
4. DMEM w/FBS: DMEM supplemented with 10% FBS.
5. Cell culture grade trypsin solution (Lonza).
6. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): 1% (Sigma).
7. Sterile washing buffer: HBSS (Lonza).
8. Trypsin w/EDTA: 2.5% trypsin, 0.05% EDTA. Prepare in advance in washing buffer. Store at 4°C.

2.2. Cell Transfection

1. Transfection reagent: DreamFect™ Gold® (Oz biosciences).
2. DMEM w/FBS 10%.
3. Sterile washing buffer: HBSS (Lonza).
4. Opti-MEM medium (Gibco).
5. Human HSP27 and HSP70 plasmids: pcDNA 3.1 (Invitrogen), HA hHSP27 or hHSP70 (Home-made).

2.3. Cell Lysis

1. Trypsin w/EDTA.
2. Sterile washing buffer: HBSS (Lonza).
3. DMEM w/FBS 10%.
4. Phosphate-buffered saline (PBS) 1× (Lonza).
5. Lysis buffer: 50 mM HEPES, 0.25 M EDTA, 4 M NaCl, 0.1% NP40. Prepare in advance. Store at 4°C up to 2 months.
6. Antiprotease: Prepare in advance in sterile water. Store at -20°C.
7. Lowry protein assay (Bio-Rad).
8. Sonicator.

2.4. Aggregation Tests

2.4.1. Chemical Aggregation Test

1. 96-well plate (flat bottom).
2. BSA: Prepare in advance at 100 g/L, store at -20°C.
3. DTT: Prepare in advance at 1 M, store at -20°C.
4. Sodium phosphate buffer at 50 mM, pH 7. Store at 4°C.
5. Hsp27 recombinant protein: Store separate aliquots at -80°C (see Note 2).
6. Cell lysates.
7. 96-well plate spectrophotometer reader (for 340 nm).

2.4.2. Thermal Aggregation Test

1. Microtubes.
2. Cell lysates.
3. Tris-HCl buffer at 20 mM, pH 7. Store at 4°C.
4. HSP70 recombinant protein.
5. Water bath.

3. Methods

3.1. Cell Culture

1. Seed 160,000 cells by flask in 7 mL DMEM w/FBS MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) HSF1^{-/-} (see Note 3).
2. Incubate at 37°C, 5% CO₂, for 24 h.

3.2. Cell Transfection (see Note 4)

1. Prepare one microtube for DNA and one microtube for transfection reagent per condition.
2. Add in DNA tube 3 µg of HSP plasmid and complete to 100 µL with opti-MEM.
3. Add in transfection tubes 12 µL of DreamFect Gold® solution and 90 µL of opti-MEM (see Note 5).
4. Put the DNA in the DreamFect tube. Mix gently the DNA and transfection reagent by carefully pipetting up and down two to three times. Incubate for 15–20 min at room temperature. Do not vortex or centrifuge (see Note 6).
5. Add the mix (dropwise) onto the cells. Homogenize by gently rocking the flask (for uniform distribution of the mixture) (see Note 7).
6. Carefully add 7 mL of DMEM w/FBS on the well wall close to the bottom.
7. Incubate at 37°C, 5% CO₂, for 24 h (see Note 8).

3.3. Cell Lysis

1. Remove DMEM w/FBS medium.
2. To avoid FBS interference with trypsin, rinse with 5 mL of washing buffer.
3. Add 1.5 mL of trypsin w/EDTA.
4. Incubate for 5 min at 37°C. Shake slightly the flask to detach cells.
5. Recover the cells with 7 mL DMEM w/FBS (see Note 9).
6. Pellet the cells by centrifugation at 200 × g for 5 min.
7. Discard the supernatant and resuspend the cells in 7 mL PBS 1×. Centrifuge at 200 × g for 5 min.
8. Discard the supernatant and keep the cells on ice (see Note 10).

9. For protease inhibition, add 300 μL of antiprotease to 10 mL lysis buffer. Keep the buffer on ice (see Note 11).
10. Add 300 μL of lysis buffer (see Note 12).
11. Transfer in microtube and vortex for 10 s. Keep on ice during 20 min for cell lysis.
12. Sonicate for 10 s, power 10%.
13. Centrifuge at $14,000\times g$ for 15 min at 4°C .
14. Transfer the supernatant in another tube.
15. To determine protein concentration, use Lowry protein assay. Adjust protein concentration of all samples at 2 mg/mL with sodium phosphate buffer or Tris-HCl buffer (see Note 13).
16. Samples can be stored at -80°C supplemented with 3% of glycerol before aggregation test (see Note 14).

3.4. Aggregation Test

3.4.1. Chemical

Aggregation Test (Fig. 1a)

1. Defreeze BSA and DTT at room temperature.
2. Run a 2-h kinetic at 340 nm at 45°C , shake for 10 s before read, and read every 2 min.
3. In each sample, add successively 20 μL of BSA, 100 μL of cell lysates at 2 mg/mL of protein, complete to 197 μL with sodium phosphate buffer, and finally add 3 μL DTT (see Note 15).

3.4.2. Thermal

Aggregation Test (Fig. 1b)

(see Note 16)

1. Dilute the samples to a protein final concentration of 2 mg/mL.
2. Add 100 μL of Tris-HCl buffer to 200 μL of samples (see Note 17).
3. Incubate for 45–60 min at 55°C in a water bath.
4. Put samples on ice to stop protein aggregation.
5. Centrifuge for 10 min, $16,000\times g$, at 4°C to pellet aggregated proteins.
6. Measure protein concentration in the supernatant with Lowry technique.
7. Subtract the final protein concentration measured in the supernatant from the initial concentration (2 mg/mL)=protein aggregation.

4. Notes

1. MEF HSF1^{-/-} cells do not express HSP70 and HSP27.
2. HSP27 recombinant protein is used as protein aggregation negative control.

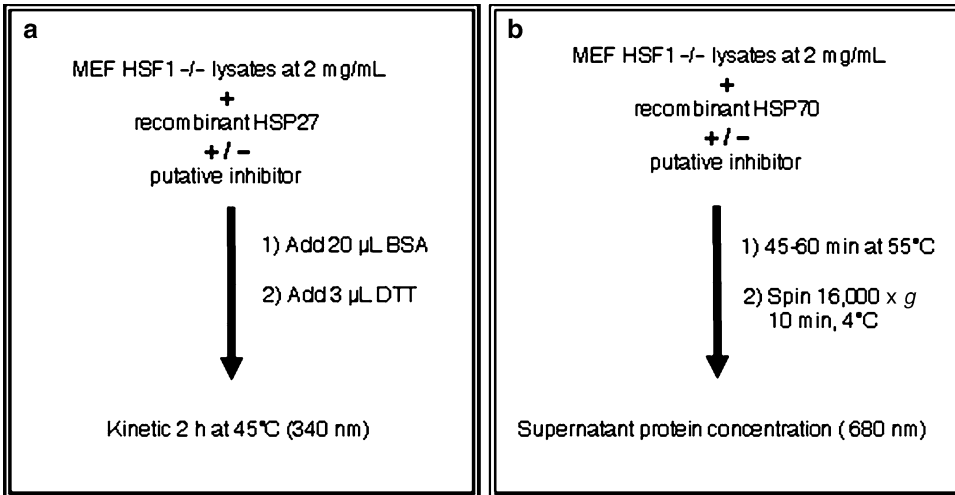


Fig. 1. Schematic representation of the two chaperone activity tests. (a) Chemical aggregation test for HSP27. *BSA* Bovine serum albumin, *DTT* Dithiothreitol. (b) Thermal aggregation test for HSP70.

3. Prepare two 25-cm² flasks by transfection conditions. Do not use 75-cm² flasks.
4. Alternatively to cell transfection, HSP recombinant proteins can be added to the cell lysates (see Fig. 1).
5. Always prepare the complexes in medium without serum or PBS because serum can interfere with vector assembly.
6. The diluted solutions should be combined within 5 min. It is important to put the DNA in the Dreamfect[®] never do the opposite. Because the transfection would be ineffective.
7. To avoid the dissociation of the transfection complexes, take slowly the mix with P1000 micropipet.
8. After transfection, do not change the culture medium.
9. To pellet the cells, pool two 25-cm² flasks in the same tube.
10. The cells can be kept at -20°C for 2 weeks. After centrifugation, discard the supernatant very well and put at -20°C .
11. The lysis buffer containing antiprotease cannot be stored for more than 24 h to keep antiprotease activity.
12. Use the smallest volume of lysis buffer possible to avoid sample dilution (final concentration of 2 mg/mL).
13. For chemical aggregation test, use sodium phosphate buffer, and Tris-HCl buffer for thermal aggregation test. Before aggregation test, control HSP expression by western blot.
14. Glycerol protects protein activity from freezing damage.

15. Add DTT at last. Use HSP27 as aggregation negative control. If you want to test HSP27 inhibitors, put inhibitors in these steps.
16. Keep the samples on ice during preparation.
17. Add HSP70 inhibitors in these step to test the effect of inhibitors of the protein.

References

1. Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D., Morris, N. R., Wyllie, A. H., Mertz, J. E., De Roberts, E. M. and Gurdon, J. B. (1978). Chromatin assembly and transcription in eggs and oocytes of *Xenopus laevis*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **42**, 171–178.
2. Beckmann, R.P., Mizzen, L.E., Welch, W. J. (1990) Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science.* **248**, 850–854.
3. De Los Rios, P., Ben-Zvi, A., Slutsky, O., Azem, A., Goloubinoff, P. (2006) Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **103**, 6166–6171.
4. Shi, Y., Thomas, J. O. (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol.* **12**, 2186–2192.
5. Nollen, E. A., Brunsting, J. F., Roelofsens, H., Weber, L. A., Kampinga, H. H. (1999) In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol.* **19**, 2069–2079.
6. Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M., Buchner, J. (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**, 221–229.
7. Shashidharamurthy, R., Koteiche, H. A., Dong, J., 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. *J Biol Chem.* **280**, 5281–5289.
8. Bruey, J. M., Paul, C., Fromentin, A., Hilpert, S., Arrigo, A. P., Solary, E., Garrido, C. (2000) Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene.* **19**, 4855–4863.
9. Lejl-Garolla, B., Mauk, A. G. (2006) Self-association and chaperone activity of Hsp27 are thermally activated. *J Biol Chem.* **281**, 8169–8174.

Annexe 3 :

Targeting cancer with peptide aptamers. Seigneuric R, **Gobbo J**, Colas P, Garrido C. **Oncotarget. 2011**

Targeting cancer with peptide aptamers

Renaud Seigneuric^{1,2}, Jessica Gobbo^{1,2}, Pierre Colas³, Carmen Garrido^{1,2}

¹ Heat Shock Proteins and Cancer, INSERM, UMR 866 IFR 100, Faculty of Medicine, 7 Boulevard Jeanne D'Arc, 21000 Dijon, France

² Université de Bourgogne, Dijon, France

³ CNRS USR 3151, P2I2 Group, Station Biologique, Roscoff, Bretagne, France

Correspondence to: Renaud Seigneuric, email: renaud.seigneuric@u-bourgogne.fr

Keywords: Cancer, targeted therapy, peptide, aptamer, heat shock protein

Received: June 22, 2011,

Accepted: June 24, 2011,

Published: June 24, 2011

Copyright: © Seigneuric et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT:

A major endeavour in cancer chemotherapy is to develop agents that specifically target a biomolecule of interest. There are two main classes of targeting agents: small molecules and biologics. Among biologics (e.g.: antibodies), DNA, RNA but also peptide aptamers are relatively recent agents. Peptide aptamers are seldom described but represent attractive agents that can inhibit a growing panel of oncotargets including Heat Shock Proteins. Potential pitfalls and coming challenges towards successful clinical trials are presented such as optimizing the delivery of peptide aptamers thanks to Nanotechnology.

Rational drug design is the quest, launched by Paul Ehrlich about a century ago, for designing a 'magic bullet': a targeting agent that specifically interacts with, and mostly inhibits, a biomolecule of interest. Essentially, this biomolecule is an intracellular or membrane-bound protein identified as contributing to a disease state. The choice of the protein to be targeted is constrained by our ability obtain highly specific, bioactive ligands. Usually, for small molecules, a requirement is the presence of a pocket (e.g.: the ATP-binding cavity of protein kinases) where the targeting agent can fit snugly and establish the multiple low-energy interactions in 3 dimensions that confers its (high) affinity and specificity.

Within the last 10 years[1], a number of such targeting agents have been discovered by screening or rational design. They fall in 2 classes: small molecules and biologics. The former are developed by (pharmaceutical) chemists, with imatinib as an archetype. The latter originate from molecular biologists and are typically represented by monoclonal antibodies (mAbs) such as trastuzumab or cetuximab. Due to their size (molecular weight <500Da[2]), small molecules are relatively easy to synthesize, can diffuse well (including through the membrane bilayer) and are generally orally available[3]. On the other hand, mAbs are large (~150kDa[4, 5]) and complex molecules[6] that are delivered intratumorally or intravenously[3]. To reduce the immune

response they inherently trigger, efforts were devoted to design new generations of antibodies switching from murine antibodies to: chimeric (~60% human, example: Cetuximab[7]), humanized (~90% human, e.g.: Trastuzumab) or human antibodies (100%, e.g.: Panitumumab). Up to now, biologics have in fact a higher rate of approval success rate (18% for chimeric and 24% humanized monoclonal antibodies) than new chemical entities including small molecules (5%)[3, 8] especially in oncology[3].

A NEW TOOL: PEPTIDE APTAMERS

Among biologics, aptamers (a word combining the Latin *aptus* 'fitting' with the Greek *meros* 'part'[9]) are emerging as a new class of targeting agents. Aptamers (i.e.: DNA, RNA aptamers) but also peptide aptamers are indeed apt to specifically inhibit biomolecules of interest with high affinity[9-11].

Peptide aptamers consist of a short (~10-20 amino acids), conformationally constrained[12] variable random peptide sequence inserted into a scaffold protein (most often the bacterial protein thioredoxin A[12, 13]) as shown in figure 1. They can thus be considered as miniaturized, simplified antibodies[12, 13]. A unique feature of peptide aptamers relies in their doubly constrained target-binding loop[13], compared to other man-made biomolecules that consist of peptidic sequences fused terminally to a carrier

protein. Constrained conformations[13-15] require less energy to bind the target of interest, resulting in peptide aptamers with high affinities and K_D values in the 10 – 100 nM range[10, 12]. Compared to monoclonal antibodies, DNA, RNA and peptide aptamers are relatively small, weighting ~10-20kDa[16] with reduced immunogenicity compared to antibodies[9].

TRANSLATION TO THE CLINICS: OF MICE AND MEN:

Of the ~108,400 recorded clinical trials (<http://clinicaltrials.gov/>, last access: the 8th of June 2011), ~5,500 are involving targeted therapies, with ~1,700 in the field of oncology. Among these, there are ~500 trials assessing peptides but only 3 studies concerning aptamers (none with peptide aptamers). There are at least 2 interesting approaches to be enlightened. One is the success of Pegaptanib sodium (Macugen, Eyetech Pharmaceuticals/Pfizer), the first FDA-approved aptamer (December 2004) for use in humans. As with other types of agents, it took about a decade of preclinical development to improve and characterize its biological effects[17]. Nevertheless, this anti-VEGF pegylated RNA aptamer developed for the treatment of neovascular age-related macular degeneration is now involved in ~50 trials. Another interesting example includes AS1411 (4 clinical trials) for the study of Acute Myeloid Leukemia (2 clinical trials), Renal Cell Carcinoma (1 clinical trial) and advanced tumors (1 clinical trial). This DNA aptamer targeting nucleolin induces apoptosis and may be combined with cytarabine to obtain a synergistic effect. It is the first-in-class DNA aptamer anticancer agent, and is currently in



Figure 1: Oncotargets of peptide aptamers. The typical structure of a peptide aptamer is composed of a constant scaffold (in blue, e. g. : the bacterial protein thioredoxin A) with an inserted short variable random region (in red). A panel of oncotargets inhibited by peptide aptamers is provided.

phase II clinical trials including solid tumours[18].

More recently developed, peptide aptamers are to date tested in preclinical models only. In the context of oncology, *in vitro* and/or *in vivo* data indicate that peptide aptamers are able to inhibit a growing panel of oncotargets including: the human papillomavirus HPV16 E6 oncoprotein[19] in 2000, ErbB2 receptor[20], mutant p53[21], but also HSP70[22] and HSP27[23] within these last months. So what are the foreseen barriers towards successful clinical trials?

Reaching the tumor

To date, peptide aptamers target the cancer cells via different means. The two most frequent delivery options are liposome-like chariots and protein transduction domains (PTDs). Potential issues of the former approach might be related to toxicity and stability. Concerning the later, the most widely used PTD, derived from HIV-TAT protein, is a positively charged sequence that represents an interesting approach. However, it might affect protein structure. Far from trivial, delivering the targeting agent specifically to the desired site of action will more than probably benefit from nanotechnology. Several ongoing clinical options exist. They include drug delivery systems composed of: lipid nanoparticles, albumin-based, micelles, polymer-based or gold nanoparticles[9] that should be investigated for peptide aptamers.

Dose calculations

Different from organic small molecules by nature, dose calculations for biologics nevertheless remain almost exclusively traditional[24] even though they exhibit non-linear dose-response curves[6]. As targeting agents are often combined with cytotoxics (e.g.: doxorubicin, cisplatin or taxol), drug combinations need careful evaluation. Also, the design of clinical trials for targeting agents should be revisited accordingly[25].

Early detection

Obviously, the earlier the disease is detected, the greater the chances of curing it. Efforts should be devoted to improve current detection limits. Also, it is necessary to develop and validate appropriate biomarkers for cancer diagnosis as well as treatment follow-up[26]. Interestingly, aptamers can be functionalized onto sensing schemes for biodetection[9] with the emerging ‘aptasensors’[27].

Patient selection: when one treatment does not fit all

Related to early detection is the identification of the

right panel of patients. Cancer is known to be a highly heterogeneous disease. For instance, the EGFR pathway is disrupted in fewer than 15% of patients with lung cancer[28]. One of the 4 EGFR family member, HER2, is overexpressed in ~30% of breast cancers[6, 29]. Thus, averaging the response of a few responders in an overall non-responding group would be cancelled out and the development of companion diagnostics to eventually identify suitable patients is mandatory.

Side effects: evolution for every one

Since “*Nothing makes sense in medicine except in the light of biology*”[30] and also that “*Nothing in biology makes sense except in the light of evolution*”[30], it may prove useful to get insights from an evolutionary process that shaped us over a couple of billions of years. The quest for new agents have led to some disastrous clinical trials like CAST and SWORD in cardiology[31]. Some of the lessons learned are that searching for druggable portions of different types of ion channels (e.g.: sodium, potassium) may lead to a common –well conserved- protein domain (e.g.: the pore-forming modules[32]) that is shared by those different types of channels[33], potentially leading to undesired effects and complex cardiac patterns[31], sometimes lethal. In cancer, a similar pitfall was recently noticed when assessing the selectivity of erlotinib hydrochloride, gefitinib and imatinib for instance[29]. Targeting ATP-pockets is actually a very common trend in rational drug design since these pockets exhibit high druggability indexes and may be seen as a bias from the concept of druggability. Therefore, when intending to design a specific inhibitor, one should also evaluate sets of related targets which contain similar pockets. For protein kinases for instance, the human kinome space was found to consist of 518 kinases[34]. As a general guideline, a threshold of 60% sequence identity was determined for the ATP-pocket that differentiated between binding sites of related kinases versus variations in the binding sites of the same kinase[35]. This indicates that kinases with a sequence identity >60% have a high probability of being inhibited by the same compounds[35]. Peptide aptamers were in fact developed to circumvent the requirement of targeting pockets and to address other types of target sites, non-druggable by small molecules. They can inhibit protein function via the disruption of protein-protein interactions or a number of other mechanisms[36]. In the context of protein kinases, inhibitory peptide aptamers would be expected to be more specific than their small molecules inhibitors, thereby reducing side-effects related to off-targets inhibition.

CONCLUDING REMARKS

The attrition rate in clinical trials remains high,

especially in cancer[8]. One major reason probably relies in the intrinsic heterogeneity of tumors that harbour several mutations[37, 38]. Therefore, instead of heading for the design of the magic bullet, one may in fact want to broaden the spectrum of targets, and move towards polypharmacology as interaction networks play an increasing role in our current understanding of drug efficacy and side effects[39-41]. It was indeed found for instance that one of the archetypes of targeted therapy, imatinib, inhibits other proteins as well and is thus in fact not perfectly specific[39]. Alternatives to ‘dirty’ or promiscuous drugs intended to target and inhibit a set of pathways disrupted in cancer include targeting a molecular chaperone, ideally an inducible heat shock protein[22, 23, 42]. The rationale is that cancer cells, because they must extensively rewire their metabolic and signalling networks, need for their survival an abundant content of chaperones like the inducible HSP70 or HSP27 that are not or hardly expressed in normal cells. This general cancer cells’ addiction to heat shock proteins make the recently described HSP70 and HSP27 peptide aptamers all the more interesting as sensitizing agents in cancer therapy. However, the use of peptide aptamers as targeting agents in cancer therapy need to be carefully validated since the existing data is only preclinical.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported thanks to: Label d’excellence de la Ligue Nationale contre le Cancer, Conseil Régional de Bourgogne and the European Commission’s Seventh Framework Programme (SPEDOC 248835).

REFERENCES

1. DeVita VT, Jr., Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2008; 68:8643-8653.
2. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46:3-26.
3. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:714-727.
4. Papin JA, Hunter T, Palsson BO, Subramaniam S. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6:99-111.
5. Ladner RC. Antibodies cut down to size. *Nat Biotechnol.* 2007; 25:875-877.
6. Lacana E, Amur S, Mummameni P, Zhao H, Frueh FW. The emerging role of pharmacogenomics in biologics. *Clin Pharmacol Ther.* 2007; 82:466-471.
7. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 9:767-774.

8. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3:711-715.
9. Seigneuric R, L. Markey, D.S.A. Nuyten, C. Dubernet, C.T.A. Evelo, E. Finot, Garrido C. From Nanotechnology to Nanomedicine: applications to cancer research. *Curr Molecular Medicine* 10(7):640-52. 2010.
10. Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature.* 1996; 380:548--550.
11. Mann AP, Bhavane RC, Somasunderam A, Liz Montalvo-Ortiz B, Ghaghada KB, Volk D, Nieves-Alicea R, Suh KS, Ferrari M, Annapragada A, Gorenstein DG, Tanaka T. Thioaptamer conjugated liposomes for tumor vasculature targeting. *Oncotarget.* 2:298-304.
12. Borghouts C, Kunz C, Groner B. Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2005; 5:783-797.
13. Baines IC, Colas P. Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug Discov Today.* 2006; 11:334-341.
14. Ladner RC. Constrained peptides as binding entities. *Trends Biotechnol.* 1995; 13:426-430.
15. Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:6315-6320.
16. Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol.* 2008; 26:74-85.
17. Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Jr., Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5:123-132.
18. Soundararajan S, Wang L, Sridharan V, Chen W, Courtenay-Luck N, Jones D, Spicer EK, Fernandes DJ. Plasma membrane nucleolin is a receptor for the anticancer aptamer AS1411 in MV4-11 leukemia cells. *Mol Pharmacol.* 2009; 76:984-991.
19. Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:6693-6697.
20. Kunz C, Borghouts C, Buerger C, Groner B. Peptide aptamers with binding specificity for the intracellular domain of the ErbB2 receptor interfere with AKT signaling and sensitize breast cancer cells to Taxol. *Mol Cancer Res.* 2006; 4:983-998.
21. Guida E, Bisso A, Fenollar-Ferrer C, Napoli M, Anselmi C, Girardini JE, Carloni P, Del Sal G. Peptide aptamers targeting mutant p53 induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Res.* 2008; 68:6550-6558.
22. Rerole AL, Gobbo J, De Thonel A, Schmitt E, Pais de Barros JP, Hammann A, Lanneau D, Fourmaux E, Deminov O, Micheau O, Lagrost L, Colas P, Kroemer G, Garrido C. Peptides and Aptamers Targeting HSP70: A Novel Approach for Anticancer Chemotherapy. *Cancer Res.* 2011.
23. Gibert B, Hadchity E, Czekalla A, Aloy MT, Colas P, Rodriguez-Lafrasse C, Arrigo AP, Diaz-Latoud C. Inhibition of heat shock protein 27 (HspB1) tumorigenic functions by peptide aptamers. *Oncogene.* 2011.
24. Le Tourneau C, Lee JJ, Siu LL. Dose escalation methods in phase I cancer clinical trials. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101:708-720.
25. Le Tourneau C, Dieras V, Tresca P, Cacheux W, Paoletti X. Current challenges for the early clinical development of anticancer drugs in the era of molecularly targeted agents. *Target Oncol.* 5:65-72.
26. Fleming TR, DeMets DL. Surrogate End Points in Clinical Trials: Are We Being Misled? *Ann Intern Med.* 1996:605-613.
27. Johnson S, Evans D, Laurenson S, Paul D, Davies AG, Ko Ferrigno P, Walti C. Surface-immobilized peptide aptamers as probe molecules for protein detection. *Anal Chem.* 2008; 80:978-983.
28. Getting personal. *Nature.* 2011; 473:253.
29. Weinberg RA: *The Biology of Cancer.* New York: Garland Scientific; 2006.
30. Weissmann G. Claude Bernard and Judah Folkman: nothing makes sense in medicine except in the light of biology. *Faseb J.* 2008; 22:943-946.
31. Seigneuric RG, Chasse JL, Auger P, Bardou A. Simulated interactions between a Class III antiarrhythmic drug and a figure 8 reentry. *Acta Biotheor.* 2005; 53:265-275.
32. Catterall WA. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron.* 2010; 67:915-928.
33. Wulff H, Castle NA, Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8:982-1001.
34. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002; 298:1912-1934.
35. Vieth M, Sutherland JJ, Robertson DH, Campbell RM. Kinomics: characterizing the therapeutically validated kinase space. *Drug Discov Today.* 2005; 10:839-846.
36. Colas P. The eleven-year switch of peptide aptamers. *J Biol.* 2008; 7:2.
37. Sporn MB. Perspective: The big C - for Chemoprevention. *Nature.* 2011; 471:S10-11.
38. Pleasance ED, Stephens PJ, O'Meara S, McBride DJ, Meynert A, Jones D, Lin ML, Beare D, Lau KW, Greenman C, Varela I, Nik-Zainal S, Davies HR, Ordóñez GR, Mudie LJ, Latimer C et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature.* 463:184-190.

39. Frantz S. Drug discovery: playing dirty. *Nature*. 2005; 437:942-943.
40. Paolini GV, Shapland RH, van Hoorn WP, Mason JS, Hopkins AL. Global mapping of pharmacological space. *Nat Biotechnol*. 2006; 24:805-815.
41. Yildirim MA, Goh KI, Cusick ME, Barabasi AL, Vidal M. Drug-target network. *Nat Biotechnol*. 2007; 25:1119-1126.
42. Neznanov N, Komarov AP, Neznanova L, Stanhope-Baker P, Gudkov AV. Proteotoxic stress targeted therapy (PSTT): induction of protein misfolding enhances the antitumor effect of the proteasome inhibitor bortezomib. *Oncotarget*. 2011; 2:209-221.

Annexe 4 :

Heat shock proteins as danger signals for cancer detection. Seigneuric, R., H. Mjahed, **Gobbo. J.**, A.-L. Joly, K. Berthenet, S. Shirley, and Garrido, C.
Front Oncol. 2011



Heat shock proteins as danger signals for cancer detection

Renaud Seigneuric^{1,2,*†}, Hajare Mjahed^{1,2†}, Jessica Gobbo^{1,2†}, Anne-Laure Joly^{1,2†}, Kevin Berthenet^{1,2}, Sarah Shirley³ and Carmen Garrido^{1,2,*}

¹ Heat Shock Proteins and Cancer, INSERM, UMR 866 IFR 100, Faculty of Medicine, Dijon, France

² Université de Bourgogne, Dijon, France

³ Trail Signalling and Cancer, INSERM, UMR 866 IFR 100, Faculty of Medicine, Dijon, France

Edited by:

Vassiliki Karantza, UMDNJ – Robert Wood Johnson Medical School, USA

Reviewed by:

Sharon R. Pine, UMDNJ Cancer

Institute of New Jersey, USA

Hilary Ann Collier, Princeton

University, USA

*Correspondence:

Renaud Seigneuric and Carmen Garrido, Heat Shock Proteins and Cancer, INSERM, UMR 866 IFR 100, Faculty of Medicine, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France.

e-mail: renaud.seigneuric@

u-bourgogne.fr;

cgarrido@u-bourgogne.fr

[†] Renaud Seigneuric, Hajare Mjahed, Jessica Gobbo and Anne-Laure Joly have contributed equally to this work.

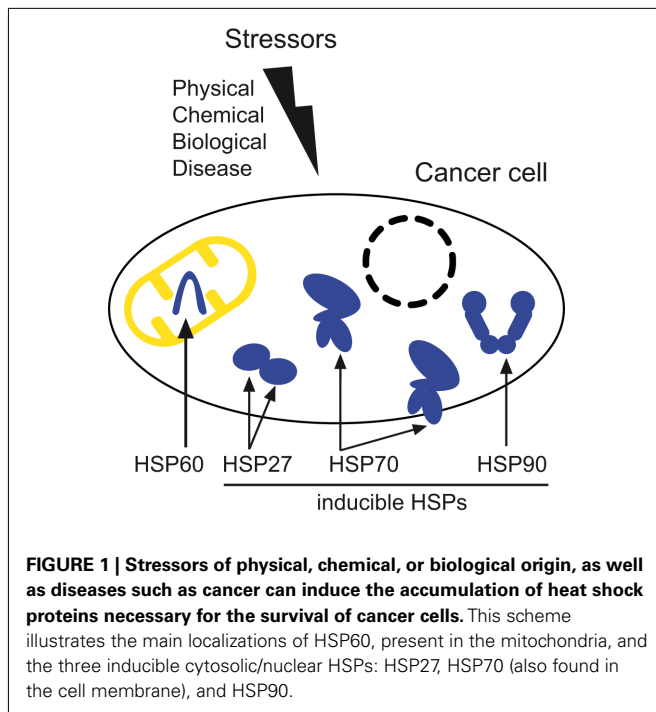
First discovered in 1962, heat shock proteins (HSPs) are highly studied with about 35,500 publications on the subject to date. HSPs are highly conserved, function as molecular chaperones for a large panel of “client” proteins and have strong cytoprotective properties. Induced by many different stress signals, they promote cell survival in adverse conditions. Therefore, their roles have been investigated in several conditions and pathologies where HSPs accumulate, such as in cancer. Among the diverse mammalian HSPs, some members share several features that may qualify them as cancer biomarkers. This review focuses mainly on three inducible HSPs: HSP27, HSP70, and HSP90. Our survey of recent literature highlights some recurring weaknesses in studies of the HSPs, but also identifies findings that indicate that some HSPs have potential as cancer biomarkers for successful clinical applications.

Keywords: heat shock protein, danger signal, detection, biomarker, stress, cancer

INTRODUCTION

Heat shock proteins (HSPs) are important molecular players in the cellular stress response (Macario and Conway de Macario, 2004). They can be divided into five superfamilies according to their molecular weight: small HSPs [or *HSPB* family with the recent ontology (Kampinga et al., 2009)], HSP40 (*DNAJ*), HSP70 (*HSPA*), HSP90 (*HSPC*), and HSP110 (*HSPH*). Two main functions have been described for HSPs: firstly, they act as molecular chaperones thereby playing a role in protein folding, aggregation, transport, and/or stabilization. Secondly, they prevent cell death, for instance by preventing post-mitochondrial apoptosis in caspase-dependent (e.g., HSP27, HSP70, and HSP90) and/or independent (e.g., HSP70) pathways (Gallucci and Matzinger, 2001). HSPs were first discovered in *Drosophila melanogaster* as a set of proteins whose expression was induced by heat shock. They are highly conserved proteins, present in the three domains of life: archaea, bacteria, and eukaryotes (Macario and Conway de Macario, 2004). HSPs are now also called stress proteins since their expression was found to be induced in response to a wide variety of physiological and environmental insults allowing cells to survive to otherwise lethal conditions. Stressors can be physical and chemical insults such as radiation, including ultraviolet light and magnetic fields, compression, shearing and stretching, hypoxia, pH shift, nutrient deprivation, or exposure to reactive oxygen species, alcohols, or metals. They also include biological insults such as fever, cold, infection, inflammation, diseases including cancer, cardiac diseases, and neurodegenerative disorders. Cellular stress can also be triggered by treatments with anticancer drugs or antibiotics (Ciocca and Calderwood, 2005; Macario and

Conway de Macario, 2005; Garrido et al., 2006; Jego et al., 2010; Willis and Patterson, 2010; Macario et al., 2011). HSPs are reported to be overexpressed in several pathologies. As such, members of the large HSP family are studied widely as they may represent interesting biomarker candidates. Chaperones such as HSP70 and HSP90 tend to be team-players, acting together with other chaperones and cochaperones (Macario and Conway de Macario, 2005). Chaperone-cochaperone complexes such as HSP70, HSP40, and nucleotide-exchange factor are able to help nascent polypeptide chains to fold properly, refold damaged molecules, and can also direct proteins to a protein-degrading mechanism such as the ubiquitin-proteasome system (Lanneau et al., 2010). Each HSP is localized in one or a set of specific compartment(s). For instance, HSP70 and HSP90 can be present in the cytosol and the nucleus, whereas HSP60 is found in mitochondria (see **Figure 1**) and grp78 (Bip, or *HSPA5*) in the endoplasmic reticulum. Microorganisms may be another source of detectable HSPs. Indeed, humans may be considered as a “superorganism,” colonized by around a thousand different species of microorganisms. These are mostly bacterial cells present in the intestinal tract. These bacterial cells outnumber our cells by at least a factor of 10, (the total number of cells comprising the adult human body, both native and foreign, being estimated to $\sim 10^{14}$) and their genes outnumber our own by a factor of 100. These HSPs from microorganisms often induce a proinflammatory response. Thus, when measuring anti-HSP levels, especially against a conserved constitutive chaperone such as HSP60, it is important to consider the protein may originate from microorganisms. In this review we will focus on HSP60 and the three most inducible HSPs: HSP27, HSP70, and HSP90.



EXTRACELLULAR HSPs: CIRCULATING AND MEMBRANE-BOUND HSPs

Due to their lack of a transmembrane domain, HSPs are considered intracellular soluble proteins (Gallucci and Matzinger, 2001) that can be induced by a wide panel of stress signals and have strong protective properties. However, HSPs such as HSP27, HSP60, HSC70, HSP70, and HSP90 can also be found in the extracellular environment where their role is believed to be immunogenic (Schmitt et al., 2007). How HSPs are found in the extracellular medium is still a debated issue. HSPs lack the consensus signal for secretion via the classical Golgi pathway. The first hypothesis was attributed to spontaneous cell death leading to HSP extravasation (Basu et al., 2000). However, it was found that undamaged, live cells released HSP70 by an active non-classical secretory pathway that was not affected by ER Golgi system inhibitors such as brefeldin A (Hightower and Guidon, 1989; Hunter-Lavin et al., 2004). Thus, active release of HSP70 might occur through one or more alternative mechanisms (Nickel and Sedorf, 2008). Different pathways have also been proposed for HSP70 release: a lysosome–endosome pathway (Mambula and Calderwood, 2006) or a release by secretory-like granules (Evdonin et al., 2006), but the bulk of the evidence points to an insertion of HSP70 oligomers into the lipid bilayer of export vesicles. These oligomers form ATP-dependent ion channels, leaving only a small C-terminal region of the protein outside (Vega et al., 2008). Thus, several mechanisms have been proposed to account for the release of these HSPs into biofluids, however the question remains unresolved (Didelot et al., 2007; Joly et al., 2010; De Maio, 2011).

Some HSPs can also be found on the cell surface, such as HSP70. This has been widely reported in a variety of conditions, especially for cancer and immune cells (De Maio, 2011). For cell surface display to occur, a high intracellular HSP level is thought to be necessary. For display of HSP70, for example, only about 10% of

the intracellular HSP70 is translocated to the cell membrane. The high specificity of HSP70 and HSC70 for membranes seems to be related to membrane fluidity and thus to lipid composition of the bilayer, due to affinity for phosphatidylserine and cholesterol (Arispe et al., 2004; Schilling et al., 2009). Presence of HSP70 in the membranes was stable even when treated with non-ionic detergent, suggesting its insertion into lipid rafts (Hunter-Lavin et al., 2004; Vega et al., 2008). In contrast to intracellular HSPs that mainly play a cytoprotective role, some extracellular HSPs such as HSP27 and HSP70, have immunogenic properties (Didelot et al., 2007) and may induce either a pro- or an anti-inflammatory response. Because cell membranes can contain a certain amount of HSPs, exosomes, and other vesicles derived from these membranes also harbor HSPs on their membranes. For example, membrane-bound HSP70 in vesicles were shown to activate macrophages (Vega et al., 2008). We have recently shown that tumor-derived exosomes harboring HSP70 in the membrane triggered STAT3 activation in myeloid-derived suppressive cells, leading to tolerance of the immune system to the tumor cells (Chalmin et al., 2010). Such tumor-derived exosomes displaying HSPs may provide interesting options for cancer detection and need to be further explored.

BIOMARKERS

A useful biomarker needs to fulfill several criteria (Seigneuric et al., 2010). It should ideally be at least: (i) overexpressed and positively associated with the pathology of interest in order to identify cases, (ii) specific to the pathology of interest, (iii) relatively easy to measure, ideally by non-invasive assays, and (iv) induced as early as possible to enable early detection.

The most widely used techniques for the investigation of extracellular HSPs as cancer biomarkers have been: immunohistochemical (IHC) stainings to detect the presence of a given HSP from a biopsy, tissue microarrays (TMA), western blot (WB) analysis, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which allows HSP levels to be quantified down to a few nanograms per milliliter, but requires labels that may denature the protein of interest.

HSP27

HSP27 belongs to the small heat shock protein family. Its structure and function are thought to be modulated by phosphorylation mediated by MAPK2. Intracellular HSP27 plays an anti-apoptotic role through interaction with Bid or cytochrome c (Bruey et al., 2000) and also has a main role as a chaperone, preventing the aggregation of misfolded proteins. As such, HSP27 may contribute to the pathogenesis of human diseases such as cancer, autoimmune diseases, neurological disorders (e.g., Alzheimer's disease), and cardiovascular diseases, where HSP27 has been investigated as a biomarker for myocardial ischemia (Ghayour-Mobarhan et al., 2011). In the context of oncology, HSP27 has been detected in both the intracellular and extracellular environment. An increased level of HSP27 has been reported in ovarian cancer, and more frequently in prostate and breast cancers. Overexpression of HSP27 was found to correlate with poor prognosis for patients with these diseases (Langdon et al., 1995; Calderwood, 2010; Khalil et al., 2011). HSP27 was also reported to contribute to invasion and metastasis (Xu et al., 2006), suggesting that HSP27 could be a biomarker for the diagnosis of cancer (Lee et al., 2005).

In a study of biopsy samples from prostate cancer patients, expression of intracellular HSP27 was reported using IHC stainings (see **Table 1**). It was observed that HSP27 expression in prostate cancer tissue was up-regulated compared to the controls (Miyake et al., 2006). Similar qualitative results were also obtained in breast cancer (Rui et al., 2003). HSP27 levels in serum and/or tumor microenvironment were determined by ELISA. Serum levels of HSP27 were significantly higher ($P < 0.001$) in breast cancer patients ($1,038.38 \pm 155.37$ pg/mL; $n = 32$) compared to healthy controls (256.29 ± 54.01 pg/mL; $n = 26$). Interestingly, HSP27 released by patients' tumor cells were significantly greater ($P < 0.0001$) than that measured in the serum with $24,220 \pm 4,796$ pg/ 10^6 cells/mL ($n = 7$) and $1,459 \pm 471$ pg/ 10^6 cells/mL ($n = 7$), respectively. Another study of breast cancer patients showed that HSP27 levels in the interstitial fluid isolated from primary breast tumor could be extremely high: $2,615,428 \pm 566,442$ pg/mL; ($n = 7$). This concentration was more than: 2,500-fold higher than that detected in patients' serum, more than 100-fold that of patients' breast tumor culture supernatants, and more than 25-fold higher than the HSP27 level detected in the normal breast tissue interstitial fluid ($103,600 \pm 35,702$ pg/mL). Although the number of patients was very small ($n = 3$), this preliminary study suggests highly elevated levels of soluble HSP27 in the human primary breast tumor microenvironment (Banerjee et al., 2011). It would be interesting to confirm this finding with a larger cohort of patients.

HSP60

HSP60, initially called chaperonin, was one of the first chaperones studied. It plays an essential role in the transport and folding of mitochondrial proteins, and is reported to be associated with different cancers (see **Table 2**).

Clinical data from patients with localized and locally advanced prostate cancer showed an association between IHC expression of HSP60 and tumor progression. HSP60 expression was also reported to be highly associated with androgen independence in the group of locally advanced cancers with androgen ablation (Castilla et al., 2010). The intensity and extent of immunoreactivity of HSP60, estimated by TMA analyses, significantly predicted biochemical recurrence. It was shown that, for patients with intense HSP60 staining in biopsy, recurrence-free survival was shorter than in those with weak expression (Glaessgen et al., 2008). A study performed in human prostate cancers indicates that HSP60 expression assessed via IHC increases in both early and advanced prostate cancer when compared with non-neoplastic prostatic epithelium (Cornford et al., 2000). The semi-quantitative evaluation of HSPs expression level showed no association with Gleason score neither for the early nor for the advanced cancers. Data from WB analyses of whole lysates in prostate cancer cell lines was consistent with data from tissue specimens. Indeed, each of the malignant cell lines tested showed an increased HSP60 expression but no identifiable difference in relative expression between stage or grade of the individual cancers.

The prognostic significance of HSP60 in cervical cancer caused was assessed by 2-DE, semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and WB analyses (Hwang et al., 2009). The results from 2-DE proteomics, confirmed by WB analyses ($P < 0.05$), suggest that HSP60 may be involved in the development of cervical cancer.

Autoantibodies may be an excellent tool for the early diagnosis of cancer. Many studies have investigated the tumor-associated autoimmune response to identify new early diagnostic markers. In breast cancer patients, ELISA experiments showed the presence

Table 1 | Selection of recent publications assessing HSP27 as a biomarker in cancers.

Sample type	Cancer type	Total number of samples	Assay	Finding/claim (References)
Biopsy	Prostate	97 patients	IHC	HSP27 expression level was significantly associated with Gleason score, but not with studied factors before radical prostatectomy (Miyake et al., 2006)
Tissue	Prostate	120 patients; 60 controls	IHC	The level of HSP27 expression was correlated with their Gleason grade and associated with poor clinical outcome (Cornford et al., 2000)
Tissue	Bladder	42 patients; 10 controls	IHC	No correlation between HSP27 expression and grade was found (Lebret et al., 2003)
Tissue	HCC	38 patients	IHC, DI	HSP27 expression increased with the progression of hepatitis B virus-related HCC (Lim et al., 2005)
Tissue	Prostate	193 patients	IHC	HSP27 expression significantly associated with several conventional prognostic factors (Miyake et al., 2010)
Serum	Breast	32 patients; 26 controls	ELISA	Higher levels of HSP27 released in the tumor microenvironment compared to serum levels of cancer patients (Banerjee et al., 2011)
Serum	Breast	76 patients; 54 controls	2-DE; MALDI-TOF-MS	HSP27 was up-regulated in the serum of breast cancer patients (Rui et al., 2003)
Serum	Ovarian	158 patients; 80 controls	ELISA	The mean concentration of anti-HSP27 antibodies was significantly higher than in the control group (Olejek et al., 2009)

Techniques are: 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis; DI, dot immunoblot; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IHC, immunohistochemical analyses; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight – mass spectrometry. HCC stands for hepatocellular carcinoma.

of autoantibodies against HSP60 and the level of serum HSP60 antibodies was found to be dependent on the cancer grade. Interestingly, high grade tumors showed a more elevated level of HSP60 autoantibodies compared to low-grade tumors. HSP60 mRNA levels were significantly higher in primary breast cancer compared to healthy breast tissues. Using IHC, it was found that HSP60 expression increased from normal to invasive tissues (Desmetz et al., 2008). Based on a serological proteomics-based approach, a humoral immune response in patients with breast cancer related to HSP60 was found (Hamrita et al., 2008). These authors looked for the presence of IgG antibodies against MCF-7 cell line proteins. They found a higher level for the molecular chaperone HSP60. In line with these results, IHC analyses performed on breast cancer biopsies showed increased expression of HSP60 in tumors of advanced clinical stage when compared with earlier stage carcinomas (Isidoro et al., 2005). These results support the fact that HSP60 overexpression during the initial stages of breast carcinogenesis may be clinically relevant for the early diagnosis of breast cancer. HSP60 was also identified by antibodies in sera from patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis, or hepatocellular carcinoma.

However, HSP60 antibodies in precancer conditions were not a useful candidate as a biomarker for pancreatic cancer. Further investigations should be performed to determine the quantitative changes of this chaperone protein associated with early events leading to tumorigenesis (Looi et al., 2008). In colorectal carcinoma, the elevated expression of HSP60 showed a significant association with tumor differentiation, and may indicate a worse prognosis (Mori et al., 2005).

The correlation of HSP60 expression with tumor growth and/or progression makes this chaperone protein a potential biomarker. However, more efforts should be devoted to quantitative analyses of HSP60 expression to resolve existing contradictory findings concerning its association with a good or a poor prognosis (see **Table 2**).

HSP70

The HSP70 superfamily consists of at least 13 members (Kampinga et al., 2009). Inducible HSP70 (*HSPA1A* or HSP72), an extensively studied, powerful ATP-dependent chaperone with key anti-apoptotic properties (Garrido et al., 2006; Didelot et al., 2007;

Table 2 | Selection of recent publications assessing HSP60 as a biomarker in cancers.

Sample type	Cancer type	Total number of samples	Assay	Finding/claim (References)
Biopsy	Prostate	107 patients	WB; IHC	HSP60 is overexpressed in tumors and strongly associated with prognostic clinical parameters (Castilla et al., 2010)
Tissue	Cervical	20 patients; 20 controls	2-DE; RT-PCR; WB	Increased HSP60 expression (Hwang et al., 2009)
Tissue	Prostate	289 patients	IHC; TMA	HSP60 overexpression was correlated with both biochemical recurrence and Gleason score (Glaessgen et al., 2008)
Tissue	Bladder	42 patients; 10 controls	IHC	HSP60 low expression levels correlated with higher tumor stage. Loss of HSP60 expression was correlated with tumor infiltration (Lebret et al., 2003)
Tissue	Breast	149 patients	IHC; TMA	No association was found between HSP60 and prognosis (Sebastiani et al., 2006)
Tissue	Colorectal	44 patients	cDNA microarray; IHC	A significant association of HSP60 with tumor differentiation and pT stage was observed (Mori et al., 2005)
Tissue, cell line	Prostate	120 patients; 60 controls	IHC; WB	No correlation was found between levels of HSP60 expression and phenotypic behavior of individual primary prostatic cancers (Cornford et al., 2000)
Tissue	Breast	101 patients; 13 controls	WB; IHC	Increased expression of HSP60 compared with controls. HSP60 correlated with patient overall survival (Isidoro et al., 2005)
Tissue	HCC	38 patients	IHC, DI	Expression of HSP60 decreased during hepatocarcinogenesis (Lim et al., 2005)
Serum, tissue, cell line	Breast; ovarian; prostate; ductal carcinoma	147 patients; 93 controls	ELISA; WB; IHC	HSP60 was overexpressed during the first steps of breast carcinogenesis (Desmetz et al., 2008)
Serum cell line	Breast	40 patients; 42 controls	IHC; MALDI-TOF-MS; 2-DE	Significantly higher level of autoantibodies against HSP60 in breast cancer patient sera (Hamrita et al., 2008)

Techniques are: 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis; DI, dot immunoblot; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IHC, immunohistochemical analyses; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight – mass spectrometry; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; TMA, tissue microarray; WB, western blot.

Seigneuric et al., 2011). HSP70 could be an interesting biomarker because its overexpression in serum is associated with many cancers. However, these studies are mostly qualitative. HSP70 is considered to be the most universally stress inducible HSP (Suzuki et al., 2006) with reported inductions of over 200-fold (Modi et al., 2007). A few clinical articles provide quantitative data on HSP70 expression based on ELISA tests (see **Table 3**). The relatively large case–control study nested in the Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk (Suzuki et al., 2006) reports HSP70 levels in the serum of lung cancer patients in comparison with the C-reactive protein (CRP). The data indicate mean levels of 2.41 ng/mL ($n = 189$) for cases versus 2.01 ng/mL ($n = 377$) for controls. This is to be compared to smaller differences in the CRP levels: 0.92 ng/mL ($n = 209$) versus 0.81 ng/mL ($n = 425$) respectively (Suzuki et al., 2006). In colorectal cancer, the difference in serum levels of HSP70 between patients who survived (1.51 ng/mL, $n = 95$) compared to patients who did not survive (1.84 ng/mL, $n = 84$) was reported to be significant ($P = 0.014$; Kocsis et al., 2010). ELISA-determined concentrations of serum HSP70 autoantibody were reported to be significantly higher in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patients (0.412 mg/mL, $n = 16$) than for patients with gastric cancer (0.236 mg/mL, $n = 17$, $P < 0.001$), colon cancer (0.231 mg/mL, $n = 19$, $P < 0.001$), or healthy individuals (0.207 mg/mL, $n = 13$, $P < 0.001$; Fujita et al., 2008). Albeit limited in the number of patients and controls, this study suggests the presence of autoantibody against HSP70 in the serum of ESCC patients.

HSP90

HSP90 is an ATP-dependent chaperone that has been highly studied for anticancer therapy (Kamal et al., 2003; Solit and Chiosis, 2008; Jago et al., 2010) with targeted inhibitors being tested in clinical trials in phase II/III. HSP90 ensures the quality control of many proteins involved in cell-signaling pathways. It is also essential for the stability and function of many oncogenic client proteins (Taipale et al., 2010). Its expression in malignant cells is reported to be high and constitutive, suggesting a crucial role in survival and growth of cancer cells (Whitesell and Lindquist, 2005). Studies have investigated the potential prognostic value of HSP90 in different cancers as shown in **Table 4**. In invasive breast cancers, immunohistochemical analyses showed that HSP90 was abundantly expressed in all tumor samples included in the study (Song et al., 2010). A trend toward correlation ($P = 0.062$) was identified between HSP90 expression and diminished relapse-free survival (RFS) in the triple negative subtype (HER-, ER-, PR-). In patients with HER+ (tumors HER2-clustered), the coexpression of HSP90 and PI3K-p110 (or loss of PTEN) predicted a significantly decreased RFS. In line with these results, it was suggested that HSP90 overexpression in malignant breast cancer was associated with decreased survival (Pick et al., 2007). Concerning hepatocellular carcinoma, Lim et al. (2005) suggested that HSP90 expression increases along with the progression of hepatocarcinogenesis. In fact, HSP90 expression showed a strong correlation with prognostic factors of hepatocellular carcinoma, being associated with vascular invasion and metastasis. Similar findings were observed in bladder cancer, where HSP90 level was correlated with

Table 3 | Selection of recent publications assessing HSP70 as a biomarker in cancers.

Sample type	Cancer type	Total number of samples	Assay	Finding/claim (References)
Biopsy	HCC	176 patients	IHC	A panel of HSP70 + glypican 3 + glutamine synthetase proved useful to detect well-differentiated HCC in biopsy (DiTommaso et al., 2009)
Tissue	Bladder	42 patients; 10 controls	IHC	No correlation was found with tumor grade, disease stage, and patient outcome (Lebret et al., 2003)
Tissue	Prostate	193 patients	IHC	Significant association with either no or limited prognostic parameters (Miyake et al., 2010)
Tissue	Prostate	120 patients; 60 controls	IHC	No correlation was found between levels of HSP70 expression and phenotypic behavior of individual primary prostatic cancers (Cornford et al., 2000)
Tissue	HCC	38 patients	IHC, DI	Positive correlation between HSP70 expression and prognostic factors of hepatitis B virus-related HCC (Lim et al., 2005)
Serum	Lung	189 patients; 377 controls	ELISA	High levels of serum HSP70 might be associated with increased risk of lung cancer among Japanese males (Suzuki et al., 2006)
Serum	ESCC	16 patients; 13 controls	ELISA; 2-DE; WB; MALDI-TOF-MS, IHC	Concentrations of serum HSP70 autoantibody were significantly higher for patients with ESCC than for patients with gastric or colon cancer or healthy individuals (Fujita et al., 2008)
Serum	Colorectal	179 patients	ELISA	Serum level of soluble HSP70 may be a stage-independent prognostic marker in colorectal cancer without distant metastasis (Kocsis et al., 2010)

Techniques are: 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IHC, immunohistochemical analyses; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight – mass spectrometry; DI, dot immunoblot; WB, western blot. ESCC, esophageal squamous cell carcinoma; HCC, hepatocellular carcinoma.

high grade tumor (Lebret et al., 2003). In studies on ovarian cancer, HSP90 expression was associated with higher stages, and so may be a good indicator of aggressiveness when associated with other HSPs (Elpek et al., 2003).

HSPs AS BIOMARKERS: HEADING FOR GOLD (STANDARDS)?

The ever increasing body of data dealing with HSPs reflects their potential as both therapeutic targets and as biomarkers. We have highlighted only some of the many interesting points, and identified some pitfalls that are recurrent in many research fields (Ioannidis, 2005; Mischak et al., 2010), and which should be addressed to clarify future work concerning HSP detection.

For the validation of most results presented here, it is crucial that large-scale studies be performed to confirm these findings (Ioannidis, 2005; Mischak et al., 2010). This review of recent research articles on HSP detection in cancer reveals that the most frequently used techniques are essentially qualitative. Overall, IHC staining seems the most frequently used, regardless of the HSP of

interest. The two main disadvantages of IHC staining are that the results are qualitative and subjective, like any image analysis. ELISA tests should be favored to provide more objective, quantitative data.

How specific are HSPs as biomarkers in cancer? HSPs are key proteins that tend to be overexpressed in response to a large panel of stressors. They are thus by definition not specific to cancer. However, it is shown that HSPs are necessary for cancer cell survival, making cancer cells in fact addicted to these cytoprotective chaperones. As a consequence, cancer cells express high levels of HSPs compared to normal cells, and need them for survival. It is clear that no single biomarker will be sufficient to detect cancer, its relapse or monitor a treatment (Seigneuric et al., 2010). An alternative, then, is to combine different biomarkers on the same level, (e.g., at the protein level) as exemplified by DNA microarrays and “omics” in general (Seigneuric et al., 2009). Another way to deal with the inherent lack of specificity of a single protein is to combine it with biomarkers from

Table 4 | Selection of recent publications assessing HSP90 as a biomarker in cancers.

Sample type	Cancer type	Total number of samples	Assay	Finding/claim (References)
Tissue	Bladder	42 patients; 10 controls	IHC	HSP90 expression levels correlated with tumor infiltration (Lebret et al., 2003)
Tissue	HCC	38 patients	IHC; DI	Positive correlation between HSP90 expression and prognostic factors of hepatitis B virus-related HCC (Lim et al., 2005)
Tissue	Breast	212 patients	IHC	Expression of HSP90 was associated with 5-year relapse-free survival (RFS). Coexpression of HSP90 and PI3K or expression of HSP90 along with PTEN loss demonstrated prognostic significance in terms of RFS in patients with HER2-positive cancers, but not with HER2-negative cancer (Song et al., 2010)
Tissue	RCC	153 patients	IHC	HSP90 was expressed in most RCC specimens. No significant association with conventional diagnostic factors (Sakai et al., 2009)
Tissue	Prostate	193 patients	IHC	No significant association of HSP90 expression levels with conventional diagnostic factors (Miyake et al., 2010)
Tissue	Ovarian	52 patients	IHC	HSP90 expression was associated with higher stages but did not correlate with prognosis (Elpek et al., 2003)
Tissue cell line	Breast	655 patients	IHC; WB	High HSP90 expression was associated with decreased survival in primary breast cancer (Pick et al., 2007)

Techniques are: IHC, immunohistochemical analyses; DI, dot immunoblot; WB, western blot. HCC, hepatocellular carcinoma; RCC, renal cell carcinoma.

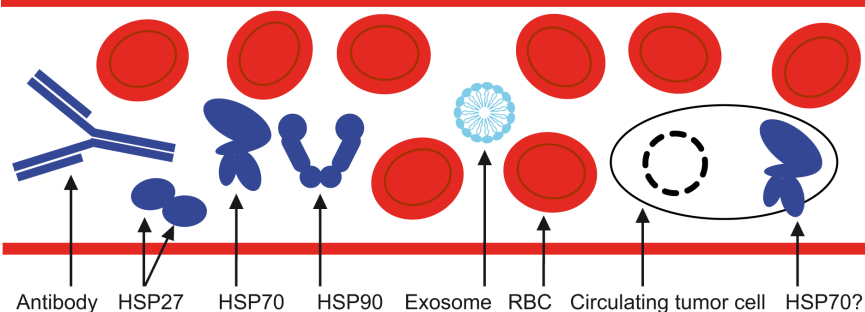


FIGURE 2 | Peripheral blood is a biological fluid of high interest for HSP detection in oncology since its composition besides red blood cells or RBCs is reported to include, circulating HSP antibodies and autoantibodies, HSP27, HSP70, and HSP90, as well as tumor-derived

exosomes expressing HSP70 at the membrane. The presence of circulating tumor cells expressing HSP70 at their membrane remains to be demonstrated but may be complementary to the EpCAM biomarker, which is currently in clinical trials.

other levels (see **Figure 2**). For instance, HSP expression at the protein level could be integrated with the measurement of tumor-derived exosomes expressing HSP70 in the membrane. Circulating tumor cells (CTCs) represent another very interesting level. Critical to embryogenesis, cancer cells are thought to undergo an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) during carcinogenesis, contributing to invasion and metastasis (Thiery, 2002; Thiery et al., 2009). Indeed, altered cell–cell and cell–extracellular interactions would enable: (i) the release of epithelial cells, or the “seed” (Fidler, 2003) from the surrounding tissue, (e.g., primary tumor), (ii) entering the circulation (intravasation), (iii) exiting the circulation (extravasation), (iv) the colonization of distant organs (Fidler, 2003). Current clinical investigations into the detection of CTCs are based on the cell receptor EpCAM (Seigneuric et al., 2010). However, EpCAM expression is supposed to decrease during the circulation of CTCs in peripheral blood (or lymph), as reported with flow cytometry experiments (Rao et al., 2005). This may lead to suboptimal detection of CTCs. The process of EMT is well documented in cell lines and mice experiments, but its clinical relevance remains debated (Ledford, 2011). In contrast to normal cells, epithelial cancer cells circulating in a liquid environment should have increased levels of membrane HSP. Although this hypothesis remains to be tested, it would represent an interesting means to robustly detect CTCs based on HSPs expression at the cell membrane. HSP70 is a strong candidate as various cancer cell lines express a fragment of HSP70 at their membrane that can be detected by an antibody (Stangl et al., 2011). This is of high interest for cancer detection, as it enables a means of characterization by flow cytometry and ELISA tests.

Heat shock proteins are essential proteins that are highly conserved, but their expression levels between individuals is reported to differ widely for HSP60 (Shamaei-Tousi et al., 2007), HSP70 (Modi et al., 2007), and/or HSP90 (Ramanathan et al., 2010). The problem of this intrinsic variability in HSP expression may be circumvented by using time series, assessing HSPs with longitudinal data by following-up every single patient as a function of time. In order to compare HSP levels between patients, adjusting for age, gender, and ethnicity may be necessary. The role of circulating HSP70 and/or HSP70 antibodies in the peripheral circulation in the context of aging is interesting (Pockley et al., 1998). Reported ranges of HSP70 expression largely differ. Indeed, discrepancies up to a few orders of magnitude, varying from a few ng/mL (Terry et al., 2006) to values 10 to a 100 times higher were reported (Rea et al., 2001; Njemini et al., 2005), possibly due to ELISA matrix defects (Njemini et al., 2005). However, the serum concentration of HSP70 is reported to decrease with age (Rea et al., 2001; Macario and Conway de Macario, 2005; Terry et al., 2006; Njemini et al., 2011) as is serum HSP60 (Macario and Conway de Macario, 2005). The gender issue should be also addressed. For instance, a 3.5 times higher expression of circulating HSP60 was found in women’s peripheral blood compared to men (Macario and Conway de Macario, 2005). In addition, HSP70 serum concentrations in women were about twice those in men (Pockley et al., 1998). The study of Suzuki et al. (2006) reported differences in serum HSP70 levels in cancer patients. The authors reported 2.46 ng/mL ($n = 146$)

in male versus 2.25 ng/mL ($n = 43$) in females. For healthy controls however, serum HSP70 levels were quite similar: 2.00 ng/mL ($n = 285$) and 2.06 ng/mL ($n = 92$) respectively (Suzuki et al., 2006).

For an HSP to qualify as a cancer biomarker, its expression level must be compared to gold standards or to commonly assessed biomolecules. A circulating HSP should be compared to other proteins such as CRP, a systemic and non-specific marker of chronic inflammation (Chaturvedi et al., 2010) used daily in practice, or CA 15-3 (cancer antigen 15-3) or CA125 (cancer antigen 125), which are widely used biomarkers for breast (Duffy, 2006) and ovarian cancer (Petricoin et al., 2002), respectively.

CONCLUDING REMARKS

Research studies in cancer detection rely heavily on the identification of proteins, but how many proteins are in fact uniquely expressed by cancer but not normal cells? Presumably, their proteomes are shared at least to some extent, thus favoring quantitative rather than qualitative techniques to reveal subtle differences in expression levels currently found in the pico- to sub-nanomolar range (Krueger, 2006). It is likely that HSPs will not discern different cancer types. However, this may be seen as the major advantage of HSPs: a potentially universal family of cancer biomarkers.

Since the data amassed during the past half century is essentially qualitative, it is too early to suggest which HSP or combination of HSPs may show promise in the future. Yet, even though many studies focus on HSP60, we suggest focusing rather on inducible HSPs that are seldom present in non-stressed normal cells. Among these, HSP70 seems to be particularly interesting as it is the most abundant inducible HSP in cancer cells and is also present in the membrane of cancer cells but not in non-transformed cells. In contrast to the common strategy relying on the combination of several cancer biomarkers (Fung et al., 2007; Seigneuric et al., 2009, 2010), HSP70 could allow a detection at different levels: circulating protein, tumor-derived exosomes, and CTCs. Of course, these assays need to be optimized and standardized. Furthermore, their sensitivity and specificity should be addressed. As we recently have shown, another interesting inducible HSP may be HSP110 whose expression can be used for the diagnosis of colon cancer patients presenting micro-satellite instability (Dorard et al., 2011).

Because many HSP studies utilize a small number of samples, there is a real need to coordinate studies and conduct large prospective clinical trials assessing for diagnosis, follow-up, or response to treatment not only HSPs but also other potential biomarkers simultaneously using quantitative methods. One option is the design of surface plasmon resonance techniques measuring several proteins in parallel (Seigneuric et al., 2010) as well as tumor-exosomes and CTCs in biological fluids.

These are new and interesting frontiers worth investigating that may offer the opportunity to detect cancer early danger signals.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC), Conseil Régional de Bourgogne, and the European Commission’s Seventh Framework Programme (SPEDOC 248835). Carmen Garrido’s team has the Label d’excellence de la LNCC.

REFERENCES

- Arispe, N., Doh, M., Simakova, O., Kurganov, B., and De Maio, A. (2004). Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *FASEB J.* 18, 1636–1645.
- Banerjee, S., Lin, C. F., Skinner, K. A., Schiffhauer, L. M., Peacock, J., Hicks, D. G., Redmond, E. M., Morrow, D., Huston, A., Shayne, M., Langstein, H. N., Miller-Graziano, C. L., Strickland, J., O'Donoghue, L., and De, A. K. (2011). Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res.* 71, 318–327.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *Int. Immunol.* 12, 1539–1546.
- Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* 2, 645–652.
- Calderwood, S. K. (2010). Heat shock proteins in breast cancer progression – a suitable case for treatment? *Int. J. Hyperthermia* 26, 681–685.
- Castilla, C., Congregado, B., Conde, J. M., Medina, R., Torrubia, F. J., Japon, M. A., and Saez, C. (2010). Immunohistochemical expression of Hsp60 correlates with tumor progression and hormone resistance in prostate cancer. *Urology* 76, e1–e6.
- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J. P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., De Thonel, A., Multhoff, G., Hamman, A., Martin, F., Chaffert, B., Solary, E., Zitvogel, L., Garrido, C., Ryffel, B., Borg, C., Apetoh, L., Rebe, C., and Ghiringhelli, F. (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J. Clin. Invest.* 120, 457–471.
- Chaturvedi, A. K., Caporaso, N. E., Katki, H. A., Wong, H. L., Chatterjee, N., Pine, S. R., Chanock, S. J., Goedert, J. J., and Engels, E. A. (2010). C-reactive protein and risk of lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 2719–2726.
- Ciocca, D. R., and Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10, 86–103.
- Cornford, P. A., Dodson, A. R., Parsons, K. F., Desmond, A. D., Woolfenden, A., Fordham, M., Neoptolemos, J. P., Ke, Y., and Foster, C. S. (2000). Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res.* 60, 7099–7105.
- De Maio, A. (2011). Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the stress observation system: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones* 16, 235–249.
- Desmetz, C., Bibeau, F., Boissiere, F., Bellet, V., Rouanet, P., Maudelonde, T., Mange, A., and Solassol, J. (2008). Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in early stage breast cancer and ductal carcinoma in situ. *J. Proteome Res.* 7, 3830–3837.
- Di Tommaso, L., Destro, A., Seok, J. Y., Balladore, E., Terracciano, L., Sangiovanni, A., Iavarone, M., Colombo, M., Jang, J. J., Yu, E., Jin, S. Y., Morengi, E., Park, Y. N., and Roncalli, M. (2009). The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 50, 746–754.
- 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. *Curr. Med. Chem.* 14, 2839–2847.
- Dorard, C., de Thonel, A., Collura, A., Marisa, L., Svrcek, M., Lagrange, A., Jogo, G., Wanherdrick, K., Joly, A. L., Buhard, O., Gobbo, J., Penard-Lacronique, V., Zouali, H., Tubacher, E., Kirzin, S., Selves, J., Milano, G., Etienne-Grimaldi, M. C., Bengrine-Lefèvre, L., Louvet, C., Tournigand, C., Lefèvre, J. H., Parc, Y., Turet, E., Fléjou, J. F., Gaub, M. P., Garrido, C., and Duval, A. (2011). Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat. Med.* doi: 10.1038/nm.2457. [Epub ahead of print].
- Duffy, M. J. (2006). Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin. Chem.* 52, 345–351.
- Elpek, G. O., Karaveli, S., Simsek, T., Keles, N., and Aksoy, N. H. (2003). Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries. *APMIS* 111, 523–530.
- Evdonin, A. L., Martynova, M. G., Bystrova, O. A., Guzova, I. V., Margulis, B. A., and Medvedeva, N. D. (2006). The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 443–455.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.
- Fujita, Y., Nakanishi, T., Miyamoto, Y., Hiramatsu, M., Mabuchi, H., Miyamoto, A., Shimizu, A., Takubo, T., and Tanigawa, N. (2008). Proteomics-based identification of autoantibody against heat shock protein 70 as a diagnostic marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 263, 280–290.
- Fung, G., Seigneuric, R., Krishnan, S., Rao, R. B., Wouters, B. G., and Lambin, P. (2007). “Reducing a biomarkers list via mathematical programming: application to gene signatures to detect time-dependent hypoxia in cancer,” in *Icmla 2007: Sixth International Conference On Machine Learning And Applications, Proceedings*, Cincinnati, OH, 482–487.
- Gallucci, S., and Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 114–119.
- 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.
- Ghayour-Mobarhan, M., Saber, H., and Ferns, G. A. (2011). The potential role of heat shock protein 27 in cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta.* doi:10.1016/j.cca.2011.04.005. [Epub ahead of print].
- Glaessen, A., Jonmarker, S., Lindberg, A., Nilsson, B., Lewensohn, R., Ekman, P., Valdman, A., and Egevad, L. (2008). Heat shock proteins 27, 60 and 70 as prognostic markers of prostate cancer. *APMIS* 116, 888–895.
- Hamrita, B., Chahed, K., Kabbage, M., Guillier, C. L., Trimeche, M., Chaieb, A., and Chouchane, L. (2008). Identification of tumor antigens that elicit a humoral immune response in breast cancer patients' sera by serological proteome analysis (SERPA). *Clin. Chim. Acta* 393, 95–102.
- Hightower, L. E., and Guidon, P. T. Jr. (1989). Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J. Cell. Physiol.* 138, 257–266.
- Hunter-Lavin, C., Davies, E. L., Baccalar, M. M., Marshall, M. J., Andrew, S. M., and Williams, J. H. (2004). Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 511–517.
- Hwang, Y. J., Lee, S. P., Kim, S. Y., Choi, Y. H., Kim, M. J., Lee, C. H., Lee, J. Y., and Kim, D. Y. (2009). Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer. *Yonsei Med. J.* 50, 399–406.
- Ioannidis, J. P. (2005). Why most published research findings are false. *PLoS Med.* 2, e124. doi:10.1371/journal.pmed.0020124
- Isidoro, A., Casado, E., Redondo, A., Acebo, P., Espinosa, E., Alonso, A. M., Cejas, P., Hardison, D., Fresno Vara, J. A., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M., and Cuezva, J. M. (2005). Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26, 2095–2104.
- Jego, G., Hazoum, A., Seigneuric, R., and Garrido, C. (2010). Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* [Epub ahead of print].
- Joly, A. L., Wettstein, G., Mignot, G., Ghiringhelli, F., and Garrido, C. (2010). Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J. Innate Immun.* 2, 238–247.
- 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.
- Khalil, A. A., Kabapy, N. F., Deraz, S. F., and Smith, C. (2011). Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim. Biophys. Acta* 1816, 89–104.
- Kocsis, J., Madaras, B., Toth, E. K., Fust, G., and Prohaszka, Z. (2010). Serum level of soluble 70-kD heat shock protein is associated with high mortality in patients with colorectal cancer without distant metastasis. *Cell Stress Chaperones* 15, 143–151.
- Krueger, K. E. (2006). The potential of serum proteomics for detection of cancer: promise or only hope? *Onkologie* 29, 498–499.
- Langdon, S. P., Rabiasz, G. J., Hirst, G. L., King, R. J., Hawkins, R. A., Smyth, J. F., and Miller, W. R. (1995). Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 1603–1609.

- Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P., and Garrido, C. (2010). Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *ScientificWorldJournal* 10, 1543–1552.
- Lebret, T., Watson, R. W., Molinie, V., O'Neill, A., Gabriel, C., Fitzpatrick, J. M., and Botto, H. (2003). Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer* 98, 970–977.
- Ledford, H. (2011). Cancer theory faces doubts. *Nature* 472, 273.
- Lee, I. N., Chen, C. H., Sheu, J. C., Lee, H. S., Huang, G. T., Yu, C. Y., Lu, F. J., and Chow, L. P. (2005). Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 4, 2062–2069.
- Lim, S. O., Park, S. G., Yoo, J. H., Park, Y. M., Kim, H. J., Jang, K. T., Cho, J. W., Yoo, B. C., Jung, G. H., and Park, C. K. (2005). Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J. Gastroenterol.* 11, 2072–2079.
- Looi, K. S., Nakayasu, E. S., Diaz, R. A., Tan, E. M., Almeida, I. C., and Zhang, J. Y. (2008). Using proteomic approach to identify tumor-associated antigens as markers in hepatocellular carcinoma. *J. Proteome Res.* 7, 4004–4012.
- Macario, A. J., Cappello, F., Zummo, G., and Conway de Macario, E. (2011). Chaperonopathies of senescence and the scrambling of interactions between the chaperoning and the immune systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1197, 85–93.
- Macario, A. J., and Conway de Macario, E. (2004). The pathology of cellular anti-stress mechanisms: a new frontier. *Stress* 7, 243–249.
- Macario, A. J., and Conway de Macario, E. (2005). Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N. Engl. J. Med.* 353, 1489–1501.
- Mambula, S. S., and Calderwood, S. K. (2006). Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J. Immunol.* 177, 7849–7857.
- Mischak, H., Allmaier, G., Apweiler, R., Attwood, T., Baumann, M., Benigni, A., Bennett, S. E., Bischoff, R., Bongcam-Rudloff, E., Capasso, G., Coon, J. J., D'Haese, P., Dominiczak, A. F., Dakna, M., Dihazi, H., Ehrlich, J. H., Fernandez-Llama, P., Fliser, D., Frokiaer, J., Garin, J., Girolami, M., Hancock, W. S., Haubitz, M., Hochstrasser, D., Holman, R. R., Ioannidis, J. P., Jankowski, J., Julian, B. A., Klein, J. B., Kolch, W., Luider, T., Massy, Z., Mattes, W. B., Molina, F., Monsarrat, B., Novak, J., Peter, K., Rossing, P., Sanchez-Carbayo, M., Schanstra, J. P., Semmes, O. J., Spasovski, G., Theodorescu, D., Thongboonkerd, V., Vanholder, R., Veenstra, T. D., Weissinger, E., Yamamoto, T., and Vlahou, A. (2010). Recommendations for biomarker identification and qualification in clinical proteomics. *Sci. Transl. Med.* 2, 46ps42.
- Miyake, H., Muramaki, M., Kurahashi, T., Takenaka, A., and Fujisawa, M. (2010). Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urol. Oncol.* 28, 145–151.
- Miyake, H., Muramaki, M., Kurahashi, T., Yamanaka, K., Hara, I., and Fujisawa, M. (2006). Enhanced expression of heat shock protein 27 following neoadjuvant hormonal therapy is associated with poor clinical outcome in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *Anticancer Res.* 26, 1583–1587.
- Modi, S., Stopeck, A. T., Gordon, M. S., Mendelson, D., Solit, D. B., Bagatell, R., Ma, W., Wheeler, J., Rosen, N., Norton, L., Cropp, G. F., Johnson, R. G., Hannah, A. L., and Hudis, C. A. (2007). Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study. *J. Clin. Oncol.* 25, 5410–5417.
- Mori, D., Nakafusa, Y., Miyazaki, K., and Tokunaga, O. (2005). Differential expression of Janus kinase 3 (JAK3), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), heat shock protein 60 (HSP60), and mouse double minute 2 (MDM2) in human colorectal cancer progression using human cancer cDNA microarrays. *Pathol. Res. Pract.* 201, 777–789.
- Nickel, W., and Sedorf, M. (2008). Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 287–308.
- Njemini, R., Bautmans, I., Onyema, O. O., Van Puyvelde, K., Demanet, C., and Mets, T. (2011). Circulating heat shock protein 70 in health, aging and disease. *BMC Immunol.* 12, 24. doi:10.1186/1471-2172-12-24
- Njemini, R., Demanet, C., and Mets, T. (2005). Comparison of two ELISAs for the determination of Hsp70 in serum. *J. Immunol. Methods* 306, 176–182.
- Olejek, A., Damasiewicz-Bodzek, A., Bodzek, P., Wielkoszynski, T., Zamblynski, J., Stoltny, P., and Skutil, M. (2009). Concentrations of antibodies against heat shock protein 27 in the sera of women with ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* 19, 1516–1520.
- Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., Levine, P. J., Fusaro, V. A., Steinberg, S. M., Mills, G. B., Simone, C., Fishman, D. A., Kohn, E. C., and Liotta, L. A. (2002). Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359, 572–577.
- Pick, E., Kluger, Y., Giltneane, J. M., Moeder, C., Camp, R. L., Rimm, D. L., and Kluger, H. M. (2007). High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.* 67, 2932–2937.
- Pockley, A. G., Shepherd, J., and Corton, J. M. (1998). Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol. Invest.* 27, 367–377.
- Ramanathan, R. K., Egorin, M. J., Erlichman, C., Remick, S. C., Ramalingam, S. S., Naret, C., Holleran, J. L., TenEyck, C. J., Ivy, S. P., and Belani, C. P. (2010). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat-shock protein 90, in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 28, 1520–1526.
- Rao, C. G., Chianese, D., Doyle, G. V., Miller, M. C., Russell, T., Sanders, R. A. Jr., and Terstappen, L. W. (2005). Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int. J. Oncol.* 27, 49–57.
- Rea, I. M., McNerlan, S., and Pockley, A. G. (2001). Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Exp. Gerontol.* 36, 341–352.
- Rui, Z., Jian-Guo, J., Yuan-Peng, T., Hai, P., and Bing-Gen, R. (2003). Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. *Proteomics* 3, 433–439.
- Sakai, I., Miyake, H., Takenaka, A., and Fujisawa, M. (2009). Expression of potential molecular markers in renal cell carcinoma: impact on clinicopathological outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int.* 104, 942–946.
- Schilling, D., Gehrmann, M., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, A. G., Abend, M., Molls, M., and Multhoff, G. (2009). Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells. *FASEB J.* 23, 2467–2477.
- Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G., and Garrido, C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* 81, 15–27.
- Sebastiani, V., Botti, C., Di Tondo, U., Visca, P., Pizzuti, L., Santeusano, G., and Alo, P. L. (2006). Tissue microarray analysis of FAS, Bcl-2, Bcl-x, ER, PgR, Hsp60, p53 and Her2-neu in breast carcinoma. *Anticancer Res.* 26, 2983–2987.
- Seigneuric, R., Gobbo, J., Colas, P., and Garrido, C. (2011). Targeting cancer with peptide aptamers. *Oncotarget* 2, 557–561.
- Seigneuric, R., Markey, L., Nuyten, D. S., Dubernet, C., Evelo, C. T., Finot, E., and Garrido, C. (2010). From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research. *Curr. Mol. Med.* 10, 640–652.
- Seigneuric, R., van Riel, N. A. W., Starman, M. H. W., van Erk, A., Evelo, C. T. A., Wouters, B. G., and Lambin, P. (2009). *Systems Biology Applied to Cancer Research*. Hershey, NY: Medical Information Science Reference.
- Shamaei-Tousi, A., Steptoe, A., O'Donnell, K., Palmén, J., Stephens, J. W., Hurel, S. J., Marmot, M., Homer, K., D'Aiuto, E., Coates, A. R., Humphries, S. E., and Henderson, B. (2007). Plasma heat shock protein 60 and cardiovascular disease risk: the role of psychosocial, genetic, and biological factors. *Cell Stress Chaperones* 12, 384–392.
- Solit, D. B., and Chiosis, G. (2008). Development and application of Hsp90 inhibitors. *Drug Discov. Today* 13, 38–43.
- Song, C. H., Park, S. Y., Eom, K. Y., Kim, J. H., Kim, S. W., Kim, J. S., and Kim, I. A. (2010). Potential prognostic value of heat-shock protein 90 in the presence of phosphatidylinositol-3-kinase overexpression or loss of PTEN, in invasive breast cancers. *Breast Cancer Res.* 12, R20.
- Stangl, S., Gehrmann, M., Riegger, J., Kuhs, K., Riederer, I., Sievert, W., Hube, K., Mocikat, R., Dresel, R., Kremmer, E., Pockley, A. G., Friedrich, L., Vigh, L., Skerra, A., and Multhoff, G. (2011). Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 733–738.

- Suzuki, K., Ito, Y., Wakai, K., Kawado, M., Hashimoto, S., Seki, N., Ando, M., Nishino, Y., Kondo, T., Watanabe, Y., Ozasa, K., Inoue, T., and Tamakoshi, A. (2006). Serum heat shock protein 70 levels and lung cancer risk: a case-control study nested in a large cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 1733–1737.
- Taipale, M., Jarosz, D. F., and Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 515–528.
- Terry, D. F., Wyszynski, D. F., Nolan, V. G., Atzmon, G., Schoenhofen, E. A., Pennington, J. Y., Andersen, S. L., Wilcox, M. A., Farrer, L. A., Barzilai, N., Baldwin, C. T., and Asea, A. (2006). Serum heat shock protein 70 level as a biomarker of exceptional longevity. *Mech. Ageing Dev.* 127, 862–868.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.
- Vega, V. L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., and De Maio, A. (2008). Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J. Immunol.* 180, 4299–4307.
- Whitesell, L., and Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 761–772.
- Willis, M. S., and Patterson, C. (2010). Hold me tight: role of the heat shock protein family of chaperones in cardiac disease. *Circulation* 122, 1740–1751.
- Xu, L., Chen, S., and Bergan, R. C. (2006). MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* 25, 2987–2998.

Received: 29 July 2011; accepted: 30 September 2011; published online: 10 November 2011.

Citation: Seigneuric R, Mjahed H, Gobbo J, Joly A-L, Berthenet K, Shirley S and Garrido C (2011) Heat shock proteins as danger signals for cancer detection. *Front. Oncol.* 1:37. doi: 10.3389/fonc.2011.00037

This article was submitted to *Frontiers in Molecular and Cellular Oncology*, a specialty of *Frontiers in Oncology*.

Copyright © 2011 Seigneuric, Mjahed, Gobbo, Joly, Berthenet, Shirley and Garrido. This is an open-access article subject to a non-exclusive license between the authors and Frontiers Media SA, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and other Frontiers conditions are complied with.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Bibliographie

- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Laheesmaa, R., Norman, M., ... Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(3), 1969–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641064>
- Amin, J., Ananthan, J., & Voellmy, R. (1988). Key Features of Heat Shock Regulatory Elements, 8(9). doi:10.1128/MCB.8.9.3761.Updated
- Andre, F., Escudier, B., Angevin, E., Tursz, T., & Zitvogel, L. (2004). Exosomes for cancer immunotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 15 Suppl 4(Supplement 4), iv141–4. doi:10.1093/annonc/mdh918
- Appert, A., Nam, C.-H., Lobato, N., Priego, E., Miguel, R. N., Blundell, T., ... Rabbitts, T. (2009). Targeting LMO2 with a peptide aptamer establishes a necessary function in overt T-cell neoplasia. *Cancer research*, 69(11), 4784–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4774
- Asea, A., Kabingu, E., Stevenson, M. A., & Calderwood, S. K. (2000). HSP70 peptidbearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell stress & chaperones*, 5(5), 425–31. Retrieved from /pmc/articles/PMC312872/?report=abstract
- Asea, Alexander, Jean-Pierre, C., Kaur, P., Rao, P., Linhares, I. M., Skupski, D., & Witkin, S. S. (2008). Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *Journal of reproductive immunology*, 79(1), 12–7. doi:10.1016/j.jri.2008.06.001
- Bagatell, R., & Whitesell, L. (2004). Altered Hsp90 function in cancer : A unique therapeutic opportunity Minireview Altered Hsp90 function in cancer : A unique therapeutic opportunity, 1021–1030.
- Baines, I. C., & Colas, P. (2006). Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug discovery today*, 11(7-8), 334–41. doi:10.1016/j.drudis.2006.02.007
- Balaburski, G. M., Leu, J. I.-J., Beeharry, N., Hayik, S., Andrade, M. D., Zhang, G., ... Murphy, M. E. (2013). A modified HSP70 inhibitor shows broad activity as an anticancer agent. *Molecular cancer research : MCR*. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0547-T
- Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.-J., Pomeroy, S. L., Breakefield, X. O., & Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature communications*, 2, 180. doi:10.1038/ncomms1180
- Barrott, J. J., & Haystead, T. a J. (2013). Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *The FEBS journal*, 280(6), 1381–96. doi:10.1111/febs.12147
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., & Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins , which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway, 12(11), 1539–1546.

- Bausinger, H., Lipsker, D., Ziylan, U., Manié, S., Briand, J.-P., Cazenave, J.-P., ... Hanau, D. (2002). Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *European journal of immunology*, 32(12), 3708–13. doi:10.1002/1521-4141(200212)32:12<3708::AID-IMMU3708>3.0.CO;2-C
- Baylot, V., Andrieu, C., Katsogiannou, M., Taieb, D., Garcia, S., Giusiano, S., ... Rocchi, P. (2011). OGX-427 inhibits tumor progression and enhances gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer. *Cell death & disease*, 2, e221. doi:10.1038/cddis.2011.104
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., ... 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(8), 469–75. doi:10.1038/35019501
- Bendz, H., Ruhland, S. C., Maya, J., Hainzl, O., Riegelsberger, S., Braüchle, C., ... Issels, R. D. (2007). Human Heat Shock Protein 70 Enhances Tumor Antigen Presentation through Complex Formation and Intracellular Antigen Delivery without Innate Immune Signaling * □. doi:10.1074/jbc.M704129200
- Binder, R. J., Blachere, N. E., & Srivastava, P. K. (2001). Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *The Journal of biological chemistry*, 276(20), 17163–71. doi:10.1074/jbc.M011547200
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 12(12), 1659–68. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x
- Borges, T. J., Wieten, L., van Herwijnen, M. J. C., Broere, F., van der Zee, R., Bonorino, C., & van Eden, W. (2012). The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Frontiers in immunology*, 3(May), 95. doi:10.3389/fimmu.2012.00095
- Bottoni, P., Giardina, B., & Scatena, R. (2009). Proteomic profiling of heat shock proteins: An emerging molecular approach with direct pathophysiological and clinical implications. *Proteomics. Clinical applications*, 3(6), 636–53. doi:10.1002/prca.200800195
- Braunstein, M. J., Scott, S. S., Scott, C. M., Behrman, S., Walter, P., Wipf, P., ... Batuman, O. (2011). Antimyeloma Effects of the Heat Shock Protein 70 Molecular Chaperone Inhibitor MAL3-101. *Journal of oncology*, 2011, 232037. doi:10.1155/2011/232037
- Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., ... Garrido, C. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature cell biology*, 2(9), 645–52. doi:10.1038/35023595
- Brunet Simioni, M., De Thonel, a, Hammann, a, Joly, a L., Bossis, G., Fourmaux, E., ... 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(37), 3332–44. doi:10.1038/onc.2009.188
- Buschow, S. I., Nolte-’t Hoen, E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., ... Stoorvogel, W. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(10), 1528–42. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x

- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Boireau, W., ... Ghiringhelli, F. (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells, *120*(2), 457–471. doi:10.1172/JCI40483DS1
- Chaput, N., & Théry, C. (2011). Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in immunopathology*, *33*(5), 419–40. doi:10.1007/s00281-010-0233-9
- Chen, T., & Cao, X. (2010). Stress for maintaining memory: HSP70 as a mobile messenger for innate and adaptive immunity. *European journal of immunology*, *40*(6), 1541–4. doi:10.1002/eji.201040616
- Colas, P., Cohen, B., Jessen, T., Grishina, I., McCoy, J., & Brent, R. (1996). Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, *380*(6574), 548–50. doi:10.1038/380548a0
- Crawford, M., Woodman, R., & Ko Ferrigno, P. (2003). Peptide aptamers: tools for biology and drug discovery. *Briefings in functional genomics & proteomics*, *2*(1), 72–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15243998>
- Cuenca, A. G., Delano, M. J., Kelly-Scumpia, K. M., Moreno, C., Scumpia, P. O., Laface, D. M., ... Moldawer, L. L. (2011). A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, *17*(3-4), 281–92. doi:10.2119/molmed.2010.00178
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A. B., & Lindquist, S. (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell*, *130*(6), 1005–18. doi:10.1016/j.cell.2007.07.020
- De Maio, A. (2011). Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell stress & chaperones*, *16*(3), 235–49. doi:10.1007/s12192-010-0236-4
- De Maio, A., & Vazquez, D. (2013). Extracellular Heat Shock Proteins: A New Location, a New Function. *Shock (Augusta, Ga.)*. doi:10.1097/SHK.0b013e3182a185ab
- De Thonel, A., Mezger, V., & Garrido, C. (2011). Implication of Heat Shock Factors in Tumorigenesis: Therapeutical Potential. *Cancers*, *3*(4), 1158–1181. doi:10.3390/cancers3011158
- De Thonel, A., Vandekerckhove, J., Lanneau, D., Selvakumar, S., Courtois, G., Hazoume, A., ... Garrido, C. (2010). HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*, *116*(1), 85–96. doi:10.1182/blood-2009-09-241778
- Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A., & Garrido, C. (2006). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handbook of experimental pharmacology*, (172), 171–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16610360>
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, *426*(6968), 884–90. doi:10.1038/nature02261
- Dorard, C., de Thonel, A., Collura, A., Marisa, L., Svrcek, M., Lagrange, A., ... Duval, A. (2011). Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nature medicine*, *17*(10), 1283–9. doi:10.1038/nm.2457

- Duijvesz, D., Luider, T., Bangma, C. H., & Jenster, G. (2011). Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer. *European urology*, *59*(5), 823–31. doi:10.1016/j.eururo.2010.12.031
- Easton, D. P., Kaneko, Y., & Subject, J. R. (2000). The Hsp110 and Grp170 stress proteins : newly recognized relatives of the Hsp70s INTRODUCTION, *5*, 276–290.
- Evans, C. G., Chang, L., & Gestwicki, J. E. (2010). Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *Journal of medicinal chemistry*, *53*(12), 4585–602. doi:10.1021/jm100054f
- Evdonin, A. L., Martynova, M. G., Bystrova, O. A., Guzhova, I. V., Margulis, B. A., & Medvedeva, N. D. (2006). The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules. *European journal of cell biology*, *85*(6), 443–55. doi:10.1016/j.ejcb.2006.02.008
- Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., ... Sadoul, R. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and cellular neurosciences*, *31*(4), 642–8. doi:10.1016/j.mcn.2005.12.003
- Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, M. R., & Rugarli, C. (1992). Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *51*(4), 613–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1601523>
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., ... Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(26), 9683–8. doi:10.1073/pnas.0308413101
- Fewell, S. W., Day, B. W., & Brodsky, J. L. (2001). Identification of an inhibitor of hsc70-mediated protein translocation and ATP hydrolysis. *The Journal of biological chemistry*, *276*(2), 910–4. doi:10.1074/jbc.M008535200
- Floto, R. A., MacAry, P. A., Boname, J. M., Mien, T. S., Kampmann, B., Hair, J. R., ... Lehner, P. J. (2006). Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5. *Science (New York, N.Y.)*, *314*(5798), 454–8. doi:10.1126/science.1133515
- Fujimoto, M., Izu, H., Seki, K., Fukuda, K., Nishida, T., Yamada, S.-I., ... Nakai, A. (2004). HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *The EMBO journal*, *23*(21), 4297–306. doi:10.1038/sj.emboj.7600435
- Gallo, A., & Alevizos, I. (2013). Isolation of circulating microRNA in saliva. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1024*, 183–90. doi:10.1007/978-1-62703-453-1_14
- Gao, B., & Tsan, M.-F. (2003). Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *The Journal of biological chemistry*, *278*(1), 174–9. doi:10.1074/jbc.M208742200
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell death and differentiation*, *13*(9), 1423–33. doi:10.1038/sj.cdd.4401950
- Garrido, C., & Solary, E. (2003). A role of HSPs in apoptosis through “protein triage”? *Cell death and differentiation*, *10*(6), 619–20. doi:10.1038/sj.cdd.4401229

- Garrido, Carmen, Collura, A., Berthenet, K., Lagrange, A., & Duval, A. (2012). Mutation d ' HSP110 dans les cancers colorectaux, 9–46.
- Gehrmann, M., Liebisch, G., Schmitz, G., Anderson, R., Steinem, C., De Maio, A., ... Multhoff, G. (2008). Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PloS one*, 3(4), e1925. doi:10.1371/journal.pone.0001925
- Goloudina, A. R., Demidov, O. N., & Garrido, C. (2012). Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer letters*, 325(2), 117–24. doi:10.1016/j.canlet.2012.06.003
- Guo, F., Sigua, C., Bali, P., George, P., Fiskus, W., Scuto, A., ... Bhalla, K. (2005). Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood*, 105(3), 1246–55. doi:10.1182/blood-2004-05-2041
- Gurbuxani, S., Schmitt, E., Cande, C., Parcellier, A., Hammann, A., Daugas, E., ... Garrido, C. (2003). Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene*, 22(43), 6669–78. doi:10.1038/sj.onc.1206794
- Hannafon, B. N., & Ding, W.-Q. (2013). Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 14240–69. doi:10.3390/ijms140714240
- Hantschel, M., Pfister, K., Jordan, a, Scholz, R., Andreesen, R., Schmitz, G., ... Multhoff, G. (2000). Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell stress & chaperones*, 5(5), 438–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=312874&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hao, S., Ye, Z., Li, F., Meng, Q., Qureshi, M., Yang, J., & Xiang, J. (2006). Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Experimental oncology*, 28(2), 126–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16837903>
- Haug, M., Schepp, C. P., Kalbacher, H., Dannecker, G. E., & Holzer, U. (2007). 70-kDa heat shock proteins: specific interactions with HLA-DR molecules and their peptide fragments. *European journal of immunology*, 37(4), 1053–63. doi:10.1002/eji.200636811
- Henderson, B., Calderwood, S. K., Coates, A. R. M., Cohen, I., van Eden, W., Lehner, T., & Pockley, A. G. (2010). Caught with their PAMPs down? The extracellular signalling actions of molecular chaperones are not due to microbial contaminants. *Cell stress & chaperones*, 15(2), 123–41. doi:10.1007/s12192-009-0137-6
- Hightower, L. E., & Guidon, P. T. (1989). Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *Journal of cellular physiology*, 138(2), 257–66. doi:10.1002/jcp.1041380206
- Ireson, C. R., & Kelland, L. R. (2006). Discovery and development of anticancer aptamers. *Molecular cancer therapeutics*, 5(12), 2957–62. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0172
- Isambert, N., Hollebecque, A., Berge, Y., H, V. I., Brienza, S., Destailats, A., ... Jp, D. (2012). A Phase I study of Debio 0932 , an oral HSP90 inhibitor , in patients with solid tumors, 7, 1168752.

- Jäättelä, M. (1995). Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 60(5), 689–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7860144>
- Jackson, S. E. (2013). Hsp90: structure and function. *Topics in current chemistry*, 328, 155–240. doi:10.1007/128_2012_356
- Jego, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R., & Garrido, C. (2013). Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters*, 332(2), 275–85. doi:10.1016/j.canlet.2010.10.014
- Jhaveri, K., & Modi, S. (2012). *HSP90 inhibitors for cancer therapy and overcoming drug resistance. Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* (Vol. 65, pp. 471–517). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-397927-8.00015-4
- Jinwal, U. K., Miyata, Y., Koren, J., Jones, J. R., Trotter, J. H., Chang, L., ... Dickey, C. a. (2009). Chemical manipulation of hsp70 ATPase activity regulates tau stability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(39), 12079–88. doi:10.1523/JNEUROSCI.3345-09.2009
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry*, 262(19), 9412–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597417>
- Kai, M., Nakatsura, T., Egami, H., Senju, S., Nishimura, Y., & Ogawa, M. (n.d.). Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncology reports*, 10(6), 1777–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534695>
- Kallio, M., Chang, Y., Manuel, M., Alastalo, T.-P., Rallu, M., Gitton, Y., ... Mezger, V. (2002). Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *The EMBO journal*, 21(11), 2591–601. doi:10.1093/emboj/21.11.2591
- Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M. F., Fritz, L. C., & Burrows, F. J. (2003). A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, 425(6956), 407–10. doi:10.1038/nature01913
- Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. a, ... Hightower, L. E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell stress & chaperones*, 14(1), 105–11. doi:10.1007/s12192-008-0068-7
- Kao, J., Ko, E. C., Eisenstein, S., Sikora, A. G., Fu, S., & Chen, S.-H. (2011). Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology. *Critical reviews in oncology/hematology*, 77(1), 12–9. doi:10.1016/j.critrevonc.2010.02.004
- Katakowski, M., Buller, B., Zheng, X., Lu, Y., Rogers, T., Osobamiro, O., ... Chopp, M. (2013). Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer letters*, 335(1), 201–4. doi:10.1016/j.canlet.2013.02.019
- Kostenko, S., & Moens, U. (2009). Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(20), 3289–307. doi:10.1007/s00018-009-0086-3

- Kuppner, M. C., Gastpar, R., Gelwer, S., Nössner, E., Ochmann, O., Scharner, a, & Issels, R. D. (2001). The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *European journal of immunology*, *31*(5), 1602–9. doi:10.1002/1521-4141(200105)31:5<1602::AID-IMMU1602>3.0.CO;2-W
- Kusmartsev, S., Cheng, F., Yu, B., Nefedova, Y., Sotomayor, E., Lush, R., & Gabrilovich, D. (2003). All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer research*, *63*(15), 4441–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907617>
- Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., Tan, K. H., & Lim, S. K. (n.d.). Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnology advances*, *31*(5), 543–51. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.08.008
- Lancet, J. E., Gojo, I., Burton, M., Quinn, M., Tighe, S. M., Kersey, K., ... Baer, M. R. (2010). Phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (KOS-1022, 17-DMAG) administered intravenously twice weekly to patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *24*(4), 699–705. doi:10.1038/leu.2009.292
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., & Garrido, C. (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of cellular and molecular medicine*, *12*(3), 743–61. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x
- Lattuada, L., Barge, A., Cravotto, G., Giovenzana, G. B., & Tei, L. (2011). The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chemical Society reviews*, *40*(5), 3019–49. doi:10.1039/c0cs00199f
- Leu, J. I.-J., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M. E., & George, D. L. (2009). A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Molecular cell*, *36*(1), 15–27. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.023
- Lewis, J., Devin, A., Miller, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Neckers, L., & Liu, Z. G. (2000). 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. *The Journal of biological chemistry*, *275*(14), 10519–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10744744>
- Li, C. Y., Lee, J. S., Ko, Y. G., Kim, J. I., & Seo, J. S. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *The Journal of biological chemistry*, *275*(33), 25665–71. doi:10.1074/jbc.M906383199
- Liao, W.-C., Wu, M.-S., Wang, H.-P., Tien, Y.-W., & Lin, J.-T. (2009). Serum heat shock protein 27 is increased in chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Pancreas*, *38*(4), 422–6. doi:10.1097/MPA.0b013e318198281d
- Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P., & Adema, G. J. (2013). The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*, *138*(2), 105–15. doi:10.1111/imm.12036
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*, *55*, 1151–91. doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.005443

- Liu, S. (2008). Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides ☆, *60*, 1347–1370. doi:10.1016/j.addr.2008.04.006
- Loriot, Y., Zoubeidi, A., & Gleave, M. E. (2012). Targeted therapies in metastatic castration-resistant prostate cancer: beyond the androgen receptor. *The Urologic clinics of North America*, *39*(4), 517–31. doi:10.1016/j.ucl.2012.07.008
- Lv, L.-H., Wan, Y.-L., Lin, Y., Zhang, W., Yang, M., Li, G.-L., ... Min, J. (2012). Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *The Journal of biological chemistry*, *287*(19), 15874–85. doi:10.1074/jbc.M112.340588
- Macario, A. J. L., & Conway de Macario, E. (2005). Sick chaperones, cellular stress, and disease. *The New England journal of medicine*, *353*(14), 1489–501. doi:10.1056/NEJMra050111
- Mambula, S. S., Calderwood, S. K., & Alerts, E. (2013). Nonclassical Pathway Involving Lysosomal Endosomes 1.
- Margineantu, D. H., Emerson, C. B., Diaz, D., & Hockenbery, D. M. (2007). Hsp90 inhibition decreases mitochondrial protein turnover. *PloS one*, *2*(10), e1066. doi:10.1371/journal.pone.0001066
- Mattoo, R. U. H., Sharma, S. K., Priya, S., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2013). Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with hsp70 to solubilize protein aggregates. *The Journal of biological chemistry*, *288*(29), 21399–411. doi:10.1074/jbc.M113.479253
- McConnell, J. R., & McAlpine, S. R. (2013). Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *23*(7), 1923–8. doi:10.1016/j.bmcl.2013.02.014
- McMillan, D. R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K., & 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*(13), 7523–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516453>
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, *19*, 683–765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683
- Multhoff, G. (2007). Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location , export and immunological relevance, *43*, 229–237. doi:10.1016/j.ymeth.2007.06.006
- Multhoffx, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W., & Issels, R. D. (1995). A STRESS-INDUCIBLE 72-kDa HEAT-SHOCK PROTEIN (HSP72) IS EXPRESSED ON THE SURFACE OF HUMAN TUMOR CELLS ,, *279*, 272–279.
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, *34*(6), 1181–8. doi:10.1093/carcin/bgt111
- Nagaraj, S., Collazo, M., Corzo, C. A., Youn, J.-I., Ortiz, M., Quiceno, D., & Gabrilovich, D. I. (2009). Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease. *Cancer research*, *69*(19), 7503–6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2152

- Newton, A. C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *The Biochemical journal*, 370(Pt 2), 361–71. doi:10.1042/BJ20021626
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., & Sakaguchi, S. (2008). Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10113–8. doi:10.1073/pnas.0711106105
- Ostling, P., Björk, J. K., Roos-Mattjus, P., Mezger, V., & 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(10), 7077–86. doi:10.1074/jbc.M607556200
- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., ... Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology*, 12(1), 19–30; sup pp 1–13. doi:10.1038/ncb2000
- Ottenhausen, M., Bodhinayake, I., Banu, M., Kesavabhotla, K., Ray, A., & Boockvar, J. A. (2013). Industry progress report on neuro-oncology: Biotech update 2013. *Journal of neuro-oncology*. doi:10.1007/s11060-013-1222-3
- Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viro, S., & Arrigo, A.-P. (2002). Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Molecular and cellular biology*, 22(3), 816–34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=133538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., ... Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, 18(6), 883–91. doi:10.1038/nm.2753
- Pfister, K., Radons, J., Busch, R., Tidball, J. G., Pfeifer, M., Freitag, L., ... Multhoff, G. (2007). Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer*, 110(4), 926–35. doi:10.1002/cncr.22864
- Poliakov, A., Spilman, M., Dokland, T., Amling, C. L., & Mobley, J. A. (2009). Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *The Prostate*, 69(2), 159–67. doi:10.1002/pros.20860
- Poschke, I., & Kiessling, R. (2012). On the armament and appearances of human myeloid-derived suppressor cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 144(3), 250–68. doi:10.1016/j.clim.2012.06.003
- Raber, P., Ochoa, A. C., & Rodríguez, P. C. (2012). Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunological investigations*, 41(6-7), 614–34. doi:10.3109/08820139.2012.680634
- Raimondo, F., Morosi, L., Chinello, C., Magni, F., & Pitto, M. (2011). Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics*, 11(4), 709–20. doi:10.1002/pmic.201000422
- Rajan, A., Kelly, R. J., Trepel, J. B., Kim, Y. S., Alarcon, S. V, Kummar, S., ... Giaccone, G. (2011). A phase I study of PF-04929113 (SNX-5422), an orally bioavailable heat shock protein 90 inhibitor, in patients with refractory solid tumor malignancies and lymphomas. *Clinical cancer*

research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 17(21), 6831–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0821

- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., & Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(9), 1574–84. doi:10.1016/j.biocel.2012.06.018
- Rappa, F., Farina, F., Zummo, G., David, S., Campanella, C., Carini, F., ... Macario, A. J. L. (2012). HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: an overview. *Anticancer research*, 32(12), 5139–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225410>
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., ... Kroemer, G. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor, 3(September), 839–843.
- Rebillard, A., Tekpli, X., Meurette, O., Sergent, O., LeMoigne-Muller, G., Vernhet, L., ... Dimanche-Boitrel, M.-T. (2007). Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. *Cancer research*, 67(16), 7865–74. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0353
- Retzlaff, M., Hagn, F., Mitschke, L., Hessling, M., Gugel, F., Kessler, H., ... Buchner, J. (2010). Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. *Molecular cell*, 37(3), 344–54. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.006
- Ribeil, J.-A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., ... Hermine, O. (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 445(7123), 102–5. doi:10.1038/nature05378
- Rosenhagen, M. C., Söti, C., Schmidt, U., Wochnik, G. M., Hartl, F. U., Holsboer, F., ... Rein, T. (2003). The heat shock protein 90-targeting drug cisplatin selectively inhibits steroid receptor activation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(10), 1991–2001. doi:10.1210/me.2003-0141
- Ruchalski, K., Mao, H., Li, Z., Wang, Z., Gillers, S., Wang, Y., ... Borkan, S. C. (2006). Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *The Journal of biological chemistry*, 281(12), 7873–80. doi:10.1074/jbc.M513728200
- Saegusa, C., Tanaka, T., Tani, S., Itohara, S., Mikoshiba, K., & Fukuda, M. (2006). Decreased basal mucus secretion by Slp2-a-deficient gastric surface mucous cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 11(6), 623–31. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00964.x
- Sakurai, T., Kudo, M., Umemura, A., He, G., Elsharkawy, A. M., Seki, E., & Karin, M. (2013). P38A Inhibits Liver Fibrogenesis and Consequent Hepatocarcinogenesis By Curtailing Accumulation of Reactive Oxygen Species. *Cancer research*, 73(1), 215–24. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1602
- Savina, A., Furlán, M., Vidal, M., & Colombo, M. I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(22), 20083–90. doi:10.1074/jbc.M301642200
- Schilling, D., Gehrman, M., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, A. G., Abend, M., ... Multhoff, G. (2009). Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(8), 2467–77. doi:10.1096/fj.08-125229

- Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G., & Garrido, C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of leukocyte biology*, *81*(1), 15–27. doi:10.1189/jlb.0306167
- Schmitt, Elise, Maingret, L., Puig, P.-E., Rerole, A.-L., Ghiringhelli, F., Hammann, A., ... Garrido, C. (2006). Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer research*, *66*(8), 4191–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3778
- Schmitt, Elise, Parcellier, A., Gurbuxani, S., Cande, C., Hammann, A., Morales, M. C., ... Garrido, C. (2003). Chemosensitization by a Non-apoptogenic Heat Shock Protein 70-Binding Apoptosis-Inducing Factor Mutant Chemosensitization by a Non-apoptogenic Heat Shock Protein 70-Binding Apoptosis-Inducing Factor Mutant, 8233–8240.
- Schneider, A., & Simons, M. (2013). Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell and tissue research*, *352*(1), 33–47. doi:10.1007/s00441-012-1428-2
- Seigneuric, R., Mjahed, H., Gobbo, J., Joly, A.-L., Berthenet, K., Shirley, S., & Garrido, C. (2011). Heat shock proteins as danger signals for cancer detection. *Frontiers in oncology*, *1*(November), 37. doi:10.3389/fonc.2011.00037
- Sidera, K., & Patsavoudi, E. (2008). ND ES SC RIB ND ES SC RIB, *7*(10), 1564–1568.
- Singh, R., Kolvraa, S., & Rattan, S. I. S. (2007). Genetics of human longevity with emphasis on the relevance of HSP70 as candidate genes. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, *12*, 4504–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485392>
- Slaby, O., Sobkova, K., Svoboda, M., Garajova, I., Fabian, P., Hrstka, R., ... Vyzula, R. (2009). Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression, 1235–1241. doi:10.3892/or
- Soga, S., Akinaga, S., & Shiotsu, Y. (2013). Hsp90 inhibitors as anti-cancer agents, from basic discoveries to clinical development. *Current pharmaceutical design*, *19*(3), 366–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920907>
- Somasundaram, R., & Herlyn, M. (2012). Melanoma exosomes: messengers of metastasis. *Nature medicine*, *18*(6), 853–4. doi:10.1038/nm.2775
- Sreedhar, A. S., Kalmár, E., Csermely, P., & Shen, Y.-F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters*, *562*(1-3), 11–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15069952>
- Stangl, S., Gehrmann, M., Riegger, J., Kuhs, K., Riederer, I., Sievert, W., ... Multhoff, G. (2011). Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(2), 733–8. doi:10.1073/pnas.1016065108
- Strom, E., Sathe, S., Komarov, P. G., Chernova, O. B., Pavlovskaya, I., Shyshynova, I., ... Gudkov, A. V. (2006). Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nature chemical biology*, *2*(9), 474–9. doi:10.1038/nchembio809

- Tauro, B. J., Greening, D. W., Mathias, R. A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A. M., & Simpson, R. J. (2012). Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *METHODS*, (January). doi:10.1016/j.ymeth.2012.01.002
- Taylor, D. D., Akyol, S., & Gercel-Taylor, C. (2006). Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(3), 1534–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424182>
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O., & Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature immunology*, 3(12), 1156–62. doi:10.1038/ni854
- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 9(8), 581–93. doi:10.1038/nri2567
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews. Immunology*, 2(8), 569–79. doi:10.1038/nri855
- Torregrosa Paredes, P., Esser, J., Admyre, C., Nord, M., Rahman, Q. K., Lukic, A., ... Gabrielsson, S. (2012). Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy*, 67(7), 911–9. doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02835.x
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., ... Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1244–7. doi:10.1126/science.1153124
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et biophysica acta*, 645(1), 63–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6266476>
- Triantafilou, M., & Triantafilou, K. (2004). Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt 4), 636–9. doi:10.1042/BST0320636
- Tytell, M., Greenberg, S. G., & Lasek, R. J. (1986). Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain research*, 363(1), 161–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3947949>
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Häcker, H., & Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *The Journal of biological chemistry*, 276(33), 31332–9. doi:10.1074/jbc.M103217200
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654–9. doi:10.1038/ncb1596
- Van Balkom, B. W. M., Pisitkun, T., Verhaar, M. C., & Knepper, M. A. (2011). Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney international*, 80(11), 1138–45. doi:10.1038/ki.2011.292

- Van den Boorn, J. G., Dassler, J., Coch, C., Schlee, M., & Hartmann, G. (2013). Exosomes as nucleic acid nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*, 65(3), 331–5. doi:10.1016/j.addr.2012.06.011
- Vlassov, A. V, Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(7), 940–8. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.017
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307–10. doi:10.1038/35042675
- Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G. R., & Anderson, C. J. (2010). Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chemical reviews*, 110(5), 2858–902. doi:10.1021/cr900325h
- Whetstone, H., & Lingwood, C. (2003). 3'Sulfogalactolipid binding specifically inhibits Hsp70 ATPase activity in vitro. *Biochemistry*, 42(6), 1611–7. doi:10.1021/bi026735t
- Whibley, C., Pharoah, P. D. P., & Hollstein, M. (2009). p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature reviews. Cancer*, 9(2), 95–107. doi:10.1038/nrc2584
- Williams, R. L., & Urbé, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(5), 355–68. doi:10.1038/nrm2162
- Williamson, D. S., Borgognoni, J., Clay, A., Daniels, Z., Dokurno, P., Drysdale, M. J., ... Massey, A. J. (2009). Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design. *Journal of medicinal chemistry*, 52(6), 1510–3. doi:10.1021/jm801627a
- Wu, B., Hunt, C., & Morimoto, R. (1985). Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Molecular and cellular biology*, 5(2), 330–41. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=366716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Xiang, X., Liu, Y., Zhuang, X., Zhang, S., Michalek, S., Taylor, D. D., ... Zhang, H.-G. (2010). TLR2-mediated expansion of MDSCs is dependent on the source of tumor exosomes. *The American journal of pathology*, 177(4), 1606–10. doi:10.2353/ajpath.2010.100245
- Xiao, L., Lu, X., & Ruden, D. M. (2006). Effectiveness of hsp90 inhibitors as anti-cancer drugs. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 6(10), 1137–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17073714>
- Xiao, X., Zuo, X., Davis, A. A., McMillan, D. R., Curry, B. B., Richardson, J. A., & Benjamin, I. J. (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *The EMBO journal*, 18(21), 5943–52. doi:10.1093/emboj/18.21.5943
- Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y., & Hatayama, T. (2006). Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells. *Experimental cell research*, 312(17), 3215–23. doi:10.1016/j.yexcr.2006.06.007
- Zielinski, R. R., Eigl, B. J., & Chi, K. N. (2013). Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 19(1), 79–89. doi:10.1097/PPO.0b013e3182801cf7

Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & therapeutics*, 92(1), 57–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750036>