



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle des premiers inhibiteurs d'HSP110

Vincent Cabaud Gibouin

► **To cite this version:**

Vincent Cabaud Gibouin. Caractérisation fonctionnelle des premiers inhibiteurs d'HSP110. Biologie moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. NNT : 2023UBFCI001 . tel-04116887

HAL Id: tel-04116887

<https://theses.hal.science/tel-04116887v1>

Submitted on 5 Jun 2023

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.



THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A L'INSERM UMR 1231 (LIPIDES, NUTRITION, CANCER), équipe HSPathies

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Doctorat de Biochimie et Biologie Moléculaire

Par

M. CABAUD GIBOUIN Vincent

Caractérisation fonctionnelle des premiers inhibiteurs de HSP110

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 23 mars 2023

Composition du Jury :

Dr David CHIRON	Rapporteur
Dr Aurélie DE THONEL	Rapporteuse
Dr Cédric ROSSI	Examineur
Dr Carmen GARRIDO	Directrice de thèse
Pr Gaëtan JEGO	Directeur de thèse
Pr Anne-Sophie VOISIN CHIRET	Examinatrice et Présidente du jury



THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A L'INSERM UMR 1231 (LIPIDES, NUTRITION, CANCER), équipe HSPathies

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Doctorat de Biochimie et Biologie Moléculaire

Par

M. CABAUD GIBOUIN Vincent

Caractérisation fonctionnelle des premiers inhibiteurs de HSP110

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 23 mars 2023

Composition du Jury :

Dr David CHIRON	Rapporteur
Dr Aurélie DE THONEL	Rapporteuse
Dr Cédric ROSSI	Examineur
Dr Carmen GARRIDO	Directrice de thèse
Pr Gaëtan JEGO	Directeur de thèse
Pr Anne-Sophie VOISIN CHIRET	Examinatrice et Présidente du jury

Remerciements

Tout d'abord, je remercie les membres du jury, **David CHIRON** et **Aurélie DE THONEL** qui ont accepté d'être les rapporteurs, ainsi que **Anne-Sophie VOISIN CHIRET** et **Cédric ROSSI** qui ont accepté d'être les examinateurs. Je vous remercie vivement d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier la **Ligue contre le Cancer** pour avoir financé mes 4 années de thèse, sans qui la réalisation de ce travail aurait été impossible. Leur contribution a été essentielle pour me permettre d'acquérir les ressources nécessaires pour mener à bien mon projet de recherche, et je suis profondément reconnaissant de leur confiance en moi et en l'équipe HSPathies.

Je vous remercie, **Carmen**, vous qui avez été ma directrice de thèse et chef de cette formidable équipe HSPathies, au sein de laquelle j'ai pu pleinement m'épanouir. Votre expertise et votre expérience en tant que directrice de thèse ont été précieuses pour moi. C'est dans cette équipe que j'ai pu confirmer ma vocation à travailler dans la recherche en biologie. Votre engagement envers mon projet de recherche était clair et vous avez été à disposition pour aider dans la finalisation de mon travail. J'apprécie les efforts que vous avez fait pour me donner les moyens de réussir et je suis reconnaissant d'avoir eu l'opportunité de travailler sous votre direction.

Pour vous, **Gaëtan**, j'admets ne pas savoir par où commencer pour exprimer ma gratitude. Je tiens tout d'abord à vous exprimer mes plus sincères remerciements pour votre encadrement et votre soutien tout au long de ma thèse. Votre expertise et votre expérience ont été précieuses pour moi, et votre disponibilité pour répondre à mes questions et pour discuter de mes idées a été inestimable. Votre engagement envers mon projet de recherche a été constant et cela m'a permis de continuer à avancer, même lorsque je n'avais même plus confiance en moi dans les moments les plus difficiles. Vos encouragements et vos commentaires constructifs ont été des sources de motivation pour moi et ont contribué à améliorer considérablement mon travail. Je profite de ces quelques lignes pour remercier votre épouse, **Laurence**, qui m'a orienté vers vous lorsque je cherchais un stage de M2. Sans elle, nous n'aurions très certainement jamais travaillé ensemble. Je suis reconnaissant d'avoir eu l'opportunité de travailler sous votre direction et de pouvoir bénéficier de votre enseignement. Cette expérience a été enrichissante, et j'espère avoir l'occasion de continuer à collaborer avec vous dans le futur. Je suis convaincu que nos chemins se croiseront à nouveau dans le futur. Encore une fois, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Merci à toi **Manon**, d'avoir été à mes côtés depuis le début de ma thèse. Tu étais alors en M1 pour ton stage, alors que je venais tout juste de commencer. Les manip's nous avaient donné beaucoup de fil à retordre, notamment au début, (maudits inhibiteurs !). Mais c'est surtout pendant ton M2, malheureusement écourté (maudit SARS-CoV-2 !) où nous avons réellement commencer à travailler

ensemble. Je te serai éternellement reconnaissant de ton soutien moral dans les situations les plus stressantes pour moi, surtout sur la fin. Je suis très heureux d'avoir passé tout ce temps avec toi, au laboratoire et je suis particulièrement ravi d'avoir un projet de recherche commun (ce bon vieux PMBL...). J'ai déjà eu l'occasion d'observer ton sérieux, ta rigueur et ton dévouement lors de cette collaboration et suis convaincu que tu sauras maintenir tout cela pour ton ou tes propres projets de recherche, mais aussi pour tes futurs projets professionnels. Je te souhaite le meilleur.

Je ne sais pas vraiment si je dois te remercier, **Steven**, pour ces tonnes de calories ingérées dans les divers Food Trucks proches de l'UFR... Pour la science, en revanche, il est clair que je dois rédiger un petit quelque chose. Nous avons commencé à échanger quand tu venais tout juste d'entrer en thèse, et moi en M2. Je dois forcément parler de tous tes conseils en sciences et de ton aide pour différentes manip' alors que je n'avais encore aucune expérience. Sans toi il est évident que je serai largement moins bien débrouillé, surtout au début de la thèse, là où j'avais le plus de difficultés. Tu étais là, toujours prêt à filer un coup de main. Que ce soit pour certaines machines, mais aussi pour le remplissage de l'azote, je savais que je pouvais compter sur toi. Alors merci encore, pour tout. Sauf les calories.

De manière évidente, je ne peux pas me permettre d'oublier les anciens de la sous-équipe JEGO. Il me tient à cœur de te remercier, **Leila**, pour ton encadrement alors que je n'étais qu'un petit M1. Je suis conscient maintenant que je n'étais peut-être pas le plus facile des étudiants, mais ce sont bien tes enseignements qui m'auront guidé au moins au tout début de ma thèse. Je t'en serai toujours reconnaissant. De même **Christophe**, même si nous avons finalement peu échangé, j'ai toujours en tête tes conseils concernant certaines expériences. Pour vous deux, merci.

Je n'oublie évidemment pas le doctorant résident de l'INSERM, **Abdel**, l'homme aux milles talents. Je te remercie pour tes innombrables conseils de qualité. Ton expérience et tes connaissances pratiques m'auront énormément aidé, et même si je ne t'ai clairement pas apporté autant je te suis reconnaissant pour nos échanges. Je ne me fais aucun souci pour les futurs projets professionnels.

Pour toi, **Romain**, tout simplement merci. D'abord, je te remercie de m'avoir aidé pour mettre au point mes marquages de phosphoprotéines en cytométrie, on aura passé un temps hallucinant là-dessus... Ensuite, je te suis reconnaissant d'avoir pu bénéficier de ta très (très) large expérience, mais aussi évidemment des échanges (pas forcément toujours scientifiques) que nous avons pu avoir près de la machine à café. Alors merci pour tout !

Je ne peux bien sûr pas envisager la rédaction de remerciements sans une petite pensée pour les anciens. Je pense d'abord à vous, **Gaëtan C** et **Marine**, pour votre expertise concernant les isolements d'exosomes. Je pense évidemment à **Baptiste**, et son humour plus que douteux. Je me

souviendrai toujours, dans le L2, de certaines plaisanteries finalement peu matures (avec la complicité de **Steven** évidemment). Je pense aussi à **Burhan**, toi qui m'as introduit (oula) dans le monde de l'immunohistochimie. Toi et tes blagues plus graveleuses les unes que les autres. A toi qui as décidé de refaire des études, je te souhaite beaucoup de courage, même si je sais que tu es déterminé à réussir. Pour toi, **Kylian**, je te remercie d'avoir été présent pour m'aider notamment au début, quand j'avais un peu de mal à démarrer. Tu m'as permis d'observer tes méthodes dont je me suis grandement inspiré pour commencer ma thèse. Pour ça, merci.

Je me dois bien sûr de remercier la nouvelle génération. Je pense à **Lisa**, se moquant souvent de moi et ma rigueur mais bon, je savais te le rendre. Et même si je t'ai beaucoup charriée, c'est parce que je ne me fais aucun souci pour toi et tes projets futurs. J'ai réussi à t'influencer sur certaines choses (tes westerns notamment), et ça je n'en suis pas peu fier ! Sans évidemment oublier **Jeanne**, toi et Lisa quel duo ! Nous nous connaissions déjà au lycée mais c'est surtout à l'INSERM que nous avons vraiment échangé. Merci pour tout, et de la même façon je ne me fais pas de soucis pour ta vie professionnelle post-OD. Mais aussi **Valentin B...** bon clairement, tu es déjà diplômé, mais que fais-tu ici !? Je comprends que le double doctorat puisse plaire ne t'en fais pas, en tout cas tu as un large choix de possibilités pour la suite, je te souhaite de réussir. Pour toi, **Flavie**, la toute nouvelle de l'équipe, la jeune petite pousse ! Je te remercie pour toutes nos petites interactions déjà durant ton M2, j'ai apprécié chaque discussion autour des différents petits (grands) cafés que nous avons pu boire (merci pour l'hypercaféinémie). Ne te fais pas trop de soucis pendant ta première année, tout se joue bien plus tard. Tu as un potentiel incroyable, je sais que tu réussiras à atteindre des objectifs pros haut la main. Merci pour tout !

Je pense aussi à **Rim** et **Jimena**, je vous souhaite le meilleur dans votre aventure avec l'hydroxyapatite ! Je suis convaincu que vous saurez soigner les lymphomes avec vos super vaccins ! Je vous souhaite du courage, et j'espère vous avoir quand même apporté un peu quelque chose.

Je remercie aussi mes anciennes stagiaires, pour avoir notamment réussi à me supporter pendant 2 (pour les plus chanceuses) ou 6 mois (désolé...). Je pense à vous **Dina**, **Évodie**, **Kassandra**, **Juliette** et **Érine**.

Je profite pour remercier mes amis surtout **Neko**, **P-A** et **Jérémy** sans qui ma vie perso aurait quand même été bien vide pendant cette fabuleuse aventure qu'est la thèse (et les études bien sûr).

Je pense évidemment à remercier **ma famille** qui m'a soutenu pendant toute la durée de mes études et de ma thèse.

Enfin, pour tous ceux qui m'ont soutenu durant cette thèse, je ne vous remercierai jamais assez. Merci à **tous** :)

Résumé / abstract

Titre : Caractérisation fonctionnelle des premiers inhibiteurs de HSP110

Mots clés : Protéine de choc thermique, Lymphome B diffus à grandes cellules, Thérapie ciblée

Résumé : Les protéines de choc thermique sont des chaperons moléculaires fortement exprimés dans les hémopathies malignes. Mon laboratoire de thèse a montré que la protéine de choc thermique HSP110 est une nouvelle cible thérapeutique de première importance dans le cancer colorectal et dans les lymphomes non-Hodgkiniens. Une stratégie de criblage d'une chimiothèque a permis l'identification de deux molécules capables d'inhiber spécifiquement l'activité chaperonne de HSP110. Mon objectif de thèse a été de caractériser et de valider fonctionnellement ces molécules nouvellement identifiées dans les lymphomes B diffus à grandes cellules.

J'ai montré qu'une de ces molécules limite l'interaction de HSP110 avec la protéine de signalisation SYK, kinase essentielle de la voie de signalisation du BCR. Cet inhibiteur réduit la croissance des cellules de lymphomes *in vitro* et *in vivo*. Elle réduit aussi l'activation de la voie NF- κ B, voie essentielle de survie. J'ai enfin montré que l'inhibition de cette voie par notre inhibiteur, en combinaison avec des inhibiteurs de la voie PI3K, bloque complètement la croissance tumorale *in vivo*.

Title: Functional characterization of the first HSP110 inhibitors

Keywords: Heat shock protein, Activated B cell diffuse large B cell lymphoma, Targeted therapy

Abstract : Heat shock proteins are molecular chaperones highly expressed in haematological malignancies. My laboratory has shown that the heat shock protein HSP110 is a new and important therapeutic target in colorectal cancer and in non-Hodgkin's lymphoma. As there were no existing inhibitors of HSP110, a screening strategy of a chemical library was carried out and allowed the identification of two molecules capable of specifically inhibiting the chaperone activity of HSP110. My thesis objective was to characterise and functionally validate these newly identified molecules in diffuse large cell B lymphomas.

I have shown that one of these molecules limits the interaction of HSP110 with the SYK signalling protein, an essential kinase in the BCR signalling pathway in activated diffuse B-cell lymphoma. These molecules reduce the growth of these lymphoma cells *in vitro* and *in vivo*. They reduce the activation of the NF- κ B pathway, an essential survival pathway. Finally, I have shown that inhibition of this pathway by our inhibitor, in combination with inhibitors of the PI3K pathway, completely blocks tumour growth *in vivo*.

Table des matières

Table des matières.....	6
Abréviations.....	18
Contexte de l'étude	22
Introduction.....	23
Les lymphomes et leur classification.....	23
Les lymphomes diffus à grandes cellules B	26
Oncogenèse et voies de signalisation.....	31
Importance de la cellule d'origine (Cell of Origin, ou COO)	31
Instabilité génétique : oncogenèse des DLBCLs	33
Supercomplexe My-T-BCR : coopération entre les voies du BCR et du TLR via MyD88 pour une activation d'NF- κ B	35
L'acteur PI3K : rôle dans les voies PI3K/AKT et NF- κ B indépendamment du supercomplexe My-T-BCR.....	36
L'implication des voies JAK/STAT médiée par les récepteurs aux interleukines : alternative à la signalisation du BCR pour l'activation et la prolifération	37
Généralités sur les HSPs	38
Généralités sur HSP110	40
HSP110 et cancer.....	41
HSP110 et DLBCL	42
Thérapies, échecs thérapeutiques et alternatives	43
Protocoles de chimiothérapies et immunothérapies.....	43
Alternatives : immunothérapies et thérapies ciblées	45
Nouvelles approches thérapeutiques : les inhibiteurs de HSPs	46
Un nouvel outil thérapeutique : les inhibiteurs de HSP110	47
Vésicules extracellulaires (VECs) et cancer.....	49
Les grosses et petites VECs.....	49

Rôles dans le cancer et microenvironnement tumoral.....	50
Matériel et méthodes.....	51
Culture cellulaire.....	51
Transfection.....	51
Electroporation.....	51
Lipofection.....	52
Immunoempreinte, ou Western Blot	52
Préparation des échantillons.....	52
Dépôt, migration et transfert	52
Blocage, incubations et anticorps primaires	52
Anticorps secondaires et révélations	53
Co-immunoprécipitation	53
Immunohistochimie.....	54
Expériences de Ligature de Proximité Duolink® (PLA)	54
Immuno(cyto)fluorescence (classiques).....	55
Immuno(histo)fluorescence (tests de Ligature de Proximité Duolink®)	55
Tests de prolifération cellulaire (XTT).....	55
Cytométrie en flux – marquages Annexine V et 7AAD	56
Test de viabilité cellulaire Cell Titer Glo 2.0 (CTG)	56
Co-traitement <i>in vivo</i> dans des souris NSG avec inhibiteur d’HSP110 et copanlisib.....	56
Tests de phosphorylation <i>in vitro</i>	56
Isolements cytoplasmes-noyaux	56
Isolements cytoplasmes-membranes.....	57
Isolements des petites vésicules extracellulaires (PVECs)	57
Au préalable : déplétion des VECs présentes dans le sérum de veau foetal	57
A partir de milieu de culture.....	57
A partir de plasma de patients	57

Objectifs.....	58
Résultats	59
Partie 1 : L'inhibition d'HSP110 dans le sous-type ABC des lymphomes B diffus à grandes cellules et co-inhibition des voies de signalisation impliquant les immunoglobulines de surface ...	59
Impact de l'inhibition d'HSP110 sur la viabilité et la survie des cellules d'ABC-DLBCL....	59
Impact de l'inhibition d'HSP110 sur la voie de signalisation majeure impliquée dans l'ABC-DLBCL : la voie du BCR	64
Identification du partenaire d'HSP110 impliqué dans la signalisation proximale du BCR et impact de l'inhibition d'HSP110 sur cette interaction	70
Impact de la combinaison des traitements avec inhibiteur d'HSP110 et copanlisib sur la viabilité des lignées cellulaires d'ABC-DLBCL et la croissance tumorale d'une lignée humaine d'ABC-DLBCL xéno greffée dans des souris NSG	80
Impact de la combinaison des traitements sur la signalisation cellulaire des lignées d'ABC-DLBCL et dans le tissu tumoral d'une lignée humaine d'ABC-DLBCL xéno greffée dans des souris NSG	83
Partie 2 : Implication d'HSP110 dans le sous-type PMBL des lymphomes B diffus à grandes cellules.....	87
Genèse du projet	87
Localisation subcellulaire d'HSP110 dans les cellules de PMBL	88
Interaction entre HSP110 et XPO1	89
La nature de la relation entre HSP110 et XPO1.....	91
Implication de STAT6 pour la suite du projet	92
Partie 3 : HSP110 dans les petites vésicules extracellulaires, potentiel biomarqueur des DLBCLs ?	94
Genèse du projet	94
Etablissement du profil d'expression d'HSP110, de la localisation d'HSP110 dans les cellules de DLBCL et de la présence d'HSP110 dans les PVECs	94
Détection des différentes HSPs dans les PVECs isolées à partir de plasmas de patients atteints de DLBCLs au moment du diagnostic.....	95

Discussion	98
Concernant l'ABC-DLBCL.....	98
Etude globale de la signalisation cellulaire.....	99
Modèles d'étude de développement de lymphomes B agressifs	101
Combinaisons possibles avec les inhibiteurs d'HSP110	104
Concernant le PMBL	105
Lignées cellulaires et modèles animaux	105
Suite du projet	106
Concernant HSP110 comme biomarqueur.....	106
Conclusion générale	108
Bibliographie.....	109
Annexes	120
Annexe 1 : Revue en 1 ^{er} auteur, portant sur le potentiel thérapeutique des HSPs dans le traitement des leucémies et lymphomes.....	120
Annexe 2 : Article en 5 ^{ème} auteur, portant sur la mutation E571K de XPO1 dans le PMBL	143
Annexe 3 : Poster présenté au congrès de l'Association Européenne d'Hématologie (Vienne, Autriche 2022).....	164

Table des figures et tableaux

Figure 1 : Schéma représentant tous les types et sous-types de lymphomes hodgkiniens ainsi que la prévalence de chacun d'entre-eux, basé sur les valeurs de « Hodgkin lymphoma : A review and update on recent progress » DOI : 10.3322/caac.21438. HLs = Lymphomes Hodgkinien ; cHLs : Lymphomes Hodgkiniens classiques. 23

Figure 2 : Schéma classant les types majoritaires (représentant au moins 1% des cas) de lymphomes non-hodgkiniens (NHLs) chez l'adulte en fonction de leur rapidité d'évolution. La prévalence pour chacun des lymphomes est basée sur « Non-Hodgkin lymphoma subtype distribution, geodemographic patterns, and survival in the US: A longitudinal analysis of the National Cancer Data Base from 1998 to 2011 » DOI : 10.1002/ajh.24086 ; « Long-term survival after T-cell lymphoblastic lymphoma treated with one cycle of hyper-CVAD regimen » DOI : 10.4143/crt.2013.122 et « T-cell non-hodgkin lymphomas: Spectrum of disease and the role of imaging in the management of common subtypes » DOI : 10.3348/kjr.2017.18.1.71 24

Figure 3 : Schéma représentant la classification des lymphomes B diffus à grandes-cellules, basé sur les entrées obtenues dans « Diffuse large B-cell lymphoma variants : an update » DOI : 10.1016/j.pathol.2019.08.013..... 27

Figure 4 : Schéma représentant l'arbre décisionnel utilisé par les anatomopathologistes pour déterminer le type de cellule d'origine (COO) du lymphome diffus à grandes cellules B. Les valeurs correspondent à celles de patients, 152 en tout. Tiré de « Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray" » DOI : 10.1182/blood-2003-05-1545 27

Figure 5 : En (A) : Graphique représentant la survie globale (en %) de patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B en fonction du temps (en année) dont la caractérisation a été effectuée par marquages immunohistochimiques. En (B) : Graphique représentant la survie globale (en %) de patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B en fonction du temps (en année) dont la caractérisation a été effectuée par marquages immunohistochimiques et par génotypage dans le but de comparer les deux méthodes. Tiré de l'article « Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray » DOI : 10.1182/blood-2003-05-1545. TMA = Tissue Micro-Array ; cDNA = ADN complémentaire..... 28

Figure 6 : Schéma représentant les proportions de lymphomes Double-Hit et Double-Expresser en fonction du type de DLBCL. Tiré de « Advances in Diagnosis and Management of Diffuse

Large B-cell Lymphoma » DOI : 10.1016/j.clml.2017.10.007. BCL-2-R = Possédant le réarrangement t(14;18) ; MYC-R = Possédant le réarrangement t(8;14)..... 29

Figure 7 : Schémas représentant en (A) une classification simplifiée des DLBCLs spécifiés et non-spécifiés (NOS) et en (B) une classification de ces mêmes DLBCLs en fonction de leur COO, mettant en avant l'ABC, le GC et le PMBL. 31

Figure 8 : Schéma représentant l'origine des types cellulaires à l'origine de l'ABC-DLBCL, du GC-DLBCL et du PMBL. Cellule B thymique « naturelle » = cellule B thymique issue d'une lymphopoïèse B dans le thymus. 32

Figure 9 : Schéma représentant les principaux acteurs impliqués dans la signalisation du BCR et du TLR, et comment les deux voies de BCR et du TLR coopèrent pour former un « supercomplexe » permettant la phosphorylation d'I κ B et donc sa dégradation pour libérer NF- κ B pouvant entrer dans le noyau..... 36

Figure 10 : Schéma représentant la convergence de la signalisation du supercomplexe My-T-BCR et de la voie de signalisation PI3K/AKT vers la phosphorylation d'I κ B, montrant comment ces deux voies majeures de signalisation peuvent synergiser pour avoir une action commune pour la survie et la prolifération des cellules de l'ABC-DLBCL. 37

Figure 11 : Schéma montrant la signalisation globale JAK/STAT d'une cellule B thymique, COO du PMBL, avec comme point de départ le récepteur à l'interleukine 4. Les acteurs principaux de la voie, JAK2, STAT6 et XPO1 y sont présentés. 38

Figure 12 : Schéma représentant la structure d'HSP110 et les différences entre les formes α et β , adapté de Mammalian Heat Shock Protein Hsp105: The Hsp70 Inducer and a Potent Target for Cancer Therapy, DOI : 10.1007/978-3-319-89551-2_18 ; le feuillet β constitue le domaine de liaison aux protéines..... 41

Figure 13 : Courbes de survie montrant la corrélation entre la survie des patients et le statut mutationnel de MyD88 (non muté en rouge, muté en bleu), tirée de « Prognostic value of MYD88 L265P mutation in diffuse large B cell lymphoma via droplet digital PCR » (DOI : 10.3892/mmr.2020.11186). On y constate une plus faible probabilité de survie chez les patients muté pour MyD88 L265P..... 43

Figure 14 : Schéma représentant les proportions de réponses à la thérapie R-CHOP sur une population standard de patients avec DLBCL, adapté de « Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do? » DOI : 10.1182/asheducation-2016.1.366. 44

Figure 15 : Schéma adapté de « Selecting the first chemical molecule inhibitor of HSP110 for colorectal cancer therapy » DOI : 10.1038/s41418-019-0343-4 montrant les structures chimiques des trois inhibiteurs de HSP110..... 48

Figure 16 : Etude de l'impact de l'inhibition d'HSP110 sur la viabilité et la survie des cellules d'ABC-DLBCL. A : Mesure de densités optiques, représentant la viabilité de 3 lignées d'ABC-DLBCL (HBL1, OCI-LY3 et TMD8) traitées en plaque 96 puits pendant 48 et 96 heures avec les inhibiteurs 52 et 33 (10 μ M) avec un contrôle le composé 61, avec une mesure de la viabilité à J0 par kit XTT. **B :** Mesure de la survie cellulaire par cytométrie en flux grâce à un co-marquage Annexine V FITC et 7AAD de 4 lignées (HBL1, OCI-LY3, TMD8 et OCI-LY10) traitées pendant 96 heures. **En C :** Illustration de la partie **B** sur lignée TMD8 traitées DMSO et avec inhibiteur #52 à 40 μ M sur 96 heures. La croix représente le pourcentage de cellules dans chaque quadrant..... 60

Figure 17 : Suite de l'étude de l'impact de l'inhibition d'HSP110 sur la survie des cellules d'ABC-DLBCL. Des traitements avec l'inhibiteurs d'HSP110 #52 ont été réalisés sur 72h sur 3 lignées (HBL1, OCI-LY3 et TMD8), puis différents marquages de protéines pro-apoptotiques (Caspase 3 et PARP) et leurs fragments de clivages ont été effectués, ainsi que les marquages d'oncogènes majeurs dans les lymphomes 62

Figure 18 : Etude de l'impact de l'inhibition d'HSP110 avec l'inhibiteur #52 sur la croissance tumorale. A : mesure de la croissance tumorale d'une lignée de lymphome (TMD8) xénotransplantée à J0 (15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG. Les traitements avec inhibiteur #52 ont commencés J6 et ont été effectués tous les deux jours en même temps que la prise des mesures tumorales. **B :** après mise à mort, les tumeurs ont été prélevées et pesées. **C :** image d'illustration de certaines tumeurs prélevées post-mortem 63

Figure 19 : Effets des inhibiteurs d'HSP110 sur les phosphorylations de I κ B (sérines 32 et 36) et de p65 (sérine 276), essentielles pour la translocation du complexe NF- κ B dans le noyau, et donc de la transduction du signal, sur les lignées OCI-LY3 et TMD8. A : Les lignées ont été traitées 24 heures avec les inhibiteurs #52 et #33, ainsi que du contrôle #61 à 10 μ M, puis les lysats ont été déposés pour marquages de phospho-I κ B et I κ B totale. **B :** Les lignées ont été traitées 24 et 48 heures avec l'inhibiteur #52 à 10 μ M, puis les lysats ont été déposés pour marquages de phospho-p65 et p65..... 65

Figure 20 : Western blot d'une co-immunoprécipitation de MyD88 dans la lignée d'ABC-DLBCL HBL1, traitées avec #61, #52 et #33 à 20 μ M sur 24 heures, tiré de la thèse « Expression et rôle d'HSP110 dans le lymphome B diffus à grandes cellules de type activé ou ABC-DLBCL », <https://www.theses.fr/2018UBFCI014>. Les chaînes lourdes des anticorps de capture servent de

témoins de charge pour les fractions d'immunoprécipitations, et la GAPDH sert de témoins de charge pour les inputs..... 66

Figure 21 : Western blot de traitement #52 (10 μ M) réalisés sur différentes lignées cellulaires afin d'y révéler différents acteurs impliqués dans la signalisation proximale du BCR ainsi que leurs formes phosphorylées, la tyrosine 759 pour PLC γ 2, la tyrosine 352 pour SYK et la tyrosine 223 pour BTK. A : Marquages des formes totales et phosphorylées des kinases PLC γ 2, SYK et BTK sur lignées d'ABC-DLBCL (HBL1, OCI-LY3 et TMD8) après traitement pendant 24 et 48 heures, chez qui la signalisation du BCR est constitutive. **B :** Marquages des formes totales et phosphorylées des kinases SYK et BTK sur lignées de lymphome de Burkitt BJAB après traitement pendant 48 heures, chez qui la signalisation du BCR a été induite avec 2,5 μ g/mL de fragment Fab de chèvre anti-IgM humain pendant 5 minutes..... 67

Figure 22 : Marquages immunohistochimiques des protéines de signalisation MyD88, phospho-I κ B et phospho-BTK sur tumeurs xénotransplantées d'une lignée de lymphome humaine (TMD8, 15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG, traitées tous les deux jours avec inhibiteur d'HSP110 #52 (10mg/kg). A J20, les souris sont mises à mort et les tumeurs ont été prélevées, fixées et incluses en bloc paraffine. 69

Figure 23 : Etude de l'interaction avec la kinase majeure de signalisation de la voie du BCR SYK sur les lignées OCI-LY3 et TMD8 d'ABC-DLBCL. A : Co-immunoprécipitations d'HSP110, réalisées avec 2 μ g d'anticorps de capture anti-HSP110 ou 2 μ g d'anticorps contrôle ajoutés dans 700 μ g de lysats protéiques d'OCI-LY3 ou TMD8 par anticorps. **B :** Co-immunoprécipitations de SYK, correspondant à l'immunoprécipitation inverse de la partie **A**, réalisées dans les mêmes conditions avec 4 μ g d'anticorps de capture anti-SYK ou 4 μ g d'anticorps contrôle. **C et D :** expériences de ligature de proximité entre HSP110 et SYK sur cellules OCI-LY3 et TMD8, fixées avec de la PFA 4% et perméabilisées avec du méthanol 100%. Les anticorps anti-HSP110 et anti-SYK ont été co-incubés sur la nuit à 4°C. HSP70 a été choisie comme contrôle d'interaction positif pour HSP110, et l'interférence ARN d'HSP110 (1nmol) sert à montrer la spécificité de l'interaction entre HSP110 et SYK. Les western blots servent à confirmer l'interférence ARN..... 71

Figure 24 : Etude de l'interaction entre HSP110 et SYK dans différents modèle *cellulo* et *in vitro* par immunoempreintes. A : co-immunoprécipitation de SYK dans les lignées U2932 (MyD88^{WT}) et HBL1 (MyD88^{L265P}) d'ABC-DLBCL. **B :** co-immunoprécipitation de SYK dans la lignée BJAB stimulée ou non avec 5 μ g/mL de Fab de chèvre anti-IgM humain pendant 5 minutes. **C :** expérience de phosphorylation *in vitro* avec protéines recombinantes. Les protéines ont été co-incubées ensemble,

puis la réaction de phosphorylation a été lancée avec l'ajout d'ATP pendant 10 minutes à 30°C en présence soit d'inhibiteur d'HSP110 #52 à 300µM, soit avec un volume équivalent de DMSO 73

Figure 25 : Etude de l'effet de l'inhibiteur #52 d'HSP110 sur l'interaction entre HSP110 et SYK.

A : Co-immunoprécipitations de SYK réalisées sur les lignées cellulaires d'ABC-DLBCL HBL1 et TMD8 traitées avec 20µM d'inhibiteur #52 sur 24 heures. **B :** Expériences de ligature de proximité (PLA) réalisées sur xénogreffes d'une lignée de lymphome humaine (TMD8, 15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG, traitées tous les deux jours avec inhibiteur d'HSP110 #52 (10mg/kg). A J20, les souris sont mises à mort et les tumeurs ont été prélevées, fixées et incluses en bloc paraffine pour marquage en PLA..... 77

Figure 26 : Schéma de conclusion de la partie 1 des résultats, montrant une cellule d'ABC-DLBCL dans des conditions normales, montrant l'implications d'HSP110 dans la voie du BCR, notamment l'interaction et le chaperonnage de SYK et de MyD88. 79

Figure 27 : Expériences de viabilité avec kit CTG 2.0 sur lignées cellulaires d'ABC-DLBCL HBL1 (en A), OCI-LY3 (en B) et TMD8 (en C) co-traitées avec inhibiteur d'HSP110 et copanlisib sur 72 heures..... 81

Figure 28 : Etude de l'impact de la co-inhibition d'HSP110 avec l'inhibiteur #52 et de pan-PI3K avec la copanlisib sur la croissance tumorale. A : mesure de la croissance tumorale d'une lignée de lymphome (TMD8) xénogreffée à J0 (15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG. Les traitements avec inhibiteur #52 (voie intrapéritonéale) et/ou copanlisib (voie intraveineuse) ont commencés J3 et ont été effectués tous les deux jours en même temps que la prise des mesures tumorales. **B :** après mise à mort, les tumeurs ont été prélevées et pesées..... 83

Figure 29 : Western blot montrant l'impact des mono-traitements et co-traitement avec inhibiteur d'HSP110 #52 et copanlisib sur lignées d'ABC-DLBCL HBL1, OCI-LY3 et TMD8 traitées pendant 48 heures pour y révéler des phosphoprotéines majeures dans la signalisation globale de ce type de cancer 84

Figure 30 : Marquages immunohistochimiques des protéines de signalisation phospho-IκB et phospho-BTK sur tumeurs xénogreffées d'une lignée de lymphome humaine (TMD8, 15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG, traitées tous les deux jours avec inhibiteur d'HSP110 #52 (10mg/kg) et/ou avec copanlisib (5mg/kg). A J21, les souris sont mises à mort et les tumeurs ont été prélevées, fixées et incluses en bloc paraffine. 85

Figure 31 : Marquage immunohistochimique de phospho-SYK par PLA « Brightfield » sur tumeurs xénogreffées d'une lignée de lymphome humaine (TMD8, 15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG, traitées tous les deux jours avec inhibiteur d'HSP110 #52 (10mg/kg) et/ou

avec copanlisib (5mg/kg). A J21, les souris sont mises à mort et les tumeurs ont été prélevées, fixées et incluses en bloc paraffine. Un tel marquage a été réalisé en faisant une PLA contre SYK totale et contre les phosphotyrosines 85

Figure 32 : Etude de l'expression d'HSP110 sur une cohorte de patients atteints de PMBL qui possèdent une faible quantité d'ARNm HSP110 (en rouge) et qui possèdent une forte quantité d'ARNm HSP110 (en bleu), niveaux évalués par ARN microarray. En A : survie sans progression des patients en fonction du temps. En B : survie globale des patients en fonction du temps. 87

Figure 33 : Etude de la localisation subcellulaire d'HSP110 dans deux lignées de PMBL, K1106P et MedB1. En A : Isolements cytoplasmes-noyaux réalisés et visualisés par western blot, avec en contrôle cytoplasmique HSP60 et en contrôle nucléaire la lamine A. En B : Marquage d'HSP110 réalisés par immunofluorescence sur cellules fixées et perméabilisées 88

Figure 34 : Etude de l'interaction entre HSP110 et XPO1. En A et B : Tests de ligature de proximité entre HSP110 et XPO1 (avec BRCA1, contrôle positif d'interaction avec XPO1 et contrôle négatif d'interaction avec HSP110) sur lignées K1106P (XPO1 WT) et MedB1 (XPO1 E571K). En C : co-immunoprécipitations entre HSP110 et XPO1^{WT} et XPO1^{E571K} sur lignées HEK293 transfectées avec HSP110-GFP et XPO1^{WT}-mCherry ou XPO1^{E571K}-mCherry 90

Figure 35 : Etude de la nature de l'interaction entre HSP110 et XPO1. En A : isolement cytoplasmes-noyaux réalisé sur la lignée K1106P traitées avec 1µM de selinexor pendant 4h et visualisé par western blot. p65 est un contrôle du blocage de l'export, la TATA-box Binding Protein est un contrôle cytoplasmique, et la GAPDH est un contrôle nucléaire. En B : isolement cytoplasmes-noyaux réalisé sur la lignée HEK293, transfectée avec HSP110-GFP et traitées avec 1µM de selinexor pendant 4h, et visualisé par western blot. En C : expérience d'électroporation de K1106P et MedB1 avec 1nmol de siARN HSP110 et visualisé par western blot..... 91

Figure 36 : Immunoprécipitation de STAT6 dans un modèle HEK293 modifiée pour surexpression de STAT6 (alors nommée HEK293S6) et sur MedB1, montrant l'interaction entre STAT6 et XPO1. 93

Figure 37 : Etude de la localisation et du profil d'expression d'HSP110 dans les lignées de lymphomes et dans les PVECs. HBL1, SU-DHL2, OCI-LY3, TMD8 et U2932 sont des lignées d'ABC, SU-DHL4 et B593 sont des lignées de GC-DLBCL et U2940 est une lignée de PMBL. En A : profil d'expression d'HSP110 par différentes lignées humaines de DLBCL visualisé par western blot. En B : Isolements cytoplasmes-membranes sur différentes lignées de DLBCL visualisés par western blot. En C : Profil d'expression d'HSP110 et de différents marqueurs exosomaux pour confirmer l'isolement des PVECs..... 96

Figure 38 : Isolements de PVECs de patients atteints de DLBCLs au moment du diagnostic visualisés par western blot. En A : marqueurs exosomaux contrôlant la qualité de l'isolement, avec une lignée cellulaire d'ABC-DLBCL (HBL1) en contrôle. En B : Marquages par western blot des échantillons de PVECs précédemment isolées..... 97

Figure 39 : Schéma de conclusion de la partie résultat concernant l'ABC-DLBCL du manuscrit de thèse, montrant une cellule d'ABC-DLBCL dans des conditions de co-inhibition d'HSP110 et PI3K, montrant les cibles des inhibiteurs comment ils impactent la signalisation globale. 98

Figure 40 : Xénogreffes de lignée OCI-LY3 dans des souris NSG. A : Tentative réalisée de xénogreffer 15 millions d'OCI-LY3 pour soutenir les expériences déjà réalisées sur TMD8 dans ce manuscrit. Les traitements avec inhibiteur d'HSP110 #52 ont commencés à J6 et ont été faits tous les 2 jours en même temps que les mesures tumorales. Une première mesure à été réalisée à J4 (7 animaux par groupe). B : Partie de figure tirée de « Specific covalent inhibition of MALT1 paracaspase suppresses B cell lymphoma growth » DOI : 10.1172/JCI99436, montrant une croissance de 5 millions d'OCI-LY3 dans le même modèle animal en conditions non-traitées (carrés noirs) et avec un traitement (carrés blancs). 102

Figure 41 : Schéma adapté de « Micromanagement of Lymphomas » DOI : 10.1371/journal.pbio.0060156, montrant les stades de développement des lymphocytes B de souris impliqués dans la lymphomagenèse des différents modèles présentés jusqu'ici 103

Figure 42 : Résultats préliminaires de la combinaison des inhibiteurs d'HSP110 (composé #52) et de BTK (ibrutinib). En A : expérience de CTG réalisée sur lignée TMD8 montrant l'impact de la co-inhibition pendant 72 heures sur la viabilité cellulaire. En B : marquage annexine V visualisé par cytométrie en flux sur la lignée TMD8 cotraitées pendant 72 heures..... 105

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des proportions de lymphome de Burkitt et diffus à grandes cellules B en fonction de la tranche d'âge (en années), proportions tirées de « Pediatric lymphomas in Brazil » DOI : 10.1590/S1807-59322010001200008. DLBCL : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B. 25

Tableau 2 : Tableau regroupant les particularités génétiques des clusters de la classification du groupe Harvard..... 30

Tableau 3 : Tableau regroupant les particularités génétiques des sous-divisions de la classification LymphGen 30

Tableau 4 : Tableau montrant la correspondance de la classification HMRN par rapport aux classifications Harvard et LymphGen	30
Tableau 5 : Tableau tiré de « Genomic signatures in B-cell lymphoma: How can these improve precision in diagnosis and inform prognosis? » DOI : 10.1016/j.blre.2015.08.002 précisant les proportions des mutations majeures retrouvées dans les ABC et GC-DLBCLs chez les patients.....	34
Tableau 6 : Partie de tableau tirée de « Current options and future perspectives in the treatment of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma » DOI : 10.1177/20406207221103321 montrant les alternatives thérapeutiques employant l'immunothérapie. La réponse globale se définit comme une réponse au moins partielle au traitement et la réponse totale quant à elle signifie une régression tumorale complète.	45
Tableau 7 : Partie de tableau tirée de « Current options and future perspectives in the treatment of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma » DOI : 10.1177/20406207221103321 montrant les alternatives thérapeutiques employant des thérapies ciblées. La réponse globale se définit comme une réponse au moins partielle au traitement et la réponse totale quant à elle signifie une régression tumorale complète.	45
Tableau 8 : Tableau adapté de « Heat-Shock Proteins in Leukemia and Lymphoma: Multitargets for Innovative Therapeutic Approaches » DOI : 10.3390/cancers15030984 présentant les inhibiteurs de HSPs et HSF1 qui ont été employés dans des études précliniques et cliniques pour le traitement de leucémies et lymphomes	47

Abréviations

- (R-)CHOP : (Rituximab) Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine et Prednisone
- (R-)DHAP : (Rituximab) Dexamethasone, Cytarabine et Cisplatine
- (R-)EPOCH (Rituximab) Etoposide, Prednisone, Vincristine, Cyclophosphamide et Doxorubicine
- (R-)ESHAP : (Rituximab) Etoposide, Méthylprednisolone, Cytarabine et Cisplatine
- (R-)ICE : (Rituximab) Ifosphamide, Carboplatine et Etoposide
- 7AAD : 7-aminoactinomycin D
- ABC-DLBCL : Activated B-Cell DLBCL - DLBCL de type activé
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- AID : Activation-Induced cytidine Deaminase – La déaminase activable des cytidines
- AIDS : Acquired Immune Deficiency Syndrome – Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)
- AIRE : Auto-immune REgulator – Régulateur auto-immun
- AKT : Protein kinase B – Kinase B des protéines
- ALCL : Anaplastic Large Cell Lymphoma – Lymphome anaplasique à grandes cellules
- ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase – Kinase du lymphoma anaplasique
- ARL(s) : AIDS-Related Lymphoma – Lymphomes lié au SIDA
- ARN : Acide RiboNucléique
- ATCC : American Type Culture Collection - Collection de type cellulaire américaine
- ATP : Adénosine Tri-Phosphate
- ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein – protéine liée à l'ataxie-télangiectasie et la protéine Rad3
- BAFF : B-cell Activating Factor – Facteur d'activation des cellules B
- BCL : B-Cell Leukemia – Leucémie B
- BCR : B-Cell Receptor – Récepteur des Cellules B
- BIA-ALCL : Breast Implant–Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma - ALCL associé à un implant mammaire
- Blimp-1 : B Lymphocyte-Induced Mature Protein-1 – La protéine mature induite par les lymphocytes B
- BSA : Bovine Serum Albumin – Albumine du sérum bovin
- BTK : Bruton's Tyrosine Kinase – Kinase des tyrosines de Bruton
- CARD11 : Caspase Recruitment Domain Family Member 11 – Membre 11 de la famille du domaine de recrutement des caspases
- CDX : Cluster of Differentiation X – Groupement de différenciation X
- CERMN : Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie
- cHL(s) : classical Hodgkin Lymphoma(s) – Lymphome(s) hodgkinien(s) classique(s)
- CHU : Centre Hospitalier Universitaire
- CLL : Chronic Lymphocytic Leukemia – Leucémie lymphoïde chronique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

c-Myc : cancer-Myelocytomatosis oncogene – Oncogène de la myélocytomatose du cancer

COO : Cell Of Origin – Cellule d'origine

CREBBP : C-AMP Response Element-binding protein Binding Protein - Protéine de liaison à l'élément de réponse C-AMP

CTG : Cell Titer Glo

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DEL(s) : Double-Expresser Lymphoma(s) – Lymphome(s) double-expressions

DHL(s) : Double Hit Lymphoma(s) - Lymphome(s) double-réarrangements

DLBCL R/R : DLBCL Relapsed or Refractory – DLBCL résistant ou en rechute

DLBCL(s) : Diffuse Large B-Cell Lymphoma(s) – Lymphome(s) B diffus à grandes cellules

DLBCL-NOS : Non-Otherwise specified DLBCL – DLBCL non spécifié

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium – Milieu Eagle modifié de Dubelcco

EBV : Epstein-Barr Virus - Virus d'Epstein-Barr

ECL : Enhanced Chemi-Luminescence

ETP : Early T-cell progenitor - Progéniteurs thymiques précoces

EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2 - L'amplificateur de l'homologue de zeste 2

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization – Fluorescence par Hybridation *in situ*

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

GC-DLBCL : Germinal Centre DLBCL - DLBCL de type centre germinatif

GEP : Genetic Expression Profiling – Profil d'expression génétique

GNA13 : Guanine Nucleotide-binding protein subunit alpha-13 - Sous-unité alpha-13 de la protéine de liaison des nucléotides à la guanine

GRP170 : Glucose-Related Protein 170 – Protéine associée au glucose 170

GVEC(s) : Grosse(s) Vésicule(s) Extra-Cellulaire(s)

HHV8 : Human HerpesVirus 8 - Herpèsvirus humain type 8

HIV : Human Immunodeficiency Virus – Virus de l'immunodéficience humaine

HL(s) : Hodgkin Lymphoma(s) – Lymphome(s) hodgkinien(s)

HSC70 : Heat Shock Cognate 70 - Protéine apparentée au choc thermique 70

HSF1 : Heat Shock Factor 1 – Facteur de choc thermique 1

HSP(s) : Heat Shock Protein(s) – Protéine(s) de choc thermique

IgG : G immunoglobulin – Immunoglobuline G

IKK : IκB Kinase – Kinase d'IκB

IL-X : Interleukin X – Interleukine X

IL-XR : Interleukin X Receptor – Récepteur à l'interleukine X

IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium - Milieu modifié de Dulbecco de Iscove

IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase – Kinase associée au récepteur à l'interleukine 1

IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4 - Facteur 4 régulateur de l'interféron

IκB : Inhibitor of nuclear factor kappa B - Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B

JAK2 : Just Another Kinase 2 – Juste une autre kinase 2

MALT1 : Mucosa-Associated lymphoid tissue Lymphoma Translocation protein 1 - Protéine de translocation 1 du tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MEF2B : Myocyte Enhancer Factor 2B - Facteur 2B de stimulation des myocytes

MUM1 : Multiple Myeloma 1 – Myélome multiple 1

MyD88 : Myeloid Differentiation primary response 88 - Réponse primaire de différenciation myéloïde 88

NBD : Nucleotide-Binding Domain – Domaine de liaison au nucléotide

NES : Nuclear Export Signal – Signal d'export nucléaire

NF-κB : Nuclear Factor-Kappa B – Facteur nucléaire kappa B

NHLs : Non-Hodgkin Lymphoma(s) – Lymphome(s) non-hodgkinien(s)

NLS : Nuclear Localization Signal – Signal de localisation nucléaire

NTA : NanoTracking Analysis - Analyse du suivi individuel de particules

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORP150 : Oxygen-Related Protein 150 – Protéine associée à l'oxygène 150

PBS(-T) : Phosphate-Buffered Saline (-Tween) – Solution saline tamponnée par le phosphate (avec Tween)

PCNSL : Primary Central Nervous System Lymphoma - Lymphome primaire du système nerveux central

PFA : ParaFormAldéhyde

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIP2 : Phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate

PIP3 : Phosphatidyl-Inositol (3,4,5)-trisphosphate

PKCβ : Protein Kinase C β – Protéine kinase C β

PLA : Proximity Ligation Assay – Expérience (ou test) de ligature de proximité

PLCγ2 : Phospholipase C gamma 2

PMB(C)L : Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma - Lymphome B primitif du médiastin

PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride - Fluorure de phénylméthylsulfonyle

PRMD1 : PR/SET Domain 1 – Domaine PR/SET 1

PSA : Pénicilline, Streptomycine et Amphotéricine B

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog – Homologue de la phosphatase et de la tensine

PVEC(s) : Petite(s) Vésicule(s) Extra-Cellulaire(s)

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium – Milieu de l'institut du mémorial du parc de Roswell

SGK1 : Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1 - Sérum et kinase 1 régulée par les glucocorticoïdes

siARN : small interfering RNA – Petit ARN interférent

SLL : Small Lymphocytic Leukemia – Leucémie à petits lymphocytes

SOCS1 : Suppressor Of Cytokine Signaling protein 1 - Suppresseur de la protéine de signalisation des cytokines 1

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription - Transducteur et activateur de signaux de transcription

SVF : Sérum de Veau Fœtal

SYK : Tyrosine-Protein Kinase – Kinase des protéines possédant des tyrosines

TBS(-T) : Tris-Buffered Saline (-Tween) – Solution saline tamponnée par le Tris (avec Tween)

THL(s) : Triple Hit Lymphoma(s) - Lymphome(s) triple-réarrangements

TLR(s) : Toll-Like Receptor(s) – Récepteur(s) de type Toll

TSG101 : Tumor Susceptibility Gene 101 protein – Gène de susceptibilité tumorale 101

TMA : Tissue MicroArray - Microréseau tissulaire

TNFAIP3 : TNF Alpha Induced Protein 3 – La protéine 3 induite par le TNF alpha

TP53 : Tumor Protein 53 – Protéine tumorale 53

VEC(s) : Vésicule(s) Extra-Cellulaire(s)

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor - Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

XBP1 : X-box Binding Protein-1 – La protéine accrochant la boîte X 1

XPO1 : eXportin 1 – Exportine 1

XTT : 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

Contexte de l'étude

Il est aujourd'hui bien établi que les cellules tumorales acquièrent une dépendance biologique aux protéines de stress dont les protéines de choc thermique (HSPs) lors de la transformation maligne [1]. Les HSPs sont des protéines chaperonnes hautement conservées dont l'expression est induite en réponse à de multiples stress physiologiques et environnementaux. Dans ces contextes, elles contrôlent un large éventail de fonctions cellulaires afin de sauver la cellule de conditions mortelles. Mon laboratoire de thèse a découvert au cours des 5 dernières années qu'HSP110, une HSP de haut poids moléculaire dotée de propriétés anti-agrégatives, joue un rôle majeur dans la prolifération des cellules cancéreuses [2].

Dans le cancer du côlon, mon laboratoire a montré qu'HSP110 est une HSP cruciale dans divers aspects du développement tumoral, associée à un mauvais pronostic de survie des patients et constitue donc une nouvelle cible thérapeutique de première importance [3], [4]. Plus récemment, nous avons montré dans les lymphomes non hodgkiniens qu'HSP110 joue un rôle primordial dans les fonctions intra- et extracellulaires permettant la survie et la croissance des cellules de lymphome [3]–[6]. L'identification et la validation fonctionnelle d'inhibiteurs d'HSP110 a donc constitué un objectif prioritaire de mon équipe.

Grâce à une stratégie de criblage d'une chimiothèque du CERMN (Université de Caen Basse-Normandie) basée sur la capacité de ces molécules à interférer avec l'activité anti-agrégative connue de HSP110, trois molécules (#61, #52 et #33) ont été mises en évidence. Les composés #52 et #33 possèdent une structure proche, #61 étant un peu différente. *In vitro*, les trois molécules inhibent l'activité chaperonne d'HSP110 sans inhiber celle de HSP70 ou HSP90, suggérant ainsi une spécificité d'action (numéro de brevet : US20210186941A1). Dans le cancer colorectal, les inhibiteurs #52 et #33 d'HSP110 ont montré une redoutable efficacité sur la mort cellulaire *in vitro*, et *in vivo*, et le mécanisme d'action moléculaire de l'inhibition d'HSP110 a été révélé [7]. En effet, HSP110 chaperonne STAT3, une protéine majeure impliquée dans la survie des cellules. L'inhibition d'HSP110 limite ce chaperonnage, menant à la perte du signal de survie [7].

Profitant de l'engouement du service d'hématologie du CHU de Dijon pour l'étude de notre équipe portant sur HSP110 dans les lymphomes non-Hodgkiniens [2], j'ai saisi l'opportunité, en début de thèse, de tester ces inhibiteurs dans le lymphome B diffus à grandes cellules de type activé (ABC-DLBCL), un sous-type de lymphome non-hodgkinien, ainsi que dans le lymphome B primitif du médiastin (PMBL), un variant spécifique des DLBCLs.

Introduction

Les lymphomes et leur classification

Un lymphome est un cancer qui se développe à partir de cellules immunitaires particulières nommées « lymphocytes ». Ce type de cancer peut se mettre en place chez tous les lymphocytes (lymphocytes B, T et NK) et à tous les stades de différenciation (du précurseur à la cellule mature) [8]. Devant cette grande diversité de pathologies, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO en anglais) répertorie les lymphomes en fonction de critères cliniques, anatomopathologiques et moléculaires pour permettre une prise en charge et un traitement adapté aux patients [9]. Dans cette recherche de classification, on distingue tout d'abord 2 grands groupes de lymphomes : les lymphomes Hodgkiniens, ou HLs et les lymphomes non-hodgkiniens, ou NHLs.

Tout d'abord, les lymphomes Hodgkiniens qui représentent 15% de tous les lymphomes se caractérisent par la présence de cellules très particulières, nommées cellules de Reed-Sternberg [10]. Ces cellules cancéreuses ne forment qu'1% de la tumeur [11] et dépendent de la voie NF-κB pour survivre [12]. Les HLs se divisent en 2 catégories (**Figure 1**), le lymphome nodulaire à prédominance lymphocytaire et les lymphomes Hodgkiniens classiques ou cHLs. Les HLs sont plutôt de bon pronostic, puisque plus 80% des patients atteints sont en rémission complète après traitement spécifique prenant en compte le stade de développement de la tumeur [13].

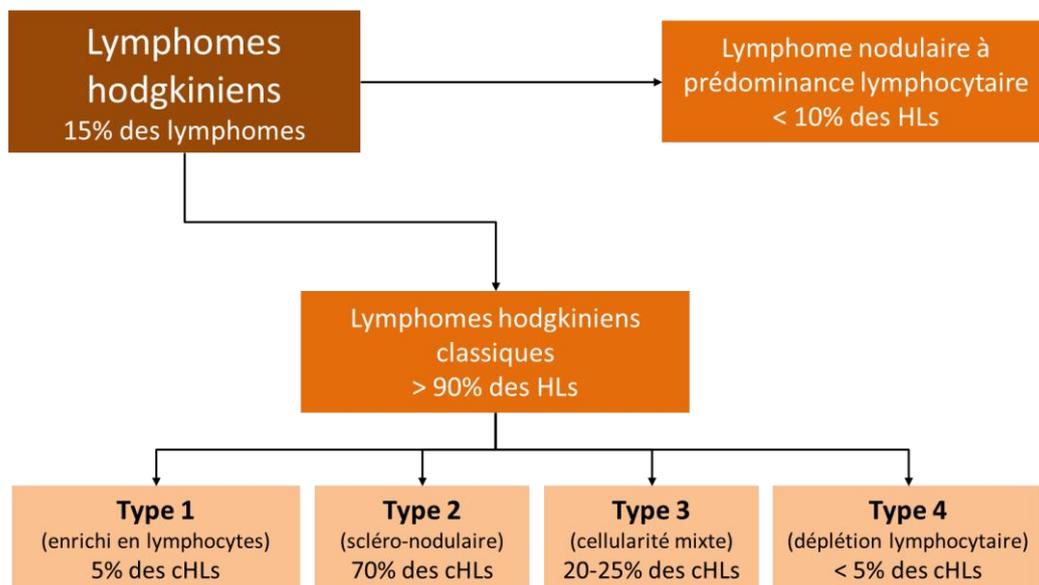


Figure 1 : Schéma représentant tous les types et sous-types de lymphomes hodgkiniens ainsi que la prévalence de chacun d'entre-eux, basé sur les valeurs de « Hodgkin lymphoma : A review and update on recent progress » DOI : 10.3322/caac.21438. HLs = Lymphomes Hodgkinien ; cHLs : Lymphomes Hodgkiniens classiques.

Les lymphomes non-hodgkiniens (ou NHLs), quant à eux, comptent un spectre très large de pathologies différentes, dont les pronostics chez les patients peuvent être plutôt bons pour les

lymphomes à progression lente ou plutôt mauvais voire très mauvais pour les lymphomes les plus agressifs. Les stades de différenciation des lymphocytes à l'origine des NHLs peuvent être extrêmement variés. Un lymphome émergent de lymphocytes plus ou moins différenciés garde au moins en partie des caractéristiques du stade de différenciation desdits lymphocytes, ce qui explique leur grande hétérogénéité [14]. A partir de là, il est possible de classer les lymphomes en fonction de leur développement : ils peuvent être des lymphomes à développement lent (ou indolents) ou alors des lymphomes à développement rapide (ou agressifs).

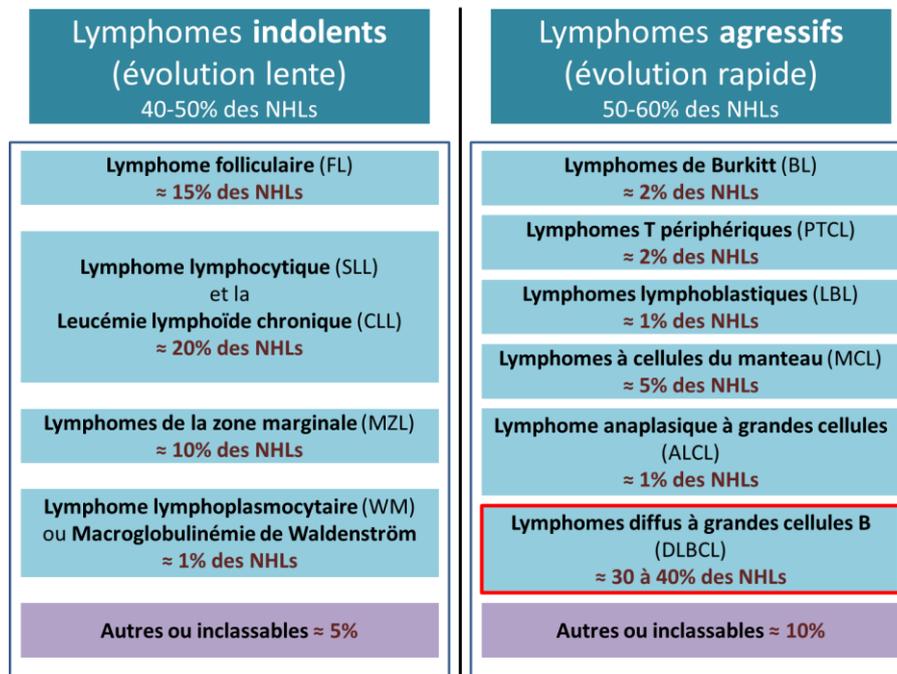


Figure 2 : Schéma classant les types majoritaires (représentant au moins 1% des cas) de lymphomes non-hodgkiniens (NHLs) chez l'adulte en fonction de leur rapidité d'évolution. La prévalence pour chacun des lymphomes est basée sur « Non-Hodgkin lymphoma subtype distribution, geodemographic patterns, and survival in the US: A longitudinal analysis of the National Cancer Data Base from 1998 to 2011 » DOI : 10.1002/ajh.24086 ; « Long-term survival after T-cell lymphoblastic lymphoma treated with one cycle of hyper-CVAD regimen » DOI : 10.4143/crt.2013.122 et « T-cell non-hodgkin lymphomas: Spectrum of disease and the role of imaging in the management of common subtypes » DOI : 10.3348/kjr.2017.18.1.71

On constate sur la **Figure 2** que chez l'adulte, il y a globalement plus de lymphomes agressifs (et donc de mauvais pronostic pour les patients) que de lymphomes indolents, et qu'un lymphome en particulier est majoritaire. En effet, avec ses 30-40% de prévalence, le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) est de loin le lymphome agressif majoritaire [15]. Il faut bien noter que cette distribution est vraie chez l'adulte, mais ne l'est pas chez l'enfant. De manière générale, la distribution des NHLs chez l'enfant (**Tableau 1**) reste globalement la même à l'exception du lymphome de Burkitt (LB) et du DLBCL [16]. Il y a en effet plus de lymphomes de Burkitt chez les plus jeunes que chez les plus âgés, et cette valeur tend à diminuer jusqu'à atteindre celle de l'âge adulte. Et il s'agit de l'inverse pour le DLBCL qui lui augmente et tend à augmenter jusqu'aux valeurs adultes.

Lymphome \ Âge (en années)	0-5	6-10	11-14	15-18
Burkitt	56%	44%	32%	15%
DLBCL	1,6%	6%	14%	27%

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des proportions de lymphome de Burkitt et diffus à grandes cellules B en fonction de la tranche d'âge (en années), proportions tirées de « Pediatric lymphomas in Brazil » DOI : 10.1590/S1807-59322010001200008. DLBCL : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B.

Certains lymphomes ne peuvent pas être intégrés à cette classification. En effet, il est possible qu'on ait affaire à des lymphomes dont la nature peut changer en fonction des patients, c'est par exemple le cas du lymphome primaire du système nerveux central (PCNSL) qui est nommé ainsi grâce aux sites de développement de la pathologie (yeux, cerveau, moëlle épinière et les leptoméninges) mais qui peut prendre différentes formes. Il peut s'agir à 90% d'un DLBCL, mais peut également être un lymphome de Burkitt ou lymphome lymphoblastique [17]. Il est également possible de trouver des lymphomes opportunistes, dont le développement est associé par la présence d'une pathologie déjà existante, c'est par exemple le cas des lymphomes associés au virus de l'immunodéficience humaine (HIV) abrégé en ARLs (pour AIDS-Related Lymphoma). Les ALRs les plus fréquents sont les DLBCL, le lymphome de Burkitt et le PCNSL. Les traitements à utiliser ne diffèrent pas mais leur administration doit être compatible avec la prise d'antirétroviraux [18]. Enfin certains types de lymphomes comptent des lymphomes dont l'évolution est variable, il s'agit par exemple des lymphomes cutanés indolents tel que le lymphome cutané primaire des centres folliculaires ou bien des lymphomes cutanés agressifs tel que le lymphome cutané primaire diffus à grandes cellules de type jambe [19]. Leur classification est difficile car elle est redondante (lymphomes à la fois indolent et agressif).

La classification de l'OMS regroupant l'intégralité des lymphomes et leucémies tend à se mettre à jour d'année en année pour inclure de nouvelles pathologies. C'est par exemple le cas du lymphome associé à un implant mammaire (BIA-ALCL) qui fait partie de la famille des lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALCLs). Pourtant, de par son site très spécifique de développement, il possède des particularités anatomopathologiques qui le rendent indépendant et possède un protocole de traitement particulier [20]. C'est la raison pour laquelle ce lymphome possède sa propre entrée dans la classification.

Les chimiothérapies actuelles pour les lymphomes B indolents ou agressifs sont R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine et Prednisone), sauf pour le lymphome du manteau (MCL) où R-CHOP est alternée avec R-DHAP (Rituximab, Dexaméthasone, Cytarabine et Cisplatine) et pour le lymphome de Burkitt, traité de manière générale avec R-EPOCH (Rituximab, Etoposide, Prednisone, Vincristine, Cyclophosphamide et Doxorubicine). Pour les lymphomes T/NK, la chimiothérapie employée le plus souvent est CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine et Prednisone) [14], [21].

Les lymphomes diffus à grandes cellules B

Comme nous avons pu le voir précédemment, le type d’NHLs le plus fréquent chez l’adulte est le DLBCL. Les DLBCLs comprennent de nombreux sous-types, certains étant des variants spécifiés et bien caractérisés, soit sur la base de leur caractères morphologiques, soit sur la base de leur immunophénotypage, soit par les désordres biologiques ou cliniques associés à l’apparition de ces lymphomes. Ces lymphomes représentent 20% de tous les DLBCL [22], et par opposition, il existe des DLBCL non-spécifiés (on parlera alors de non-otherwise specified DLBCL, ou DLBCL-NOS) comprenant 3 sous-types : le DLBCL de type activé (ABC, ou ABC-DLBCL), le DLBCL de type centre germinatif (GC, GCB, GC-DLBCL ou GCB-DLBCL) et le DLBCL de type III (Type3, ou Type3-DLBCL) (**Figure 3**). Historiquement, c’est par profil d’expression génétique (GEP) sur 240 échantillons de patients puis sur lignées cellulaires que ces 3 types de DLBCL-NOS ont été identifiés, ce qui avait été une véritable révolution pour l’époque [23] : les lymphomes exprimant des gènes plutôt retrouvés dans les cellules B activées (plasmoblastiques) ont été nommés ABC, ceux exprimant des gènes plutôt retrouvés dans les cellules B du centre germinatif (zone sombre) ont été nommés GC (ou GCB), et enfin ceux qui ont des caractéristiques intermédiaires ont été nommés Type III. La GEP est la méthode optimale pour déterminer à quel sous-type exact un DLBCL-NOS appartient. Cependant, pour le diagnostic, ce sont les marquages immunohistochimiques qui sont employés. En effet, c’est en suivant un arbre décisionnel en fonction des résultats des marquages que les anatomopathologistes parviennent à conclure sur le type de cellule d’origine (ou COO) et donc au sous-type de lymphome (**Figure 4**). Cependant, la méthode n’est pas aussi précise que la GEP, on ne peut discriminer que deux types de DLBCL-NOS : le GC-DLBCL et le non-GC-DLBCL, ce dernier groupe comportant à la fois l’ABC et le Type3 [24].

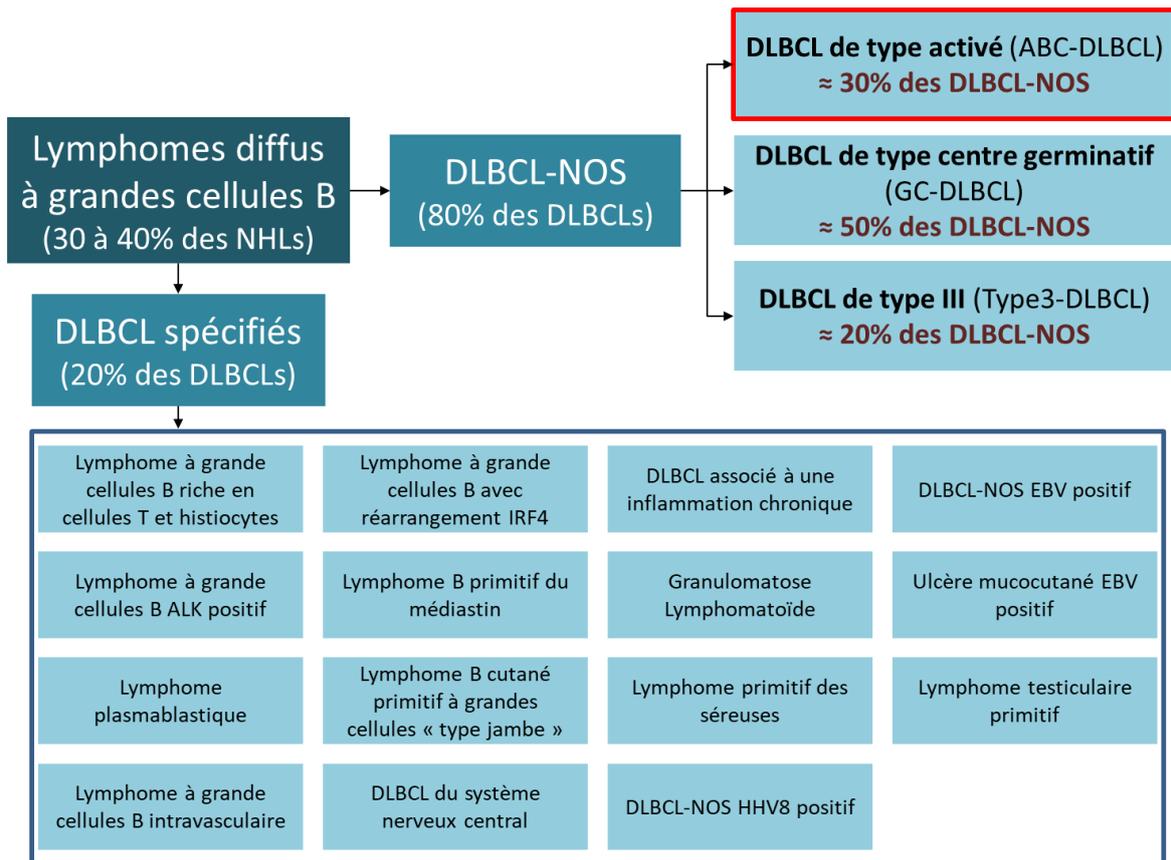


Figure 3 : Schéma représentant la classification des lymphomes B diffus à grandes-cellules, basé sur les entrées obtenues dans « Diffuse large B-cell lymphoma variants : an update » DOI : 10.1016/j.pathol.2019.08.013

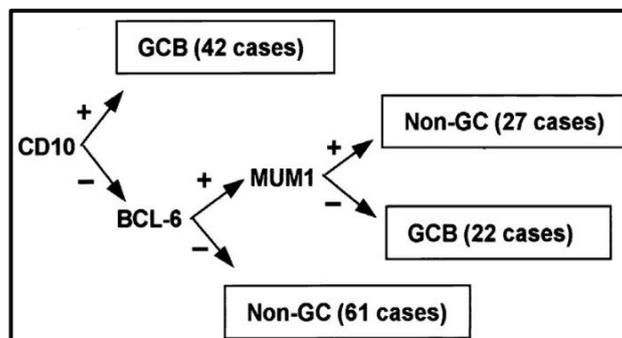


Figure 4 : Schéma représentant l'arbre décisionnel utilisé par les anatomopathologistes pour déterminer le type de cellule d'origine (COO) du lymphome diffus à grandes cellules B. Les valeurs correspondent à celles de patients, 152 en tout. Tiré de « Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray » DOI : 10.1182/blood-2003-05-1545

Pourtant, la méthode d'identification par immunohistochimie est jugée suffisante, car les ABC-DLBCL et Type3-DLBCL ont tous deux un pronostic similaire, différent de celui du GC-DLBCL [24], [25]. Comme nous pouvons l'observer **Figure 5B**, le GC-DLBCL est de meilleur pronostic que l'ABC et le Type3, mais également que la détermination du sous-type par immunohistochimie (aussi appelée TMA pour Tissue MicroArray) et par GEP donne des résultats similaires [25]. Ainsi, de manière plus générale, on peut voir **Figure 5A** que le sous-type GC possède un pronostic plus favorable (survie au bout de 5 ans de 76% contre 34% pour les non-GC).

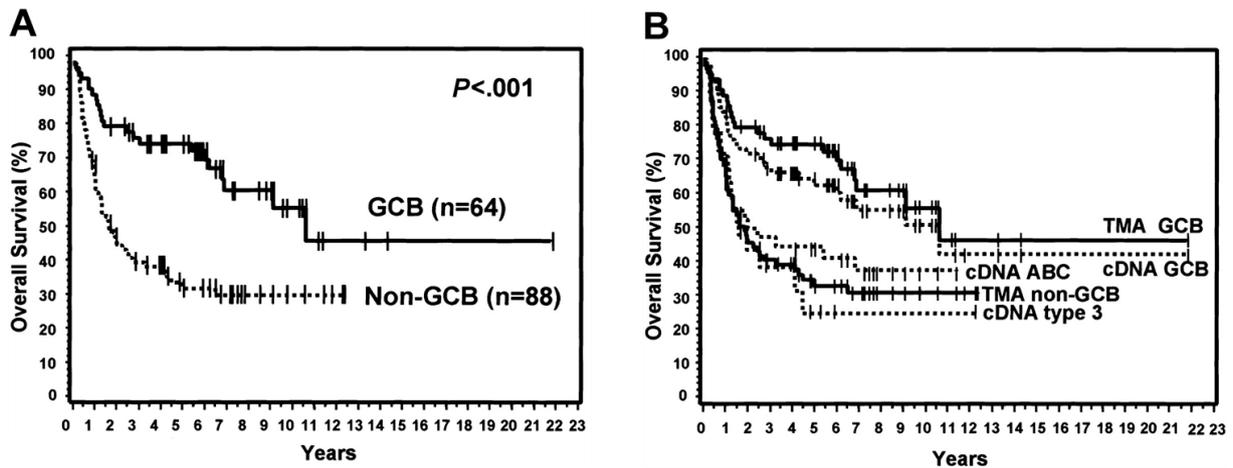


Figure 5 : En (A) : Graphique représentant la survie globale (en %) de patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B en fonction du temps (en année) dont la caractérisation a été effectuée par marquages immunohistochimiques. En (B) : Graphique représentant la survie globale (en %) de patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B en fonction du temps (en année) dont la caractérisation a été effectuée par marquages immunohistochimiques et par génotypage dans le but de comparer les deux méthodes. Tiré de l'article « Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray » DOI : 10.1182/blood-2003-05-1545. TMA = Tissue Micro-Array ; cDNA = ADN complémentaire.

Actuellement, la chimiothérapie standard donnée en cas de DLBCL est la chimiothérapie R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone) et environ 65% des patients répondent [26]. Pour les 35% ne répondant pas ou mal, il est important de se focaliser sur un traitement plus spécifique en étudiant de nouvelles cibles thérapeutiques.

Certaines modifications dans l'ADN (mutations, réarrangements chromosomiques...) peuvent influencer sur le pronostic d'un DLBCL. En effet, deux réarrangements très connus dans le DLBCL sont les translocations t(14;18) et t(8;14), impliquant respectivement les oncogènes bcl2 (codant la protéine BCL2, molécule anti-apoptotique) et c-myc (codant pour un facteur de transcription impliqué dans l'expression de 15% des gènes du génome). Par hybridation *in situ* avec sondes fluorescentes (FISH), il a été déterminé qu'entre 5 et 10% des DLBCLs possédaient les 2 réarrangements. On parle de lymphomes Double-Hit (DHLs) et de lymphomes Triple-Hit (THLs) si une autre translocation implique le gène codant pour BCL6. 91% des DHLs sont des GC-DLBCLs (**Figure 6**). Comme vu précédemment, les GC-DLBCLs sont de meilleurs pronostics que les non-GC-DLBCLs (**Figure 5A**), mais les DHL-GC-DLBCLs représentent une exception [24].

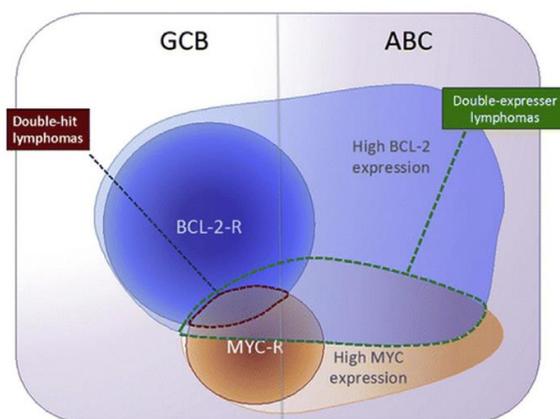


Figure 6 : Schéma représentant les proportions de lymphomes Double-Hit et Double-Expresser en fonction du type de DLBCL. Tiré de « Advances in Diagnosis and Management of Diffuse Large B-cell Lymphoma » DOI : 10.1016/j.cml.2017.10.007. BCL-2-R = Possédant le réarrangement t(14;18) ; MYC-R = Possédant le réarrangement t(8;14).

On peut également noter l'existence de lymphomes double-expresser (DELS) (**Figure 6**). Ces DLBCLs ne possèdent pas les réarrangements chromosomiques décrits plus haut mais surexpriment tout de même les gènes codant pour BCL2 et c-Myc. La plupart des DELs sont des non-GC-DLBCLs (66% contre 34% de GC-DLBCLs). Les DELs représentent 1/3 des nouveaux cas de DLBCLs [27]. Le pronostic pour ces lymphomes est intermédiaire : ils sont de meilleur pronostic que les DHLs mais plus mauvais que les non-DELS [26]. On note d'ailleurs que, par définition, les DHLs sont forcément des DELs puisque les réarrangements chromosomiques conduisent à la surexpression des oncogènes c-Myc et BCL2 (**Figure 6**) [24].

Enfin, un dernier facteur peut détériorer le pronostic des patients atteints de DLBCL. Il s'agit de l'expression de CD5, un antigène exprimé par les cellules T et quelques lymphocytes B particuliers que l'on retrouve dans les follicules du cortex des ganglions lymphatiques. On retrouve surtout ces cellules dans la CLL/SLL, ainsi que dans le lymphome à cellules du manteau. Dans les DLBCLs, CD5 est exprimé dans 5 à 10% des cas, les patients ayant un DLBCL CD5⁺ ont un pronostic vital plus faible que chez les autres lorsqu'ils sont traités avec R-CHOP. L'expression de CD5 s'observe plus dans les non-GC-DLBCLs, CD5 est supposé comme permettant la survie des cellules de lymphome en activant des voies de signalisation telles que la voie ERK, PI3K et calcineurine [26].

Récemment, de nouvelles classifications modernes des DLBCLs ont vu le jour. Ces classifications tendent à sous-diviser les sous-types ABC, GC et Type3 en de nouveaux sous-groupes partageant des similarités génétiques. Notamment, le groupe Harvard identifie 5 sous-groupes chez 304 cas de DLBCLs possédant des répertoires d'altérations génétiques similaires. Ces sous-groupes, aussi appelés « clusters » sont nommés de C1 à C5 [28] dont les détails sont données **Tableau 2**.

Cluster	Particularités génétiques
<i>C0</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aucune mutation détectable
<i>C1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fusion du gène BCL6 avec le promoteur du gène codant pour les immunoglobulines • Mutations dans le gène codant pour NOTCH2
<i>C2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations dans le gène codant pour p53
<i>C3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Translocation du gène codant pour BCL2 • Mutation des gènes codant pour CREBBP et EZH2
<i>C4</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations du gène codant pour SGK1 et gènes codant pour des protéines de liaisons des histones
<i>C5</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations dans les gènes codant pour MyD88 et CD79B

Tableau 2 : Tableau regroupant les particularités génétiques des clusters de la classification du groupe Harvard

Pour continuer sur les classifications modernes des DLBCLs, le National Cancer Institute est à l'origine d'une classification nommée LymphGen réalisée à partir de données de séquençage et de profilage transcriptionnel sur 574 patients. Ces sous-groupes, ou sous-divisions, sont nommés en fonction des caractéristiques distinctives les plus représentatives de chaque groupe [28], dont les particularités sont données **Tableau 3**.

Sous-division	Particularités génétiques
<i>MCD</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations dans les gènes codant pour CD79B et MyD88
<i>BN2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Altérations dans la structure du gène codant pour BCL6 • Mutations dans le gène codant pour NOTCH2
<i>ST2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations dans les gènes codant pour SGK1 et TET2
<i>EZB</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations dans le gène codant pour EZH2 • Translocation du gène BCL2
<i>N1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations du gène codant pour NOTCH1 et/ou NOTCH 2
<i>A53</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aneuploïdie • Mutations dans le gène codant pour p53
<i>Autres</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Inclassables

Tableau 3 : Tableau regroupant les particularités génétiques des sous-divisions de la classification LymphGen

Également, après séquençage de 293 gènes issus de 928 cas de patients atteints de DLBCL, une classification différente proposée par le UK Haematological Malignancy Research Network (HMRN) se distingue des deux précédentes par des algorithmes de classification différents, des méthodes de séquençage différentes et une approche statistiques différentes [28] (**Tableau 4**).

Sous-groupe	Correspondance Harvard	Correspondance LymphGen
<i>MYD88</i>	<ul style="list-style-type: none"> • C5 	<ul style="list-style-type: none"> • MCD
<i>BCL2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • C3 	<ul style="list-style-type: none"> • EZB
<i>NOTCH2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • C1 	<ul style="list-style-type: none"> • BN2
<i>SGK1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • C4 	<ul style="list-style-type: none"> • ST2
<i>Inclassable</i>	<ul style="list-style-type: none"> • C2 	<ul style="list-style-type: none"> • N1 et A53

Tableau 4 : Tableau montrant la correspondance de la classification HMRN par rapport aux classifications Harvard et LymphGen

Oncogénèse et voies de signalisation

Importance de la cellule d'origine (Cell of Origin, ou COO)

Comme nous avons pu le voir partie « Les lymphomes diffus à grandes cellules B », c'est grâce aux travaux réalisés en 2000 par GEP que les 3 sous-types actuels de DLBCL-NOS ont pu être distingués. En effet, c'est grâce à l'identification d'une différence dans la COO qu'on peut expliquer des différences dans le développement et dans le pronostic des patients, en dissociant ABC et GC. Cependant, la **Figure 7A** (simplification de la **Figure 3**) montrant la classification des DLBCLs spécifiés versus NOS n'est pas la plus adaptée pour comprendre cette notion de COO. En effet, il y a en tout 3 types majeurs de COO impliqués dans la mise en place des DLBCLs comme on peut le voir **Figure 7B**.

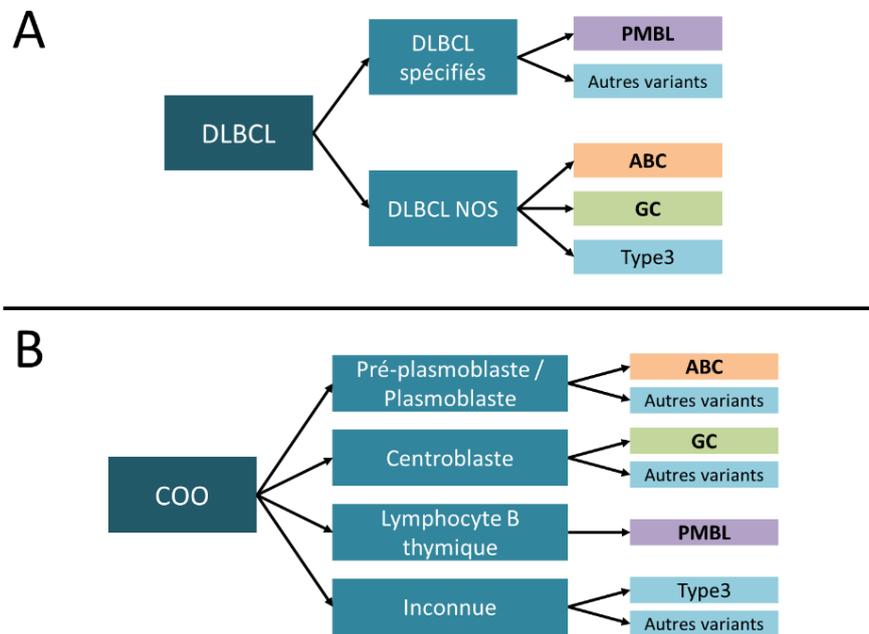


Figure 7 : Schémas représentant en (A) une classification simplifiée des DLBCLs spécifiés et non-spécifiés (NOS) et en (B) une classification de ces mêmes DLBCLs en fonction de leur COO, mettant en avant l'ABC, le GC et le PMBL.

Ces 3 types cellulaires sont :

- **Les (pré)plasmoblastes** de la zone claire du centre germinatif, à l'origine de l'ABC-DLBCL ainsi que de certains variants spécifiés tel que le lymphome B cutané primitif de type jambe [29]
- **Les centroblastes** de la zone sombre du centre germinatif, à l'origine du GC-DLBCL ainsi que de certains variants spécifiés tel que le DLBCL riche en histiocytes et lymphocytes T [30]
- **Les lymphocytes B thymiques**, restreints dans le thymus, à l'origine du lymphome B primitif du médiastin, ou PMBL [31]

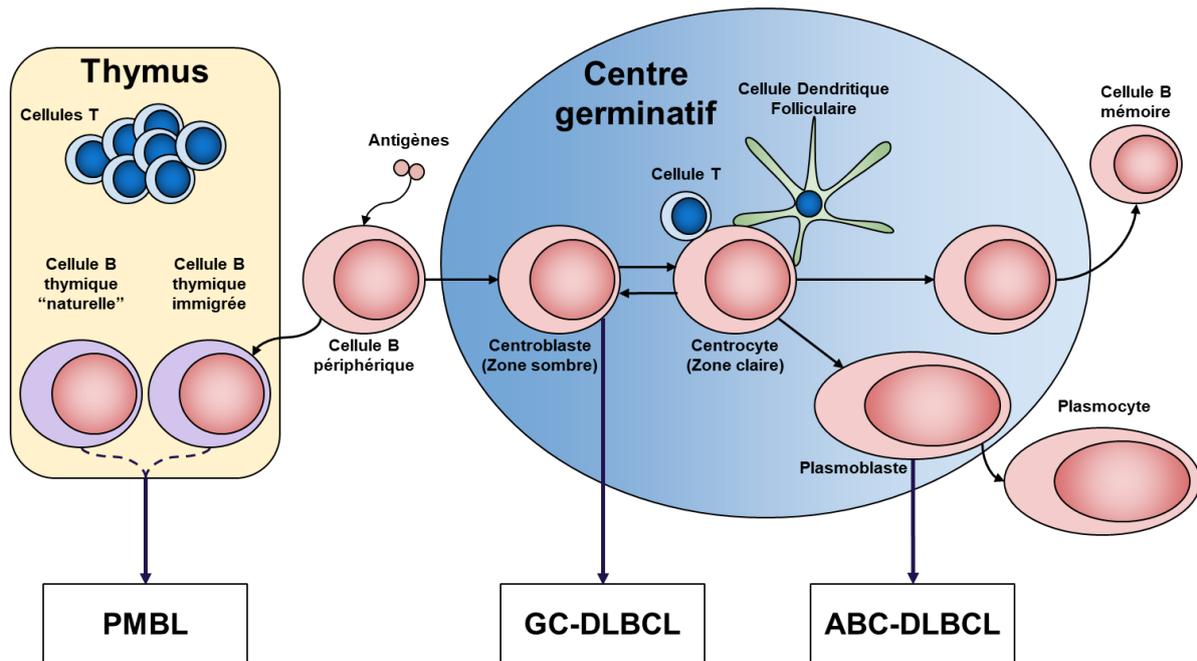


Figure 8 : Schéma représentant l'origine des types cellulaires à l'origine de l'ABC-DLBCL, du GC-DLBCL et du PMBL. Cellule B thymique « naturelle » = cellule B thymique issue d'une lymphopoïèse B dans le thymus.

Comme on peut le voir **Figure 8**, l'origine des centroblastes et plasmoblastes est commune, et résulte du processus de maturation d'affinité des immunoglobulines d'un lymphocytes B. Tout d'abord, un lymphocyte B, activé, peut gagner sa maturation dans les organes lymphoïdes secondaires. Une fois à l'intérieur, il entre dans la zone sombre, une zone dans laquelle il peut opérer une expansion clonale. Puis, s'opèrent des hypermutations somatiques qui ont pour but d'augmenter l'affinité d'un anticorps produit par un lymphocyte B spécifique à un antigène. Le lymphocyte B qui se trouve dans la zone sombre est baptisé centroblaste et, à la suite de ces modifications dans son gène codant pour les immunoglobulines, ces dernières sont testées par des lymphocytes T folliculaires, avec l'aide de cellules dendritiques folliculaires dans la zone claire. Celles-ci donneront un signal d'activation ou de retour dans la zone sombre pour opérer de nouvelles mutations. Si le signal d'activation est donné, alors le lymphocyte B, nommé centrocyte peut mettre en place la commutation de classe puis commence sa maturation en pré-plasmoblaste puis plasmoblaste et enfin en plasmocyte une fois sorti de l'organe lymphoïde secondaire : on parle de sélection clonale [32].

A l'heure actuelle, l'origine exacte des lymphocytes B thymiques n'est pas complètement élucidée. Il y a deux théories majeures qui semblent cohabiter. La première est la théorie de l'immigration, par laquelle des lymphocytes de la circulation périphérique sont programmés pour immigrer dans le thymus. La seconde est la théorie d'une lymphopoïèse B à partir de progéniteurs thymiques précoces (ETP) qui, mis dans un certain contexte cytokinique, deviennent par défaut des cellules B thymiques [33]. Dans chacun des cas, ces lymphocytes B ont des caractéristiques de cellules B matures [34]. Ces lymphocytes B particuliers sont très atypiques : une fois à l'intérieur du thymus, ils

n'en ressortent plus, ils peuvent proliférer mais sont incapables de se différencier en plasmocytes. Les seules immunoglobulines que ces lymphocytes peuvent produire sont leurs immunoglobulines de surface. Ils expriment AIRE (régulateur auto-immun) et sont auto-réactifs, dans le sens où ils peuvent capter des auto-antigènes thymiques et les présenter sur leur très nombreuses molécules du CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) [33], [35]–[37]. Au sein du thymus, ils ont pour rôle de participer à la sélection négative des lymphocytes T CD4⁺ en présentant des auto-antigènes sur leur CMH-II. Si un lymphocyte T CD4⁺ lie trop fortement un de ces auto-antigènes, le lymphocyte B thymique peut induire la mort de ce lymphocyte T [33].

Instabilité génétique : oncogénèse des DLBCLs

ABC et GC

Les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires possèdent un microenvironnement favorable à la prolifération des centroblastes. En effet, ceux-ci possèdent un temps de doublement inférieur à 12 heures, et c'est dans ces structures que les différents évènements indispensables à la maturation des immunoglobulines sont effectués, à savoir l'expansion clonale, l'hypermutation somatique, la sélection clonale et la commutation de classe [38]. À ce stade, les cellules B expriment IRF8, un facteur de transcription nécessaire pour l'hypermutation somatique et pour la commutation de classe notamment via l'expression d'AID, ainsi que BCL6. En effet, BCL6 est un puissant répresseur d'expression et souvent associé au phénotype GC d'une cellule B [39]. BCL6 réprime directement les expressions de :

- p21 et p27 → Progression du cycle cellulaire
- cMyc → Survie et métabolisme
- ATR et p53 → Réparation de l'ADN
- NFkB1 → Survie et différenciation
- IRF4 et Blimp-1 → Différenciation

Tout ceci fait partie du « programme régulateur du centre germinatif ». Dans ces cellules doivent s'opérer de grandes modifications dans l'ADN au niveau des gènes codant pour les immunoglobulines, qui doivent alors être contrôlées afin de ne pas dériver. Malgré cela, les cellules maintiennent leur capacité à proliférer, ce qui est nécessaire à l'expansion clonale mais qui malheureusement permet aussi à ces cellules d'effectuer de grandes modifications dans leur ADN, sans système de réparation des dommages. A ce stade, c'est l'enzyme AID qui permet l'hypermutation somatique, en convertissant des cytosines en uraciles. Dans ce contexte, ce processus n'affecte que les gènes codant pour les immunoglobulines, mais il a été constaté que le gène codant pour BCL6 et d'autres proto-oncogènes étaient eux aussi sujets à des mutations. On peut ajouter d'ailleurs que si les taux de BCL6 restent

élevés même après sélection clonale, le centrocyte peut ne jamais entamer sa différenciation en pré-plasmoblaste. Dans un contexte de sélection clonale normal, la validation de l'immunoglobuline par un lymphocyte T folliculaire passe par le signal de costimulation donné par CD40L (à la surface du lymphocyte T) avec CD40 (à la surface du centroblaste) ainsi que la stimulation de BAFF et des TLRs. Cela implique des cascades de signalisation, impliquant notamment NF-κB qui mène à la réexpression d'IRF4, éteignant l'expression de BCL6 en se fixant sur son promoteur et ainsi permettant la réexpression de Blimp-1 [38]. On note également l'expression d'XBP1 qui permet à la cellule plasmablastique de commencer la synthèse d'immunoglobulines. Tout ceci fait partie du « programme régulateur des plasmocytes » [39].

Ainsi, nous avons pu voir que les ABC et GC avaient pour origine le centre germinatif. Par GEP, on remarque dans le GC-DLBCL une expression de CD10 et surtout BCL6, ainsi que l'absence d'IRF4 et Blimp-1. À tout ceci s'ajoutent les gènes hautement mutés codant pour les immunoglobulines et, par GEP, il a été montré que des hypermutations somatiques avaient lieu dans le GC-DLBCL [40]. Il est supposé que ce soit à cause d'une dérégulation dans le « programme régulateur du centre germinatif » que l'oncogénèse du GC-DLBCL a pu se mettre en place. À l'inverse, l'ABC aurait plutôt une origine post-GC et n'effectue plus d'hypermutation somatique [40]. Une des caractéristiques importantes de l'ABC-DLBCL est sa surexpression d'NF-κB, nécessaire à sa survie [41]. Le gène codant NF-κB n'est exprimé qu'à partir du moment où le centrocyte entame sa différenciation, lors du « programme régulateur des plasmocytes », il est supposé que lors c'est une dérégulation dans ce programme que l'ABC-DLBCL peut se mettre en place [38]. Pour terminer cette partie, d'autres mutations sont détectées dans les ABC et GC-DLBCLs [42] et sont visibles **Tableau 5**.

<i>Sous-type</i>	<i>ABC</i>	<i>GC</i>
<i>Proportions des mutations retrouvées chez les patients</i>	PRDM1 (25-32) TNFAIP3 (30%) CARD11 (10%) MYD88 (30-37%) CD79b (18%)	EZH2 (23%) CREBBP (32%) SGK1 (13%) GNA13 (33%) TP53 (20%) MEF2B (11%)

Tableau 5 : Tableau tiré de « Genomic signatures in B-cell lymphoma: How can these improve precision in diagnosis and inform prognosis? » DOI : 10.1016/j.blre.2015.08.002 précisant les proportions des mutations majeures retrouvées dans les ABC et GC-DLBCLs chez les patients

PMBL

L'oncogénèse du PMBL est extrêmement mal connue, notamment par le manque de connaissance vis-à-vis de leur COO, les lymphocytes B thymiques. De la même façon que pour le GC-DLBCL, des mutations dans les gènes codant pour les immunoglobulines et pour BCL6 sont observées [34]. Cependant, cela n'est pas incompatible avec les théories précédemment expliquées partie «

Importance de la cellule d'origine (COO) ». Il a été montré qu'une maturation de ces lymphocytes B particuliers peut se faire dans le thymus [43] et que ce serait lors de cette étape que ces lymphocytes pourraient acquérir leur caractères cancéreux.

Supercomplexe My-T-BCR : coopération entre les voies du BCR et du TLR via MyD88 pour une activation d'NF- κ B

Tous les lymphocytes B matures possèdent un BCR, une immunoglobuline de surface propre à chacun, issue des trois processus dont nous avons déjà parlé plus haut, à savoir l'hypermutation somatique, la sélection clonale et la commutation de classe. Le BCR au sens large est un complexe protéique transmembranaire qui se met en place dès les stades les plus immatures du lymphocyte B [44], [45]. Lors d'une réaction immunitaire, le BCR est stimulé par l'antigène, ainsi que par certains TLRs quant à eux stimulés par les divers signaux de danger [45]. Tout d'abord, la liaison de l'antigène à l'immunoglobuline de surface stimule CD79 (a et b), qui est alors phosphorylé, permettant le recrutement de la kinase SYK qui est à son tour phosphorylée [46] permettant la transmission du signal par BTK, PLC γ 2 et PKC β jusqu'à CARD11 par phosphorylation pour finalement recruter MALT1 et BCL10. Ce complexe CARD11-BCL10-MALT1 recrute le complexe IKK [47], phosphorylant I κ B qui sera dégradé, permettant à NF- κ B d'entrer dans le noyau pour y induire des gènes menant à la survie, prolifération et différenciation (**Figure 9**) [48].

Pour ce qui est de la stimulation TLR, c'est la liaison du ligand qui induit différentes cascades de signalisation, pouvant permettre le développement normal du lymphocyte B, d'aider dans ces actions effectrices, de produire des cytokines, d'aider à la présentation d'antigènes et à la production d'anticorps [49]. Un des acteurs majeurs de la signalisation TLR dans les lymphocytes B est la protéine adaptatrice du TLR nommée MyD88 (sauf pour TLR3). En effet, il a été démontré que, sur des souris déficientes en MyD88, cette dernière est impliquée dans la signalisation de TLR2, 4, 5, 7/8 et 9 [50], [51]. Il est connu que MyD88 interagit directement avec la kinase IRAK4, qualifiée de kinase proximale du TLR, mais aussi avec IRAK1 et IRAK2 qui, ensemble activent TRAF6 permettant le recrutement du complexe IKK pouvant phosphoryler I κ B [52].

Comme expliqué dans les deux premiers paragraphes de cette partie, les deux voies de signalisation finissent par recruter le complexe IKK menant à la phosphorylation d'I κ B. Il a été démontré dans plusieurs cas que ces voies peuvent coopérer pour la dégradation d'I κ B (**Figure 9**) [53]–[55].

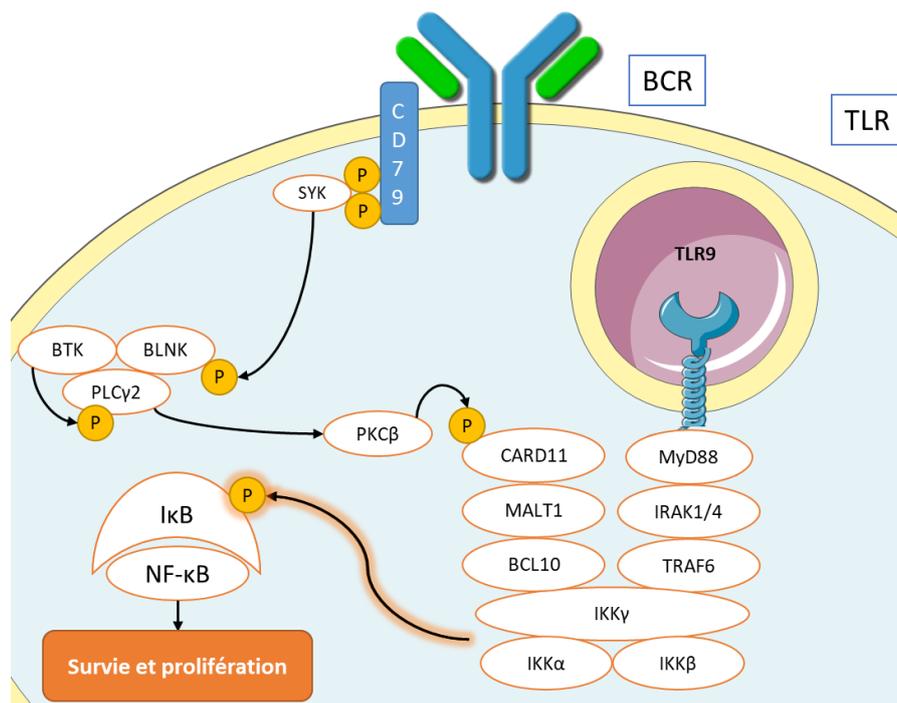


Figure 9 : Schéma représentant les principaux acteurs impliqués dans la signalisation du BCR et du TLR, et comment les deux voies de BCR et du TLR coopèrent pour former un « supercomplexe » permettant la phosphorylation d'IκB et donc sa dégradation pour libérer NF-κB pouvant entrer dans le noyau.

Il y a quelques années, il a été montré que cette coopération était mise en place dans un contexte de cancer, plus spécifiquement dans l'ABC-DLBCL [41]. En effet, ces deux voies coopèrent pour la survie et la prolifération des cellules de lymphome B. Cela est notamment dû au fait que CD79B et MYD88 sont mutés chez les patients avec ABC, respectivement dans 30% et 29% des cas, menant à l'activation constitutive des voies du BCR et du TLR, rassemblant un « supercomplexe » comprenant le sous complexe CARD11-MALT1-BCL10 du côté BCR et MyD88-IRAK1/4-TRAF6 du côté TLR, qui ensemble recrutent le complexe IKK pour l'activation constitutive de la voie NF-κB. Cet ensemble de complexes a été baptisé supercomplexe My-T-BCR. Ce qui est intéressant, c'est qu'il y a un fort pourcentage de co-mutations de MyD88 et CD79B, indiquant un effet synergique des deux voies sur la transduction des signaux de survie et de prolifération [56].

L'acteur PI3K : rôle dans les voies PI3K/AKT et NF-κB indépendamment du supercomplexe My-T-BCR

Il est bien connu maintenant qu'une activation de la voie PI3K/AKT dans l'ABC et le GC DLBCL sont de mauvais pronostic chez les patients [57]. La signalisation PI3K commence par la phosphorylation du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) par PI3K, cette étape pouvant être régulée négativement par la phosphatase PTEN, en déphosphorylant PIP3 en PIP2. Par suite, la kinase sérine/thréonine AKT est recrutée à la membrane par PIP3 pour son activation. AKT peut alors avoir des rôles dans l'activation de réponse de

survie, de prolifération, ou encore de différenciation. Dans le GC-DLBCL, la perte de PTEN arrive dans 50% des cas [58], menant à l'activation constitutive de la voie. Dans les lymphocytes B, la liaison d'un antigène à l'immunoglobuline de surface mène à la phosphorylation de CD19, permettant le recrutement de PI3K, ce qui constitue le début de la cascade de signalisation PI3K/AKT [59]. Une façon alternative de recruter PI3K se fait grâce à la kinase SYK [60] en lien directement avec le BCR (**Figure 10**). Ainsi, une activation constitutive de CD79b dans l'ABC-DLBCL peut mener à un recrutement actif de PI3K, activant la signalisation de PI3K/AKT permettant la survie et la prolifération des cellules de l'ABC [61]. Il a même été montré qu'en plus de ce rôle dans l'activation d'AKT, PI3K pouvait également mener à la phosphorylation d'I κ B, synergisant avec la voie du TLR-BCR pour l'activation de la voie NF- κ B [61] ; on parle alors d'activation de NF- κ B indépendante du BCR. Il a été démontré qu'en co-inhibant l'activation de NF- κ B dépendante (via le supercomplexe My-T-BCR) et indépendante (via la signalisation PI3K/AKT) du BCR, il y a un effet sur la mortalité *in vitro* et *in vivo* plus efficace qu'en inhibant chacune des voies seules [61].

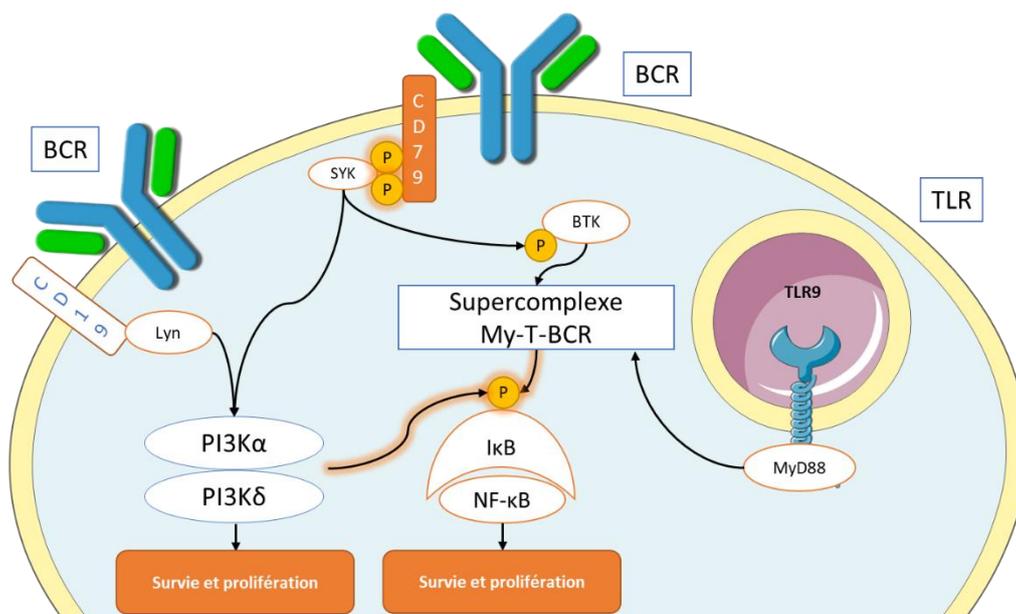


Figure 10 : Schéma représentant la convergence de la signalisation du supercomplexe My-T-BCR et de la voie de signalisation PI3K/AKT vers la phosphorylation d'I κ B, montrant comment ces deux voies majeures de signalisation peuvent synergiser pour avoir une action commune pour la survie et la prolifération des cellules de l'ABC-DLBCL.

L'implication des voies JAK/STAT médiée par les récepteurs aux interleukines :
alternative à la signalisation du BCR pour l'activation et la prolifération

Les types de cancer mobilisant la signalisation impliquant les kinases JAK et les facteurs de transcription STAT sont nombreux. L'activation constitutive de cette voie peut se faire via de nombreux mécanismes, le plus connu étant de suractiver le signal au niveau d'un récepteur aux interleukines [62]. En étudiant les lymphomes B, on se rend compte qu'une mutation dans un des acteurs majeurs de cette voie nommé STAT6 est plutôt commune (36% des cas) dans le PMBL [42].

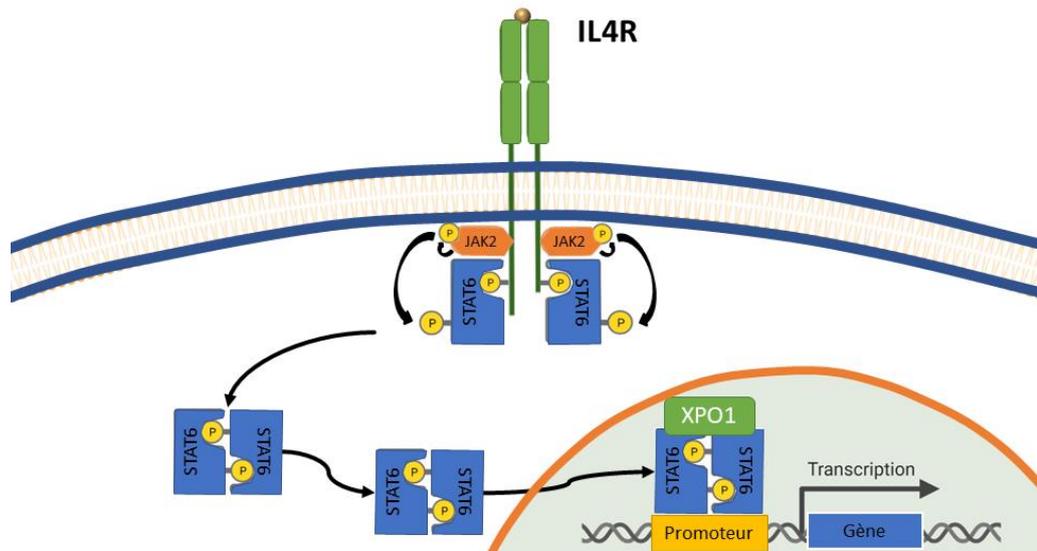


Figure 11 : Schéma montrant la signalisation globale JAK/STAT d'une cellule B thymique, COO du PMBL, avec comme point de départ le récepteur à l'interleukine 4. Les acteurs principaux de la voie, JAK2, STAT6 et XPO1 y sont présentés.

Comme on peut le voir **Figure 11**, le point de départ de la signalisation JAK/STAT dans les lymphocytes B thymiques est communément représentée par la stimulation du récepteur à l'interleukine 4 ou 13. Cela mène à l'autophosphorylation de la partie interne du récepteur, recrutant STAT6 qui pourra alors être phosphorylée par JAK2. Phospho-STAT6 peut alors s'homodimériser et entrer dans le noyau pour y effectuer son rôle de facteur de transcription, permettant le développement et l'activation des cellules B [63]. Dans le PMBL, ayant pour COO les lymphocytes B thymiques, il y a de manière générale une surexpression des effecteurs et des cibles de la signalisation impliquant l'IL-4R et l'IL-13R. En effet, STAT6 y est retrouvé constitutivement phosphorylée et le gène codant pour JAK2 y est amplifié, ce qui n'est pas le cas dans les autres DLBCLs [64]. Il y a donc de manière générale une augmentation des signaux d'activation et de survie des cellules de PMBL. Une mutation dans l'IL-4R (I242N) est observée dans 24,2% des cas, menant à une activation constitutive de la voie [65]. Une autre mutation dans le gène codant pour SOCS1, phosphatase qui régule négativement phospho-JAK2, est observée dans 45% des patients, ainsi que dans plusieurs lignées de PMBL, aidant au maintien de la signalisation JAK2/STAT6 [42], [66]. Également, il a été montré que STAT6 est un cargo, c'est-à-dire une protéine cliente d'une exportine, plus précisément l'exportine 1 (XPO1), et que l'inhibition d'XPO1 retient STAT6 dans le noyau [67].

Généralités sur les HSPs

Les HSPs, pour heat shock proteins, ou encore protéines de choc thermique en français, sont des protéines entrant dans la famille des protéines de stress. Ce sont des chaperons moléculaires qui sont soit constitutivement exprimés à l'état physiologique dans certains tissus, soit inducibles en cas de stress. Un stress cellulaire se définit comme un large éventail de changements moléculaires que

subissent les cellules en réponse aux facteurs de stress environnementaux, physiques et chimiques. D'ailleurs, si elles portent le nom de « choc thermique », c'est parce que leurs effets ont été observés suite au stress provoqué par la chaleur chez la drosophile [68]. Ce sont des protéines chaperonnes hautement conservées, contrôlant de nombreuses fonctions cellulaires afin de sauver la cellule de conditions délétères [69]. Les HSPs peuvent participer au transport de protéines [70], mais aussi participer au repliement fonctionnel des protéines, notamment si cela est causé par des dégâts sur leur structure tridimensionnelle, que l'on nomme protéine « cliente », par un stress [71]. Ce rôle est essentiel, car des protéines mal conformées peuvent s'agréger, causant des dégâts irréversibles à la cellule ; si toutefois le repliement n'est pas possible dû à la complexité des dégâts ou de l'agrégation, les HSPs peuvent diriger leurs clientes ou l'agrégat pour dégradation dans le protéasome [72]. Le facteur de transcription majeur pour l'expression ou la surexpression des HSPs est HSF1, pour heat shock factor 1. Il est restreint par HSP90 dans le cytoplasme et en cas de stress, HSP90 libère HSF1 qui peut alors entrer dans le noyau pour y exercer ses actions de facteur de transcription [73].

Il existe 6 grandes familles d'HSPs, qui portent toutes un nom en rapport avec leur masses moléculaires. En les rangeant dans l'ordre croissant, il y a :

- La famille des petites HSPs, comprenant notamment HSP27 et α B-cristalline
- La famille des chaperonines, comprenant HSP40, qui sont essentiellement des cochaperons pour d'autres HSPs
- La famille d'HSP60, protéines exclusivement mitochondriales
- La famille d'HSP70, une très grande famille d'HSPs faisant partie des HSPs les plus étudiées, comportant 13 membres identifiés à ce jour
- La famille d'HSP90, HSPs les plus abondantes dans les cellules [74]
- La famille des « grandes » HSPs, comprenant deux membres majeurs, HSP110 et GRP170

En fonction du type de tissus, les cellules expriment ou surexpriment certaines HSPs qui possèdent des rôles partagés avec les autres HSPs ou bien des rôles plus spécifiques. Dans un contexte de cancer, les nombreux dégâts à l'ADN infligés lors de la carcinogénèse (mutations, translocations, polyploïdie...), les nombreux changements physiologiques (temps de doublement plus court, prolifération moins contrôlée...) et les nouvelles interactions avec le système immunitaire ou plus généralement avec le microenvironnement tumoral provoquent un stress permanent des cellules cancéreuses [75], [76]. Ainsi, puisque les cellules cancéreuses sont soumises à de grands stress et que les HSPs aident à pallier ces stress, il est cohérent que ces dernières soient hautement exprimées dans ces cellules. En conséquence, les HSPs pouvant conférer une résistance aux chimiothérapies et aux actions du système immunitaire [1], [77].

Généralités sur HSP110

Comme indiqué précédemment, HSP110 fait partie de la famille des grandes HSPs. Pour aller dans le détail, cette famille fait partie de la superfamille d'HSP70, notamment à cause de la ressemblance entre HSP110 et HSP72. Cette famille ne comprend que quatre membres : Apg-1 (ou HSPH3), Apg-2 (ou HSPH2), GRP170 (ou ORP150, ou HSPH4) et HSP110 (ou HSPH1). Les rôles d'Apg-1 et 2 sont peu connus, on sait qu'Apg-1 est exprimée essentiellement dans le testicule et est surexprimée en cas de baisse de température [78]. Apg-2 est plutôt exprimée dans le cerveau [79], mais est également impliquée dans la spermatogenèse [80]. Pour ce qui est de GRP170, il s'agit d'une HSP restreinte dans le réticulum endoplasmique, connue pour être exprimée en cas de privation de glucose [81]. Concernant HSP110, celle-ci possède plusieurs synonymes, notamment HSP105 ou encore HSPH1. Elle est codée par le gène *hsp110* et a d'abord été connue comme facteur d'échange nucléotidique pour HSP72 et HSC70, deux membres de la famille d'HSP70, améliorant efficacement l'action de ces protéines de stress [82], [83]. En tant que co-chaperon, HSP110 peut se lier à des protéines mal conformées ou dénaturées et les apporter à une HSP70 pour la renaturation [83]. Ce n'est que plus tard qu'on s'est rendu compte qu'HSP110 possède des rôles qui lui sont propres, indépendants d'autres HSPs. Il a été montré qu'HSP110, avec l'aide d'HSP40, pouvaient toutes les deux aussi renaturer des protéines et désassembler des amas protéiques [83]. Avec l'implication supplémentaire d'HSP70, la triade HSP110-HSP70-HSP40 peut former un complexe extrêmement efficace pour désassembler les amas et renaturer les protéines [82], [84], [85]. Les grandes HSPs (HSP110 et GRP170 notamment) ont déjà été utilisées pour potentialiser certains vaccins anticancéreux, puisqu'elles sont capables de chaperonner de gros antigènes, favorisant leur présentation aux cellules dendritiques [86].

HSP110 existe sous deux formes, que l'on nomme HSP110 α et HSP110 β . La forme β est écourtée de 44AA (814AA en tout, contre 858 pour la forme α), les formes α et β étant issues de l'épissage alternatif du même ARN messager. La forme α est constitutivement exprimée dans la cellule et possède une localisation plutôt cytoplasmique, même si dans certaines conditions de stress, il peut y avoir import d'HSP110 α dans le noyau [87], [88]. La forme β , quant à elle, est exprimée seulement en cas de choc thermique et est restreinte au noyau [87].

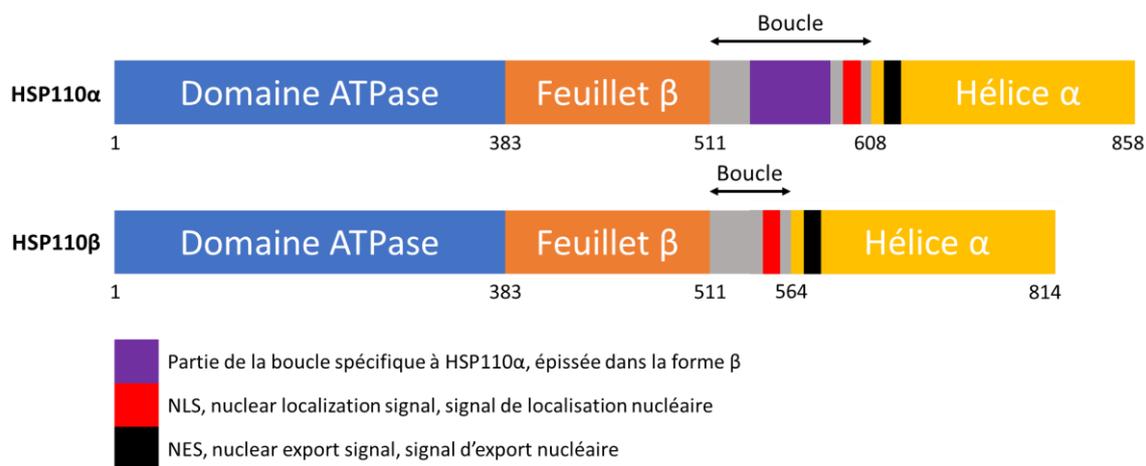


Figure 12 : Schéma représentant la structure d'HSP110 et les différences entre les formes α et β , adapté de Mammalian Heat Shock Protein Hsp105: The Hsp70 Inducer and a Potent Target for Cancer Therapy, DOI : 10.1007/978-3-319-89551-2_18 ; le feuillet β constitue le domaine de liaison aux protéines

En termes de structure (**Figure 12**), HSP110 possède un domaine de liaison à l'ATP, un domaine de liaison aux protéines en feuillet β , un domaine « loop » ou boucle qui contient le NLS et un domaine C-terminal en hélice α qui contient le NES.

HSP110 et cancer

Un nombre croissant de publications démontrent que les cellules tumorales acquièrent une dépendance biologique aux protéines de stress, dont les protéines de choc thermique (HSPs), lors de la transformation maligne [1]. Notamment grâce à ses rôles cytoprotecteurs, HSP110 est trouvée surexprimée dans les cancers colorectaux, mais aussi dans les adénocarcinomes pancréatiques, cancers thyroïdiens, de l'œsophage, du sein, adénocarcinomes de la vessie, dans les lymphomes gastriques et beaucoup d'autres [89]. Dans le cancer colorectal, modèle dans lequel HSP110 a été le plus étudiée, son niveau d'expression est corrélé à un mauvais pronostic chez les patients, notamment avec une progression tumorale plus élevée lorsqu'HSP110 y est surexprimée [90], [91]. Dans ce modèle, HSP110 interagit avec STAT3, une kinase critique dans la transduction de signaux de survie et de prolifération, la stabilisant et apportant une aide à sa phosphorylation par JAK2 [6]. HSP110 peut aussi être excrétée, interagissant avec les TLR4 des monocytes, promouvant la différenciation de ceux-ci en leur phénotype pro-tumoraux M2 [5], ces derniers favorisant l'angiogenèse et participant au contexte cytokinique plutôt immunosuppresseur [92]. Enfin, il est important de mentionner que notre équipe a identifié un variant d'HSP110, une forme tronquée dans le cancer colorectal, nommée HSP110 Δ E9. Dans l'ARN pré-messager de ce variant, l'exon n°9 est manquant, entraînant un ARN messager final plus court et plus instable. Celui-ci agit comme un dominant négatif, inhibant l'action d'HSP110 « normal », menant à un meilleur pronostic chez les patients présentant une instabilité micro-satellitaire (exprimant alors ce variant), notamment en augmentant la sensibilité de ces patients aux chimiothérapies [3]. De manière plus générale, HSP110 est impliquée dans le complexe de

dégradation de la β -caténine, et son niveau d'expression est corrélée avec des quantités de β -caténine nucléaire plus importante ainsi qu'une hyperactivation de la voie de signalisation *Wnt* dans les cancers, menant à la survie et à la prolifération des cellules cancéreuses. La déplétion d'HSP110 permet la phosphorylation de la β -caténine, menant à sa dégradation [93]. De plus, HSP110 semble limiter l'apoptose des cellules cancéreuses, effet visible par des niveaux de caspases 3 et 9 plus faibles [94]–[96]. Des travaux réalisés en 2018 montrent que HSP110 peut aider à la réparation de l'ADN lors de traitement à base de chimiothérapies génotoxiques [97]. On peut parler des autres membres de la famille des grandes HSPs, même si peu de choses sont connues à leurs sujets. Apg-1 semble être impliquée dans la réponse humorale chez les patients atteints de leucémie. Celle-ci est retrouvée normalement exprimée dans les tissus sains, et surexprimée dans les cellules leucémiques. De grandes quantités d'anticorps produits par les patients sont dirigés contre cette HSP, sous-entendant une réponse immunitaire de l'hôte contre les antigènes d'Apg-1 [98]. Apg-2 est observée comme étant surexprimée dans les carcinomes hépatocellulaires [99]. GRP170 quant à elle, peut interférer dans la présentation d'antigènes aux cellules dendritiques et aux macrophages [100], mais aussi dans le processus apoptotique [101] qui sont tous deux des phénomènes pro-tumoraux. Également, GRP170 peut chaperonner le VEGF, qui est un facteur pro-angiogénique impliqué dans le développement des tumeurs [102]. En interférant dans l'expression de GRP170, une diminution de la production de VEGF a pu être observée sur lignée cellulaire de cancer de la prostate, ainsi qu'une diminution de l'angiogenèse sur un modèle de xénogreffe sur membrane chorio-allantoïque d'œufs de poule [103]. Dans le cancer de la vessie, le niveau d'expression de GRP170 est corrélé avec celui de la métalloprotéinase 2, sous-entendant qu'un possible chaperonnage de cette protéine par GRP170 dans ce cancer est possible [104].

HSP110 et DLBCL

C'est en 2011 qu'un lien direct entre les niveaux d'HSP110 et l'agressivité des NHLs a pu être mis en évidence [105]. HSP110 peut se trouver à la surface des cellules de certains NHLs, et le traitement de souris xénogreffées avec des anticorps anti-HSP110 a montré une baisse de la croissance tumorale [105]. Dans les NHLs agressifs, l'extinction de l'expression d'HSP110 par ARN interférent montre des diminutions dans les quantités de BCL6 et c-Myc, deux oncogènes majeurs dans le développement des lymphomes [106]. En ce qui concerne le DLBCL spécifiquement, c'est au sein de mon équipe en 2018 qu'un lien entre HSP110 et le sous-type ABC des lymphomes B diffus à grandes cellules est découvert. En effet, HSP110 est impliquée dans la signalisation NF- κ B, essentielle à la survie des cellules. Cette action passe par la protéine adaptatrice du TLR nommée MyD88 [2]. Par interférence ARN contre HSP110, il a été montré dans plusieurs lignées cellulaires une diminution de la viabilité, la survie, la production de protéines oncogénique (BCL2 et BCL-XL) et une activation de la

signalisation pro-apoptotique passant par le clivage de la caspase 3. De manière intéressante, c'est lorsque les lignées possèdent la mutation L265P de MyD88 qu'elles sont sensibles à l'interférence ARN. Il a été montré qu'il y a un lien fort entre l'agressivité d'un lymphome et l'état mutationnel de MyD88 : MyD88^{L265P} est plus présent dans les ABC-DLBCL que dans les GC-DLBCL, et est associé à un mauvais pronostic vital chez les patients [107] (**Figure 13**). Cela rend alors l'étude d'HSP110 d'autant plus intéressante : ce sont dans les lymphomes les plus agressifs qu'une altération dans l'expression d'HSP110 montre des effets antitumoraux [2]. Il a été aussi constaté des diminutions dans la signalisation NF- κ B, notamment dans la phosphorylation d'I κ B et de p65 qui sont nécessaires dans la transduction du signal de survie. A l'inverse, en surexprimant HSP110 avec vecteurs de surexpression, on trouve les effets inverses de l'interférence ARN sur la signalisation [2].

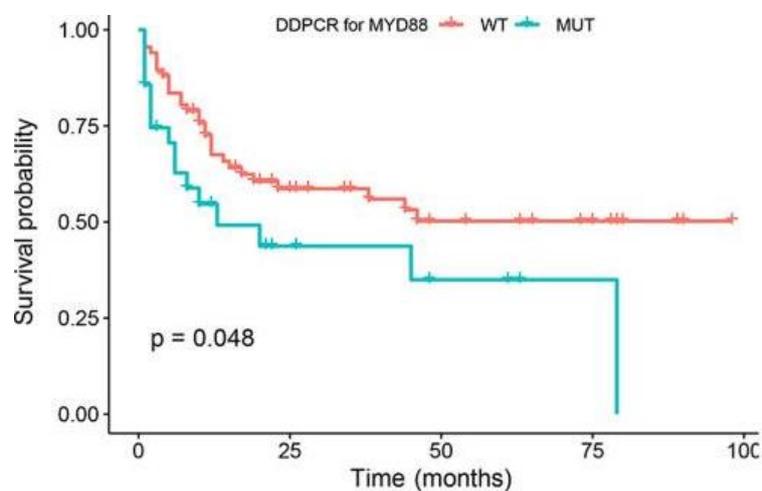


Figure 13 : Courbes de survie montrant la corrélation entre la survie des patients et le statut mutationnel de MyD88 (non muté en rouge, muté en bleu), tirée de « Prognostic value of MYD88 L265P mutation in diffuse large B cell lymphoma via droplet digital PCR » (DOI : 10.3892/mmr.2020.11186). On y constate une plus faible probabilité de survie chez les patients mutés pour MyD88 L265P.

Enfin, notre équipe a pu mettre en évidence une corrélation entre l'expression d'HSP110 et celle de MyD88 sur coupes de biopsies de patients atteints d'ABC-DLBCL, montrant l'importance d'HSP110 dans ce type de lymphome. Dans les cellules, HSP110 est capable de chaperonner MyD88, ce qui maintient le signal de survie et de prolifération dans l'ABC-DLBCL [2].

Thérapies, échecs thérapeutiques et alternatives

Protocoles de chimiothérapies et immunothérapies

Comme décrit un peu plus haut dans la partie « Les lymphomes diffus à grandes cellules B » la chimiothérapie R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone). Initialement, seule la chimiothérapie CHOP était administrée aux patients atteints de DLBCL, mais seuls 40-50% des patients âgés répondaient complètement à la chimiothérapie avec 30% de survie sans rechute et entre 35 et 40% de survie globale [108]. Malgré des tentatives pour ajouter de nouveaux

agents chimiothérapeutiques, et des tentatives d'augmentations des doses, CHOP n'est pas bien tolérées chez les patients plus âgés, comparé aux patients plus jeunes chez qui une augmentation des doses a permis une amélioration du pronostic [109]. Plus tard, un anticorps anti-CD20 a été employé comme agent anticancéreux seul sur des DLBCL a montré une certaine efficacité sur le développement des tumeurs chez les patients, que ce soit sur des lymphomes primaires ou des rechutes [110]–[112]. C'est ainsi qu'un peu plus tard, on a pu voir apparaître la combinaison de cet anticorps anti-CD20, alors nommé Rituximab, avec CHOP [113], [114]. On a pu observer en employant la combinaison R-CHOP des taux de réponses plus élevés qu'avec CHOP seule, ainsi que des niveaux de survie sans progression et survie globale supérieures avec R-CHOP, ainsi qu'une tolérance accrue de R-CHOP par rapport à CHOP chez les patients âgés [108]. Depuis ces avancées, R-CHOP est devenue la chimiothérapie de base des DLBCLs. Cependant, il reste toujours entre 30 et 50% des patients qui ne répondent pas ou répondent mal à R-CHOP. Parmi eux, 20% de ces patients développent des lymphomes réfractaires se caractérisant par une prolifération pendant et après le traitement R-CHOP, et 30% d'entre eux font une rechute après rémission complète [115] (**Figure 14**).

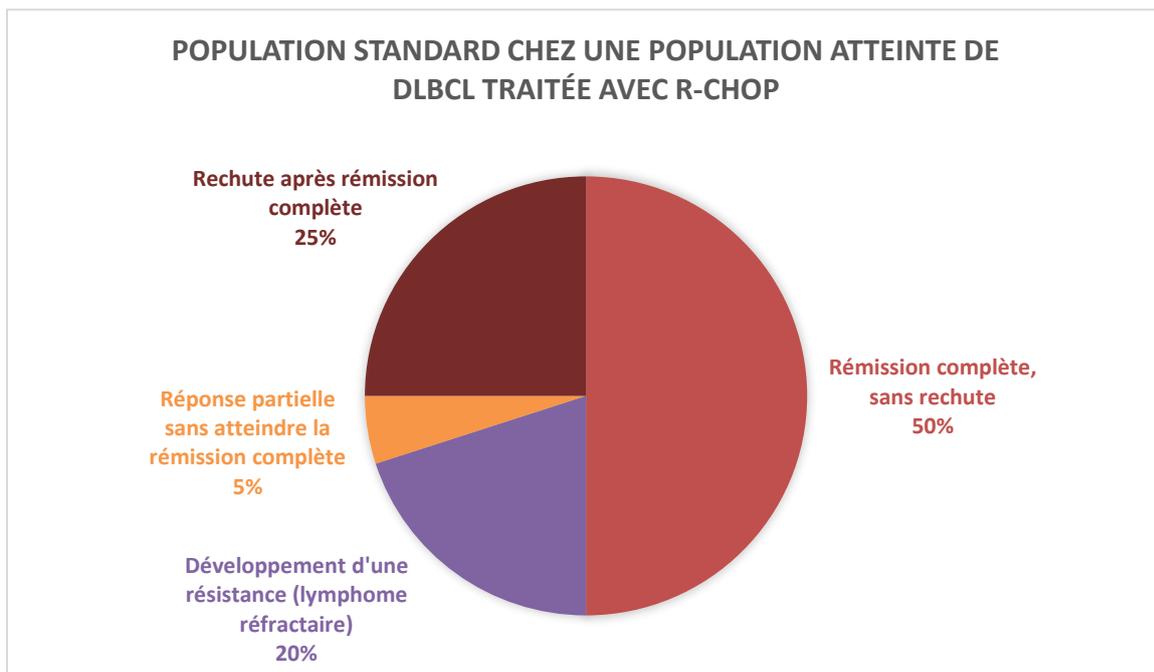


Figure 14 : Schéma représentant les proportions de réponses à la thérapie R-CHOP sur une population standard de patients avec DLBCL, adapté de « Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do? » DOI : 10.1182/asheducation-2016.1.366.

Chez les patients qui ont développé une résistance, qui ont rechuté ou qui ont une réponse partielle sans atteindre la rémission complète (on parle alors de DLBCL R/R, pour « Relapsed or Refractory »), une chimiothérapie alternative est proposée : R-ICE (Rituximab, Ifosphamide, Carboplatine et Etoposide), R-DHAP (Rituximab, Dexaméthasone, Cytarabine et Cisplatine) ou encore R-ESHAP (Rituximab, Etoposide, Méthylprednisolone, Cytarabine et Cisplatine). On parle de traitement de

« sauvetage ». Enfin, en fonction des cas et si c'est possible, une greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques est effectuée pour compléter le traitement [115].

Alternatives : immunothérapies et thérapies ciblées

Afin de toujours améliorer le pronostic vital des patients avec DLBCL R/R, de nouvelles approches thérapeutiques sont envisagées et testées en études cliniques [116] employant notamment l'immunothérapie (**Tableau 6**) ou des approches plus ciblées (**Tableau 7**). En plus des immunothérapies présentées dans le **Tableau 6**, une molécule nommée lenalidomide a été testée dans des essais cliniques en phase II/III [117]. Il s'agit d'un composé chimique ayant des rôles immunomodulateurs, antiangiogéniques et antinéoplasiques ayant un taux de réponse globale de 27,5% et totale de 9,8%.

Type de thérapie	Nom	Cible(s)	Phase clinique	Réponse globale (en %)	Réponse totale (en %)
Anticorps monoclonaux	Tafasitamab + lenalidomide	CD19	II	60	43
Molécules conjuguées anticorps-traitements	Polatuzumab-vedotin + BR	CD79B	II	45	40
	Loncastuximab-tesirine	CD19	II	48,3	24,1
Cellules T-CAR	Axicabtagene ciloleucel	CD19	II	82	54
	Tisagenlecleucel	CD19	II	52	40
	Lisocabtagene maraleucel	CD19	II	73	53
Molécules bispécifiques rapprochant cellules T et tumorales	Blinatumomab	CD19/CD3	II	43	19
	Mosunetuzumab	CD20/CD3	I	37,1	19,4
	Glofitamab	CD20/CD3	I	41,1	28,8
	Epcoritamab	CD20/CD3	I/II	68	45
Inhibiteurs des points de contrôles immunitaires	Nivolumab	PD-1	II	10	3
	Magrolimab	CD47	I	40	33

Tableau 6 : Partie de tableau tirée de « Current options and future perspectives in the treatment of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma » DOI : [10.1177/20406207221103321](https://doi.org/10.1177/20406207221103321) montrant les alternatives thérapeutiques employant l'immunothérapie. La réponse globale se définit comme une réponse au moins partielle au traitement et la réponse totale quant à elle signifie une régression tumorale complète.

Nom	Cible(s)	Phase clinique	Réponse globale (en %)	Réponse totale (en %)
Ibrutinib	BTK	I/II	25	10
Copanlisib	PI3K	II	19,4	7,5
Venetoclax	BCL2	I	18	12
Tazemetostat	EZH2	II	17	3
Selinexor	XPO1	II	28	12

Tableau 7 : Partie de tableau tirée de « Current options and future perspectives in the treatment of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma » DOI : [10.1177/20406207221103321](https://doi.org/10.1177/20406207221103321) montrant les alternatives thérapeutiques employant des thérapies ciblées. La réponse globale se définit comme une réponse au moins partielle au traitement et la réponse totale quant à elle signifie une régression tumorale complète.

D'autres composés faisant partie des thérapies ciblées ont également été testés comme on peut le voir **Tableau 7**. Différents types de molécules représentent des cibles pour de nouveaux

traitements, dans l'optique d'élargir les possibilités thérapeutiques. On retrouve entre autres des kinases majeures dans la transduction des signaux de survie et de prolifération (BTK et PI3K) [118], l'oncogène majeur BCL2 empêchant l'apoptose des cellules [119], l'enzyme de méthylation des histones EZH2 qui réprime l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs [120] et XPO1, une exportine responsable de l'export de nombreux facteurs de transcription pro-tumoraux maintenant les signaux de survie dans les cellules cancéreuses [121].

Nouvelles approches thérapeutiques : les inhibiteurs de HSPs

De plus en plus de nouvelles cibles sont proposées (**Tableau 8**) [122]. Notamment, de nombreux inhibiteurs d'HSP90 tels que l'alvespamycin, la luminespib, le SNX-5422 ou encore le AUY922 ont été employés dans des études cliniques. En effet, HSP90 est capable de chaperonner la kinase SYK dans les lymphomes de Burkitt, et il a été montré dans la CLL que HSP90 peut stabiliser des protéines de la signalisation du BCR telles que BTK, SYK ou encore AKT [123]. L'inhibiteur chimique PUH71 possède un effet sur les cellules de DLBCL dépendante de BCL6 pour leur survie [123]. Nous avons pu voir tout au long de cette introduction que les HSPs sont capables de maintenir et stabiliser de nombreuses protéines importantes dans la survie cellulaire (facteurs de transcription, oncogènes...), l'idée derrière le ciblage des HSPs dans le traitement des lymphomes est d'impacter la stabilisation desdites protéines, et donc de parvenir à un puissant effet antitumoral en ne ciblant qu'une seule protéine. Un essai clinique de phase II a été mené avec l'inhibiteur d'HSP90 AUY922 chez 14 patients avec DLBCL R/R, dont un a pu atteindre une réponse complète [123].

HSP Inhibitors	Target	Mechanism of Action	Phase of Development	Hematological Malignancies
Foldamers 33 and 52	HSP110	Binding to the ATP binding domain	Pre-clinical research	ABC DLBCL
PUH71 (Zelavespib)	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Clinical: Phase I	NHL
			Pre-clinical research (with Ibrutinib)	ALL/ABC DLBCL
			Pre-clinical research (with PI3K/mTOR inhibitors)	BL
SNX-5422 (PF-04929113)	HSP90	Convert to SNX-2112 and binding to the ATP binding domain	Clinical: Phase I (with Ibrutinib)	CLL
SNX-7081	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Pre-clinical research (with Fludarabine)	CLL
NVP-AUY922 (Luminespib)	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Pre-clinical research (with Cytarabine)	AML

Aminoxyrone	HSP90	Binding to C-terminal dimerization domain	Pre-clinical research	CML
17-AAG (Tanespimycin)	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Clinical: Phase II Pre-clinical research (with HDAC inhibitors)	Hodgkin/MCL/ALCL/MM AML/CML
LAM-003 (MPC-3100)	HSP90	Convert to LAM-003A	Clinical: Phase I	AML
Ganetespib	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Clinical: Phase I Pre-clinical research (with Ibrutinib) Pre-clinical research (with cytarabine)	MM MCL CML
17-DMAG (Alvespimycin)	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Clinical: Phase I Pre-clinical research	Lymphoma & leukemia AML CLL
TAS-116 (Pimipespib)	HSP90	Binding to the N-terminal domain of HSP90	Pre-clinical research	ALL
PFT- μ (Pifithrin- μ)	HSP70	Binding to the C-terminal domain of HSP70	Pre-clinical research	ALL/AML
VER-155008	HSP70	Binding to the ATP binding domain	Pre-clinical research	MM
JG-98	HSP70	Allosteric HSP70 inhibitors	Pre-clinical research	MM
DTHIB	HSF1	Binding to the DNA binding domain	Pre-clinical research	AML

AML: acute myeloid leukemia; ALL: acute lymphocytic leukemia; MM: multiple myeloma; CML: chronic myeloid leukemia; MCL: mantle cell lymphoma; ALCL: anaplastic large cell lymphoma; CLL: chronic lymphoblastic leukemia; MPN: myeloproliferative neoplasms; ABC-DLBCL: activated B cell diffuse large B cell lymphoma; NHL: non-Hodgkin lymphoma; BL: Burkitt lymphoma.

Tableau 8 : Tableau adapté de « Heat-Shock Proteins in Leukemia and Lymphoma: Multitargets for Innovative Therapeutic Approaches » DOI : 10.3390/cancers15030984 présentant les inhibiteurs de HSPs et HSF1 qui ont été employés dans des études précliniques et cliniques pour le traitement de leucémies et lymphomes

Un nouvel outil thérapeutique : les inhibiteurs de HSP110

Criblage et découverte

D'autres HSPs sont à l'étude, notamment HSP110 qui est très importante dans le maintien du signal de survie et de prolifération induit par la signalisation constitutive du BCR dans l'ABC-DLBCL [2]. Une des thématiques principales de mon équipe de thèse a été d'identifier et de valider des inhibiteurs spécifiques d'HSP110 [7] avec pour objectif final l'utilisation clinique de ces molécules. La première étape de l'identification de ces molécules inhibitrices a été l'étude cristallographique du domaine de

liaison au nucléotide (NBD), qui se trouve dans le domaine ATPase montré **Figure 12**. En travaillant sur les séquences en acides aminés, il a été constaté que les NBDs de HSP110 et de HSP70 (HSPs de la même superfamille) étaient différents, suggérant qu'il est possible de cibler spécifiquement le NBD de HSP110. Le ciblage du NBD de HSP110 est intéressant, puisque c'est dans cette région que se trouve le domaine de liaison à l'ATP, molécule essentielle à la fonction anti-agrégative de HSP110 [83]. Par la suite, un criblage d'une chimiothèque de 132 molécules inhibitrices (aussi appelées foldamères) d'interactions protéines-protéines connus pour inhiber le même genre de structures moléculaires retrouvées dans le NBD de HSP110 a été mené. Ce criblage consistait à faire des tests *in vitro* de repliement de la luciférase dénaturée par la chaleur. Trois molécules nommées #61, #52 et #33 dont les structures sont présentées **Figure 15** empêchent HSP110 de désagréger et replier la luciférase, bloquant la production de signal luminescent. Puis, des modélisations en 3 dimensions du NBD de HSP110 montrent que les composés #61, #52 et #33 s'insèrent au même endroit de la poche ATP de HSP110, semblant indiquer que c'est en prenant la place de l'ATP que les inhibiteurs empêchent l'activité anti-agrégative de HSP110. Afin de valider le fonctionnement de ces inhibiteurs, des expériences d'interférométrie entre les inhibiteurs et HSP110 totale ainsi que le NBD purifié de HSP110 montrent une interaction entre les inhibiteurs et HSP110, ainsi qu'avec le NBD purifié.

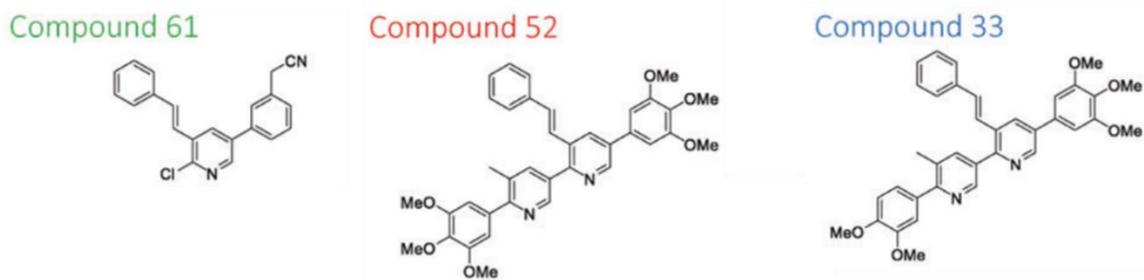


Figure 15 : Schéma adapté de « [Selecting the first chemical molecule inhibitor of HSP110 for colorectal cancer therapy](https://doi.org/10.1038/s41418-019-0343-4) » DOI : 10.1038/s41418-019-0343-4 montrant les structures chimiques des trois inhibiteurs de HSP110

Effets biologiques dans le cancer colorectal et ouverture sur les DLBCLs

Dans le cancer colorectal, HSP110 est connu pour interagir avec STAT3, une molécule critique dans la signalisation de survie de ce type de cancer [6], et l'utilisation d'inhibiteurs #52 et #33 (mais pas #61) de HSP110 limitent cette interaction. Cela mène à une diminution de la viabilité cellulaire de la lignée humaine SW480 colorectale *in vitro* et à une altération dans la croissance tumorale de la lignée de souris CT26 dans des souris Balb/c [7]. Au vu de l'efficacité des inhibiteurs de HSP110 dans le cancer colorectal, ainsi que l'implication de HSP110 dans la signalisation du BCR, le ciblage de HSP110 semble être un candidat intéressant pour les traitements des DLBCLs.

Vésicules extracellulaires (VECs) et cancer

Les grosses et petites VECs

Produites par les cellules, les VECs portent et transportent un large panel de molécules, telles que des protéines, des acides nucléiques mais aussi des lipides, qui peuvent impacter la biologie des cellules cibles [124]. Pour ce faire, les VECs fusionnent avec la membrane plasmique des cellules pour délivrer leur contenu [125]. Il existe une grande variété de VECs, qui se regroupent en famille en fonction de leur taille, de leurs biomarqueurs et de leurs actions [126]. Il est communément admis qu'il y a deux grandes familles de VECs. Certains les séparent en fonction de la force de centrifugation nécessaire pour les sédimenter [127]. En effet, les grosses VECs (GVECs) peuvent se sédimenter lorsqu'elles sont centrifugées à $\sim 20000G$, et les petites VECs qui se séimentent lorsqu'elles sont centrifugées à $\sim 100000G$. D'autres les différencient en fonction de leur taille. On considère que si une VEC est plus petite que 200nm, alors c'est une PVEC [128]. Formant une très grande famille, il y a 3 types de VECs qui sont particulièrement étudiés dans la recherche en biologie.

Les corps apoptotiques

Les corps apoptotiques font entre 50nm et 5 μ m de diamètre. Même si cette gamme de taille semble large, les plus petits corps apoptotiques sont beaucoup plus rares. Ils sont habituellement récupérés par centrifugation à basse vitesse (entre 2000 et 10000G), ce qui en fait des GVECs. Elles sont originaires de cellules mourantes [128]. Les plus petits contiennent de grandes quantités d'ARN, et les plus grandes peuvent contenir des lipides, protéines, ARN, ADN voire même des organites partiels ou entiers [129]. Une fois dans le milieu extracellulaire, les corps apoptotiques sont habituellement phagocytés par des cellules professionnelles, notamment par des macrophages [130].

Les microvésicules

Les microvésicules, quant à elles, mesurent entre 100 et 1000nm de diamètre. Elles sont centrifugeables entre 10000 et 20000G, ce qui en fait des GVECs [128]. Elles ont pour origine la membrane plasmique des cellules [128]. Le contenu des microvésicules est destiné à être libéré dans le milieu extracellulaire, impactant les cellules aux alentours [131]. Contrairement aux corps apoptotiques, ces VECs ne contiennent pas d'organites ni de morceaux de noyau [131].

Les exosomes

Les exosomes mesurent entre 30 et 150nm, même si la majorité d'entre eux font plutôt entre 50 et 80nm [131]. Il faut une force supérieure à 100000G pour les récupérer par ultracentrifugation, ce qui en fait des PVECs [128]. Ils sont formés dans la cellule à partir du corps multivésiculaire qui peut fusionner à la membrane plasmique et libérer les exosomes dans le milieu extracellulaire [131]. Cette origine lui confère des marqueurs spécifiques, notamment les protéines Alix, TSG101, HSC70 et

HSP90 β [132]. D'autres protéines, telles que des tetraspanines CD63, CD9 et CD81 sont présentes à la membrane de ces PVECs [132]. Ils sont un moyen de communication pour les cellules, et peuvent aider à la prolifération tumorale [133].

Rôles dans le cancer et microenvironnement tumoral

Parmi ces vésicules, ce sont essentiellement les microvésicules et les exosomes qui sont étudiées. En effet, ce sont les deux seules VECs décrites jusqu'ici qui sont produites par des cellules vivantes. Il est connu que les microvésicules peuvent remodeler le microenvironnement tumoral, et d'aider à la prolifération des cellules cancéreuses, notamment en permettant les cellules tumorales des échanges en matériel pro-tumorigéniques [134]. Il a été récemment démontré que les microvésicules d'origine tumorale étaient associées à des résistances à certaines molécules employées en thérapie ciblée [135], notamment la Daunorubicine (un antinéoplasique) utilisée dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique [136]. Pour ce qui est des exosomes, de nombreux travaux montrent que ces vésicules peuvent permettre les échanges entre cellules normales et tumorales, et permettent de manière générale des résistances aux chimiothérapies [137], ainsi qu'à certaines thérapies ciblées [136]. Notamment, il a été montré que les exosomes pouvaient insensibiliser les cellules de DLBCLs au Rituximab (anticorps anti-CD20) dont nous avons parlé dans la partie précédente [138]. Il a été démontré que les exosomes produits par les cellules de DLBCLs portent le marqueur CD20, qui est alors disponible pour être reconnu par le Rituximab, qui est alors moins disponible pour reconnaître le CD20 à la membrane des cellules tumorales. Ainsi, les protéines du complément éliminent moins efficacement les cellules de DLBCL.

Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Les lignées cellulaires d'ABC-DLBCL U2932, OCI-Ly3, OCI-Ly10 et SUD-HL2 ont été achetées auprès de l'ATCC, tandis que les lignées HBL1 et TMD8 ont été fournies par le professeur Daniel Krappmann (The Helmholtz Zentrum Munich, Allemagne). Les OCI-Ly10 ont été cultivées dans de l'IMDM (Dutsher) avec 10% de sérum humain (Sigma-Aldrich). Les autres ont été cultivées dans du RPMI1640 (Dutsher) avec du sérum de veau fœtal (Dutsher) à 10% (U2932, TMD8 et SUD-HL2) ou 20% (HBL1 et OCI-Ly3). Les lignées OCI-LY3 et OCI-LY10 ont eu 55µM de β-mercaptoéthanol en supplément.

Les lignées cellulaires de PMBL K1106P et MedB1 ont été cultivées dans de l'IMDM avec 20% SVF. La lignée U2940 a, quant à elle, été cultivée dans du RPMI 10% SVF et 1% d'acides aminés non-essentiels (Fischer, 11350912). Les 3 lignées ont été supplémentées avec 55µM de β-mercaptoéthanol.

Pour ce qui est des lignées non-ABC et non-PMBL :

- La lignée cellulaire de lymphome de Burkitt BJAB a été cultivée dans du RPMI1640 avec 20% de SVF.
- Les lignées de GC-DLBCL B593 et SUD-HL4 ont été cultivées dans du RPMI avec respectivement 20% et 10% de SVF.
- Les lignées cellulaires HEK293 et HEK293S6 ont été cultivées dans du DMEM (Dutsher) avec 10% de SVF.

En outre, un mélange de Pénicilline-Streptomycine et d'Amphotéricine B (Pan Biotech) a été ajouté dans toutes les lignées cellulaires ci-dessus à une concentration finale de 1%, ainsi que de la Plasmocin prophylactique (InVivoGen) à une concentration finale de 2‰.

Transfection

Electroporation

Les lignées cellulaires d'ABC-DLBCL ont été ensemencées un jour avant transfection à $0,5 \times 10^6$ cellules par mL dans 1,5mL dans une plaque à 12 puits. La transfection est effectuée avec le dispositif AMAXA Nucleofector 2b (Lonza) en utilisant le kit Nucleofector T (HBL1, OCI-Ly3, OCI-Ly10) ou V (U2932, SU-DHL2, TMD8). 1 nmol de siRNA de contrôle (MISSION® siRNA Universal Negative Control #1, Sigma-Aldrich) ou 1 nmol de siRNA ciblant hsp1 (Silencer™ Select Pre-Designed siRNAs, Life technologies) ont été utilisés. Des programmes AMAXA spécifiques ont été appliqués (U-015 pour U2932 ; P-005 pour SU-DHL2 et TMD8 ; G-016 pour HBL1, OCI-Ly3 et OCI-Ly10).

Lipofection

Pour les transfections sur HEK293 et HEK293S6, 3×10^6 cellules ont étéensemencées dans 22mL de milieu. Le jour suivant, les transfections ont été réalisées en utilisant FuGene HD (Promega) et 1 μ g de chaque plasmide. Le HSP110-GFP était un plasmide conçu au sein de l'équipe, et les plasmides XPO1^{WT}-mCherry et XPO1^{E571K}-mCherry nous ont été donnés par Brigitte SOLA.

Immunoempreinte, ou Western Blot

Préparation des échantillons

Les cellules ont été collectées (300G, 5 minutes, 4°C) et lavées dans du PBS 1X (Dutscher), puis lysées à l'aide d'un tampon de lyse composé de Cell Lysis Buffer 10X (Cell Signaling), de cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete 25X (ROCHE), de cocktails d'inhibiteurs de phosphatases (2 et 3) 100X (Sigma) et d'une solution de fluorure de phénylméthanésulfonyle 100X (PMSF) (Sigma), le tout dilué jusqu'à une solution de travail finale concentrée 1X dans de l'eau distillée. La lyse dure 30 minutes, en vortexant les échantillons toutes les 10 minutes. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 20000G, 15 minutes à 4°C. Les lysats sont recueillis dans de nouveaux tubes, dosés avec le kit BioRad DC puis dilués avec un tampon Laemmli 5X jusqu'à une concentration finale 1X (50mM Tris, 2% SDS, 100mM DTT, 0,01% bleu de bromophénol et 10% glycérol, pH = 6,8).

Dépôt, migration et transfert

Les échantillons sont ensuite déposés sur des gels Precast TGX (BioRad) et migrent à 200V dans le tampon de migration Towbin (25mM Tris, 192mM Glycine, 0,1% SDS, pH = 8,3) pendant environ 45 minutes. Ensuite, les protéines sont soit généralement transférées à l'aide du TransBlot Turbo (BioRad) pendant 7 minutes à 1,25A (1 gel) ou 2,5A (2 gels) sur membrane PVDF LF 0,45 μ m (BioRad), soit transférées en méthode « liquide » avec Mini-TransBlot dans du tampon Dunn-Carbonate à 35V pendant 2 heures pour les blots montrant des révélations de phospho-SYK.

Blocage, incubations et anticorps primaires

Les membranes sont ensuite bloquées 5 minutes avec du EveryBlot Blocking Buffer (BioRad) et les incubations avec anticorps primaires durent une nuit à 4° dans du TBS-Tween20 0,1% avec 3% de BSA (Sequens). Les anticorps utilisés pour les western blots sont PARP (9542), BCL-XL (2764), p65 (8242), MyD88 (4283), pPLC γ 2 (3874), PLC γ 2 (3872), BTK (8547), pAKT (4060), AKT (9272), XPO1 (46249), HSP60 (12165), Lamin A (86846), TBP (44059), STAT6 (5397), TOMM20 (42406) de Cell Signaling Technologies (Danvers, USA) ; pI κ B (ab133462), I κ B (ab32518), pp65 (ab194726), pBTK (ab68217), pSYK (ab192587), SYK (ab40781), Na⁺/K⁺-ATPase (ab76020 et ab7671), mCherry (ab213511) et GFP (ab1218 et ab290) de Abcam (Paris, France) ; BCL-2 (sc-509), GAPDH (sc-47724), HSP110 (sc-

74550), TSG101 (sc7964), CD9 (sc13118) et CD81 (166028) de Santa Cruz biotechnologies (Dallas, TX, USA) ; Gp96 (ADI-SPA-850), HSP70 (ADI-SPA-810) de EnzoLife Sciences (Villeurbanne, France) ; Alix (NB100-65678) et CD63 (NBP2-42225) de Novus Bio (Nantes, France) ; Flotilin-1 (610820) de BD Biosciences (Pont de Claix, France) ; Vinculine (V9131) et β -Actin-Peroxydase (A3854) de SIGMA.

Anticorps secondaires et révélations

Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois 10 minutes dans du TBS-Tween 0,1%, puis incubées avec des anticorps secondaires couplés à la HRP. Pour les western blots « classiques », ces anticorps secondaires sont dirigés contre des anticorps de souris (7076) ou de lapin (7074) (Cell Signaling Technologies), et l'incubation se fait dans du TBS-Tween20 0,1% avec 3% de BSA. Pour les western blots d'immunoprécipitation, les anticorps secondaires sont des anticorps VeriBlot (ab131366) (Abcam) et l'incubation se fait dans du TBS-Tween20 0,1% avec 5% de lait, 1% de caséine et 1% de BSA. Indépendamment du type de western blot, l'incubation avec les anticorps secondaires dure une heure et se fait à température ambiante. Après ce temps, les membranes sont lavées 3 fois 10 minutes dans du TBS-Tween 0,1%, puis trempées dans du TBS 1X avant révélation. Les révélations se font par chimioluminescence en utilisant du Clarity Western ECL (BioRad) ou SuperSignal West Femto (Fisher), et les images sont acquises avec un Chemidoc MP Imaging System.

Co-immunoprécipitation

Les cellules ont été collectées (300G, 5 minutes, 4°C) et lavées 3 fois dans du PBS 1X (Dutscher), puis lysées à l'aide d'un tampon de lyse composé de Cell Lysis Buffer 10X (Cell Signaling), de cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete 25X (ROCHE) et du cocktail d'inhibiteurs de phosphatases 2 (Sigma), tous trois dilués jusqu'à une solution finale 1X dans de l'eau distillée. La lyse dure 30 minutes sur agitateur rotatif à 4°C. Les échantillons sont centrifugés à 10000G pendant 10 minutes à 4°C et les lysats sont mis dans de nouveaux tubes. Les échantillons sont ensuite dosés de la même manière que pour les western blots classiques, et 5 μ g des échantillons sont conservés pour réaliser les inputs. 700 μ g de protéines des échantillons sont utilisés, et les anticorps de capture sont directement introduits dans les échantillons (1 μ g si monoclonal et 2 μ g si polyclonal). Les échantillons sont incubés pendant une nuit sur agitateur rotatif à 4°C et les inputs sont dénaturés de la même façon que pour des échantillons de western blot classiques. Les anticorps utilisés comme anticorps de capture pour les coIPs sont HSP110 (ab108625), SYK (ab155187) et mCherry (ab213511) d'Abcam ; MyD88 (4283), STAT6 (5397) et Normal Rabbit IgG (2729) de CellSignaling. Le lendemain, les anticorps sont capturés en ajoutant des microbilles de protéine A μ MACS™ (50 μ L si monoclonal, 100 μ L si polyclonal) directement dans les échantillons, et ces billes sont retenues en utilisant des colonnes et un aimant séparateur μ MACS. Les colonnes sont lavées 4 fois avec le tampon de lyse et les protéines sont dénaturées et éluées en

utilisant un Laemmli 1X plus concentré en agent dénaturant, chauffé à 95°C (50mM Tris, 4% SDS, 200mM DTT, 0,01% bleu de bromophénol et 10% glycérol, pH = 6,8) pendant 5 minutes. Les échantillons sont prêts à être chargés dans des gels et sont traités de la même manière que pour les western blots.

Immunohistochimie

Les échantillons de tumeur et de colon ont été fixés dans de la formaline 10% neutralisée et tamponnée fournie par la plateforme d'immunohistochimie CelliMap (Dijon, France). Les échantillons sont inclus par la plateforme en blocs de paraffine et les différents marquages ont été réalisés sur des coupes provenant de ces blocs. Les antigènes ont été démasqués avec du tampon citrate pH = 6 (ab93678, Abcam), puis les tissus ont subi un traitement au peroxyde d'hydrogène (3% de H₂O₂ dans de l'eau distillée). Ensuite, ils sont bloqués avec du TBS-Tween20 0,1% avec 3% de BSA et les anticorps primaires ont été laissés pendant une nuit à 4°C dans du tampon de blocage. Les anticorps utilisés pour l'immunohistochimie sont HSP110 (ab109624) et MyD88 (ab133739) d'Abcam ; pI κ B (GTX50209) et pBTK (GTX130377) de GeneTex. Le jour suivant, les lames sont lavées 3 fois pendant 5 minutes avec du TBS-Tween20 0,1% et incubées 30 minutes avec des sondes HRP dirigées contre la souris (8125) ou le lapin (8114) (SignalStain Boost, CellSignaling). Après de nouveaux lavages (3x5 minutes), le développement du marquage se fait à l'aide du chromogène NovaRED™ (VectorLaboratories) pendant 5 minutes, puis est stoppé en plongeant les lames dans un grand bain d'eau autoclavée.

Expériences de Ligature de Proximité Duolink® (PLA)

Les cellules sont collectées, lavées dans du PBS1X, fixées dans de la paraformaldéhyde (PFA) 4% diluée à partir d'un stock à 16 % sans méthanol (Pierce™) pendant 15 minutes sur la glace et perméabilisées à l'aide de méthanol 100 % (stocké à -20°C) pendant 10 minutes sur glace. Les cellules sont plaquées sur des lames de Ghäasel à l'aide d'un Cytospin (Fischer) pendant 5 minutes à 800RPM avec le paramètre d'accélération réglé sur faible. Les cellules fixées et perméabilisées sont bloquées à l'aide de TBS-Tween20 0,1% avec 3% de BSA, puis les lames sont incubées avec des anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage sur la nuit à 4°C. Les anticorps utilisés pour les tests de ligature de proximité sur cellules sont HSP110 (sc74550) de Santa Cruz ; HSP70 (ADI-SPA-812) de Enzo Life ; SYK (ab155187) de Abcam ; XPO1 (46249) de CellSignalling ; BRCA1 (PLA0185) de Sigma. Le lendemain, les expériences Duolink® ont été réalisées en suivant les consignes du fabricant (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) et montées avec le milieu ProLong Gold avec DAPI (Fisher). Les images de microscopie ont été prises sur un Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) en utilisant une caméra CCD AxioCam MRm (Carl Zeiss GmbH). Le plugin 'Spot detector' du logiciel ICY a été utilisé pour compter le nombre de point par cellule.

Immuno(cyto)fluorescence (classiques)

De la même façon que pour les PLAs sur cellules, ces dernières sont collectées, lavées dans du PBS1X, fixées dans de la paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 minutes sur la glace et perméabilisées à l'aide de méthanol 100 % pendant 10 minutes sur glace. Les cellules sont plaquées sur des lames de Ghäasel à l'aide d'un Cytospin (Fischer) pendant 5 minutes à 800RPM avec le paramètre d'accélération réglé sur faible. Les cellules fixées et perméabilisées sont bloquées à l'aide de TBS-Tween20 0,1% avec 3% de BSA, puis les lames sont incubées avec des anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage sur la nuit à 4°C. L'anticorps anti-HSP110 utilisé pour les immunofluorescences est sc74550 (Santa Cruz). Le lendemain, les lames sont lavées 3 fois en bain et incubées avec un anticorps secondaire de lapin anti-anticorps primaires de souris (InVitroGen, A11059) couplé avec Alexa Fluor 488 pendant 1 heure. Les lames sont de nouveau lavées 3 fois, marquées avec DAPI et montées en milieu de montage ProLong Gold Antifade (Fisher, 15260719) et couvertes avec lamelles.

Immuno(histo)fluorescence (tests de Ligature de Proximité Duolink®)

Les tissus sont traités de la même manière que pour l'immunohistochimie. Les antigènes sont démasqués avec un tampon universel de démasquage (ab208572, Abcam). Ensuite, les lames sont bloquées à l'aide de TBS-Tween20 0,1% avec 3% de BSA et les anticorps primaires ont été laissés pendant une nuit à 4°C dans le tampon de blocage. Les anticorps utilisés pour les tests de ligature de proximité sur les tissus sont HSP110 (ab109624) d'Abcam ; SYK (80460) de CellSignaling. Le lendemain, les expériences Duolink® ont été réalisées selon le protocole du fabricant. Les tissus sont ensuite incubés avec du Noir Soudan B (Sigma) pour éteindre l'autofluorescence de la lipofuscine, et du DAPI (Sigma, D9542) pour la coloration des noyaux. Les lames sont enfin montées avec du Fluoromount-G (InVitroGen). Les photos sont prises de la même manière que pour les PLA sur cellules.

Tests de prolifération cellulaire (XTT)

Les cellules ont étéensemencées à une densité de $0,25 \times 10^6$ dans des plaques 96 puits dans 150µL de milieu avec traitements dans chaque puits pendant 48 heures. Ensuite, 50µL sont prélevés et ajoutés dans 100µL de milieu frais avec traitements et incubés 48 heures de plus. La première plaque est utilisée pour le pointage de 48 heures, et la seconde pour le pointage de 96 heures. Le composé XTT est laissé 4 heures et la densité optique est mesurée à 475nm avec soustraction de la densité optique mesurée à 660nm.

Cytométrie en flux – marquages Annexine V et 7AAD

Les cellules sontensemencées de la même manière que pour les expériences XTT. Seule la plaque de 96 heures est utilisée pour le marquage par cytométrie de flux. Les cellules sont lavées dans du PBS à 4°C et incubées 15 minutes à 4°C avec l'Annexin-V-FITC. Enfin, le 7AAD est ajouté quelques minutes avant l'acquisition avec un BD LSR Fortessa et analysé avec FlowJo V10.

Test de viabilité cellulaire Cell Titer Glo 2.0 (CTG)

Les cellules ont étéensemencées à une densité de $0,25 \times 10^6$ dans des plaques noires stériles opaques de 96 puits, dans 150µL de milieu avec traitements dans chaque puits pendant 72 heures. Ensuite, les tests CTG ont été réalisés en suivant le protocole du fabricant.

Co-traitement *in vivo* dans des souris NSG avec inhibiteur d'HSP110 et copanlisib

Des souris NSG ont reçu une injection sous-cutanée de 15×10^6 cellules de la lignée TMD8 dans 200 µL de milieu de culture sans SVF à J0. Les souris ont été randomisées en fonction du volume de la tumeur à J3 et traitées par voie intrapéritonéale avec l'inhibiteur de HSP110 #52 (iHSP110 52) à 10 mg/kg/inj (Q2Dx8) ou avec le véhicule à la même fréquence, et/ou traitées par voie intraveineuse avec du copanlisib à 5 mg/kg. La taille des tumeurs des animaux a été mesurée tous les 2 jours (5-6 animaux/groupe).

Tests de phosphorylation *in vitro*

Pour commencer, des mélanges de tampon kinase 10X (9802, CellSignalling Technology) avec ou sans 300µM d'inhibiteurs d'HSP110 ont été préparés. Ensuite, 200ng de protéine SYK active recombinante (13-314, MERCK) ont été ajoutés aux mélanges avec ou sans 10ng de HSP110 recombinante (TP307102, OriGene), avec ou sans la présence de 100µM d'ATP (9804, CellSignalling Technology). Les mix ont été incubés 10 minutes à 30°C dans 40µL de volume final de réaction. Pour arrêter la réaction, 10µL de tampon Laemmli 5X ont été ajoutés dans chaque échantillon, qui ont ensuite été chauffés 5 minutes à 95°C pour dénaturation et dépôt en western blot.

Isolements cytoplasmes-noyaux

Les isolements cyto-noyaux ont été réalisés à partir de 1 million de cellules pour chaque condition, en suivant les instructions du protocole du kit d'extraction cytoplasmique et nucléaire NE-PER™ (Thermo, 78835). Les réactifs du kit ont été supplémentés en cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete 25X (ROCHE).

Isolements cytoplasmes-membranes

Les isolements cyto-membranes ont été réalisés à partir d'au moins 5 millions de cellules pour chaque condition, en suivant les instructions du protocole du kit Mem-PER™ Plus pour l'extraction de protéines membranaires (Thermo, 89842). Les réactifs du kit ont été supplémentés en cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete 25X (ROCHE).

Isolements des petites vésicules extracellulaires (PVECs)

Les isolements de PVECs se réalisent par la méthode de centrifugations successives avec une force croissante pour séparer les cellules, débris de cellules et les grosses vésicules extracellulaires présentes dans le liquide d'intérêt.

Au préalable : déplétion des VECs présentes dans le sérum de veau foetal

Du SVF (Dutsher) a été ultracentrifugé à 100000G pendant 20 heures à 4°C sans freinage pour permettre l'ultracentrifugation des vésicules extracellulaires. Après filtration à 0,22µm, le SVF peut être utilisé pour la culture cellulaire.

A partir de milieu de culture

Les cellules ont étéensemencées à $0,3 \times 10^6$ cellules par mL dans 80mL de milieu avec SVF déplété en VECs. Au bout de 72 heures de prolifération, les cellules sont comptées afin de prélever 40 millions de cellules. C'est le volume de milieu qui contient les 40 millions de cellules qui est utilisé pour l'isolement d'exosomes, afin de normaliser la production de VECs par rapport à un nombre fixe de cellules. Les cellules ont été centrifugées à 400G à 4°C pendant 5 minutes. Puis, les surnageants ont été centrifugés à 2400G à 4°C pendant 15 minutes. Les surnageants ont de nouveau été centrifugés à 10000G pendant 40 minutes à 4°C. Ensuite, les surnageants ont été ultracentrifugés à 120000G à 4°C pendant 1h30. Les PEVCs sont ensuite resuspendues et lysées pour western blot.

A partir de plasma de patients

Environ 5mL de plasma ont été centrifugés à 2400G pendant 15 minutes à 4°C. Afin de normaliser les volumes, 4mL de surnageant ont été prélevés et 8mL de PBS1X filtré à 0,1µm ont été ajoutés. Les tubes sont ensuite centrifugés à 17000G pendant 10 minutes à 4°C, et 11,5mL de surnageants sont gardés pour normaliser les volumes. Ces surnageants sont ultracentrifugés pendant 1h à 140000G à 4°C. Les PEVCs sont ensuite resuspendues et lysées pour western blot.

Objectifs

Cette thèse porte sur l'étude et l'inhibition d'HSP110 dans les lymphomes B diffus à grandes cellules. Elle a été réalisée sous la supervision du Docteur Carmen GARRIDO et du Professeur Gaëtan JEGO au sein de l'équipe HSPathies, chez qui l'étude des HSPs est la thématique centrale.

Les résultats obtenus pendant cette thèse sont divisés en trois grandes parties :

- La première partie dans laquelle les inhibiteurs d'HSP110 ont été employés seuls, afin d'observer les effets biologiques et d'expliquer le mécanisme biochimique derrière l'inhibition de cette HSP, mais aussi en combinaison avec une molécule employée en thérapie ciblée dans le traitement de certains lymphomes, nommée copanlisib, afin d'observer les effets biologiques d'une co-inhibition des voies majeures de survie et de prolifération du modèle ABC-DLBCL étudié.
- Une deuxième partie dans laquelle l'implication d'HSP110 dans la voie de signalisation majeure JAK2/STAT6/XPO1 du PMBL a été étudiée
- Une troisième et dernière partie dans laquelle HSP110 est évaluée comme un potentiel biomarqueur chez les patients atteints de DLBCL

Résultats

Partie 1 : L'inhibition d'HSP110 dans le sous-type ABC des lymphomes B diffus à grandes cellules et co-inhibition des voies de signalisation impliquant les immunoglobulines de surface

Impact de l'inhibition d'HSP110 sur la viabilité et la survie des cellules d'ABC-DLBCL

Lorsqu'on vient à imaginer les premières expériences à réaliser avec un nouvel inhibiteur en cancérologie, une des premières choses qui vient en tête est d'observer si notre molécule impacte le comportement des cellules, notamment leur temps de doublement mais aussi leur survie. C'est grâce aux données connues de l'importance d'HSP110 dans les DLBCLs, notamment via son implication dans le chaperonnage de MyD88 dans l'ABC, que nous avons naturellement commencé notre étude en observant les paramètres de survie et de viabilité des cellules d'ABC.

Effets sur la prolifération et la survie des cellules de lignées d'ABC-DLBCL

C'est d'abord *in vitro* que les premières expériences ont été réalisées. Des cellules de lignées d'ABC-DLBCL ont étéensemencées et traitées avec les inhibiteurs d'HSP110 directement introduits dans leurs milieux.

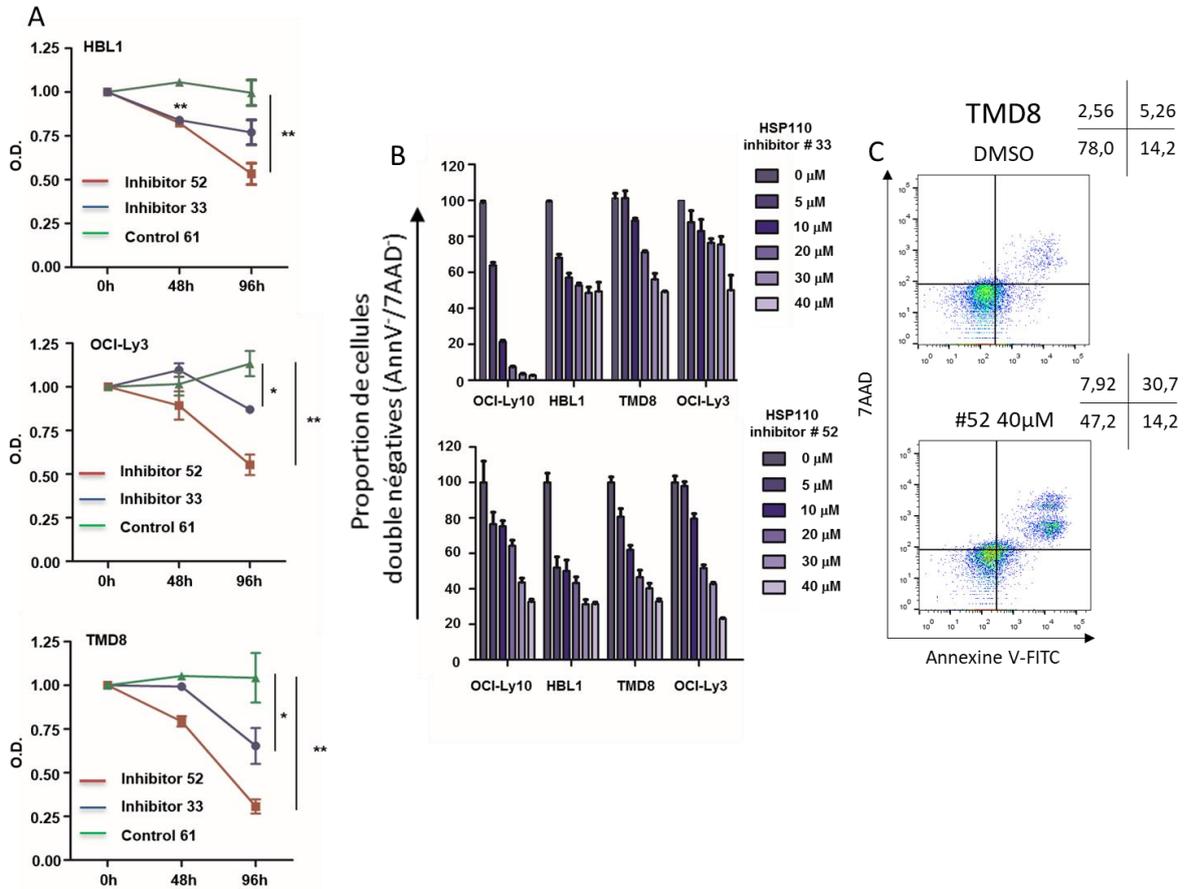


Figure 16 : Etude de l'impact de l'inhibition d'HSP110 sur la viabilité et la survie des cellules d'ABC-DLBCL. A : Mesure de densités optiques, représentant la viabilité de 3 lignées d'ABC-DLBCL (HBL1, OCI-LY3 et TMD8) traitées en plaque 96 puits pendant 48 et 96 heures avec les inhibiteurs 52 et 33 (10μM) avec un contrôle le composé 61, avec une mesure de la viabilité à J0 par kit XTT. **B :** Mesure de la survie cellulaire par cytométrie en flux grâce à un co-marquage Annexine V FITC et 7AAD de 4 lignées (HBL1, OCI-LY3, TMD8 et OCI-LY10) traitées pendant 96 heures. **En C :** Illustration de la partie B sur lignée TMD8 traitées DMSO et avec inhibiteur #52 à 40μM sur 96 heures. La croix représente le pourcentage de cellules dans chaque quadrant.

La **Figure 16A** montre la viabilité de lignées cellulaires de lymphome traitées avec nos deux inhibiteurs d'HSP110, les composés #52 et #33 avec le composé contrôle #61 à la concentration de 10μM. Cette dose a été déterminée par mon équipe comme étant optimale pour des traitements *in vitro* de manière préliminaire. Les sels d'XTT sont métabolisés par les mitochondries des cellules en vie, ce qui reflète leur viabilité et l'état de leur métabolisme. On constate ici qu'avec 48 heures de traitement, la lignée HBL1 est impactée dans sa viabilité avec les deux inhibiteurs, TMD8 n'est sensible qu'avec l'inhibiteur #52 et OCI-LY3 n'est sensible à aucun des deux. En revanche, dès 96 heures, les lignées sont toutes impactées, les mesures de densités optiques étant toutes largement plus faible comparées au contrôle #61, avec un impact plus fort lorsque l'inhibiteur #52 est employé. Nous constatons donc un effet sur le métabolisme des cellules, et nous avons appris deux choses : il faut plus de 48 heures de traitement pour observer un effet sur la viabilité des lignées de lymphome, mais aussi que l'inhibiteur #52 semble plus efficace à concentration égale (10μM) que l'inhibiteur #33. Cependant, beaucoup de notions se cachent derrière le mot viabilité. En effet, ce terme désigne un

mélange de différents processus biologiques, dont la survie cellulaire, la prolifération et le métabolisme. Afin de caractériser plus en détail l'effet de nos inhibiteurs, nous pouvons observer **Figure 16B et C** l'effet de l'inhibition d'HSP110 sur la survie cellulaire. En effet, lorsqu'un traitement perturbe l'homéostasie cellulaire, les cellules peuvent mettre en place un processus de suicide, qui passe par une étape d'exposition de phosphatidylsérines à la membrane, pouvant être marquées grâce à l'annexine V. A la fin de ce processus, les cellules perdent leur intégrité structurelle, se matérialisant par des pores dans la membrane, les rendant perméables et pouvant être marquées avec 7AAD. Ainsi, sur la **Figure 16B** nous constatons les proportions de cellules HBL1, OCI-LY3, TMD8 et OCI-LY10 doublement négatives pour les marquages annexine V et 7AAD, représentant alors les cellules en vie, normalisées sur le contrôle 0 μ M. Les cellules ont été traitées en effet dose en utilisant le temps de 96 heures déterminé par les tests XTT précédents. Nous pouvons constater que quelle que soit la lignée étudiée et l'inhibiteur employé, les cellules ont une survie décroissante lorsque la concentration en inhibiteur augmente. Sauf pour OCI-LY10, nous constatons que l'inhibiteur #52 permet d'atteindre le niveau de survie le plus faible, sous-entendant une fois encore que celui-ci semble être plus efficace. Les lignées ne semblent pas toutes sensibles de la même façon, notamment HBL1 qui dès la première dose de 5 μ M d'inhibiteurs présente déjà une forte mortalité, alors que chez TMD8 la mortalité semble plutôt linéaire avec l'augmentation de la concentration. OCI-LY3 semble plus sensible à l'inhibiteur #52, où 40 μ M ne laissent que 20% de survie alors qu'avec 40 μ M d'inhibiteur #33, on atteint à peine les 50% de mortalité. En revanche, OCI-LY10 semblent plus sensibles à l'inhibiteur #33, il semblerait même possible de complètement tuer les cellules avec la plus forte des concentrations. Cette hétérogénéité peut paraître surprenante, les inhibiteurs d'HSP110 #52 et #33 fonctionnent de la même façon en empêchant l'ATP d'entrer dans la poche dédiée dans HSP110. Mais de manière globale, nous comprenons maintenant que cet effet sur la viabilité cellulaire se traduit en fait au moins par une augmentation de la mortalité cellulaire. Quelque chose d'intéressant en cancérologie est de trouver et développer des molécules toxiques pour les cellules cancéreuses, qui provoquent une mort apoptotique, dite « propre » des cellules, une mort organisée qui permet de nous donner un premier indice sur le côté spécifique d'une molécule importante dans la signalisation cellulaire. C'est sur la **Figure 16C** que nous pouvons constater en détail le co-marquage Annexine V et 7AAD, nous montrant distinctement les proportions de cellules non marquées, simplement marquées et doublement marquées. Nous pouvons tout d'abord observer qu'il n'y a qu'un pourcentage faible de cellules simplement marquées pour le 7AAD, sous-entendant qu'il n'y a que très peu voire pas de mort par nécrose. Puis, il existe une proportion un peu plus élevée de cellules marquées Annexine V seules, laissant deviner alors des cellules en train de se suicider et enfin une proportion doublement marquée, des cellules qui sont définitivement mortes. Cela implique une dynamique, les cellules initient leur suicide, exposant leurs phosphatidylsérines, puis meurent, menant à la perte de leur intégrité

structurale. Ceci nous donne un premier indice sur le type de mort cellulaire : en effet, nous pouvons alors imaginer une mort plutôt apoptotique des cellules de lymphome. Pour confirmer cette hypothèse, des marquages par western blots ont été effectués **Figure 17** sur lysats de lignées de lymphome ABC, HBL1, OCI-LY3 et TMD8 traitées pendant 72 heures avec inhibiteur #52, puisque celui-ci semble être le plus efficace sur ces lignées. Dans un premier temps, les protéines caspase 3 et PARP sont impliquées dans la mort par apoptose, ce qui se matérialise par un clivage de ces deux protéines.

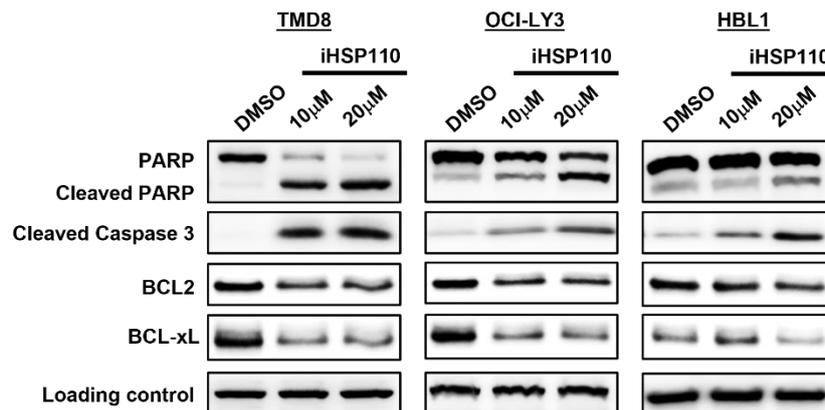


Figure 17 : Suite de l'étude de l'impact de l'inhibition d'HSP110 sur la survie des cellules d'ABC-DLBCL. Des traitements avec l'inhibiteurs d'HSP110 #52 ont été réalisés sur 72h sur 3 lignées (HBL1, OCI-LY3 et TMD8), puis différents marquages de protéines pro-apoptotiques (Caspase 3 et PARP) et leurs fragments de clivages ont été effectués, ainsi que les marquages d'oncogènes majeurs dans les lymphomes

Nous pouvons observer que dès 10 μ M de l'inhibiteur #52, il y a un clivage de la PARP chez OCI-LY3 et TMD8, bien qu'il faille aller jusqu'à 20 μ M pour HBL1. Aussi, quelle que soit la lignée regardée, il y a bien l'apparition d'un clivage de la caspase 3 dès 10 μ M, plus important à 20 μ M chez OCI-LY3 et HBL1. Ce qui est intéressant ici, c'est que le clivage de ces deux protéines constitue un indice sur la nature apoptotique de la mort cellulaire mise en place lors du traitement avec notre inhibiteur #52. Pour aller plus loin, des marquages des oncogènes BCL2 et BCL-xL, deux protéines de la famille des BCL impliquées dans les lymphomes ayant pour rôle d'empêcher la mort par apoptose en empêchant la libération du cytochrome c par les mitochondries, ont été effectués. Nous voyons que dès la première dose de notre inhibiteur #52, OCI-LY3 et TMD8 expriment moins BCL-xL et plus subtilement moins BCL2, alors que chez HBL1 il faut 20 μ M de #52 pour voir une diminution de BCL-xL. Nous avons alors un ensemble d'indices, la cytométrie en flux, les clivages de caspase 3 et PARP ainsi que les diminutions de l'expression d'oncogènes impliqués dans la résistance à l'apoptose qui peuvent nous faire conclure à une mort apoptotique des cellules de lignées d'ABC-DLBCL lorsque celle-ci sont traitées avec nos inhibiteurs d'HSP110.

Cependant, nous sommes dans un système cellulaire purement *in vitro*, pour savoir si nos inhibiteurs pourraient avoir un rôle similaire sur la survie des cellules *in vivo*, des expériences de xénogreffes de lignée humaine sur souris NSG ont été effectuées.

Effets sur la croissance tumorale d'une lignée humaine d'ABC xéno greffée sur souris NSG

Notre modèle *vivo* est la souris NSG. Celle-ci ne possède pas d'immunité fonctionnelle. Pour la xéno greffe, la lignée TMD8 a été choisie, non seulement parce qu'elle est sensible à notre inhibiteur #52, mais aussi car elle possède un temps de doublement d'une trentaine d'heures, permettant alors d'en avoir une très grande quantité assez rapidement. Des injections sous-cutanées de 15 millions de TMD8 ont été effectuées parce que des données préliminaires de l'équipe semblaient montrer que c'est la quantité adéquate pour avoir une prise tumorale assez rapide, pour quelque part mimer un développement agressif du lymphome, mais aussi car cette quantité permet de ne pas avoir recours au matrigel afin d'avoir une tumeur composée d'élément produit par nos cellules, ressemblant à un vrai développement tumoral.

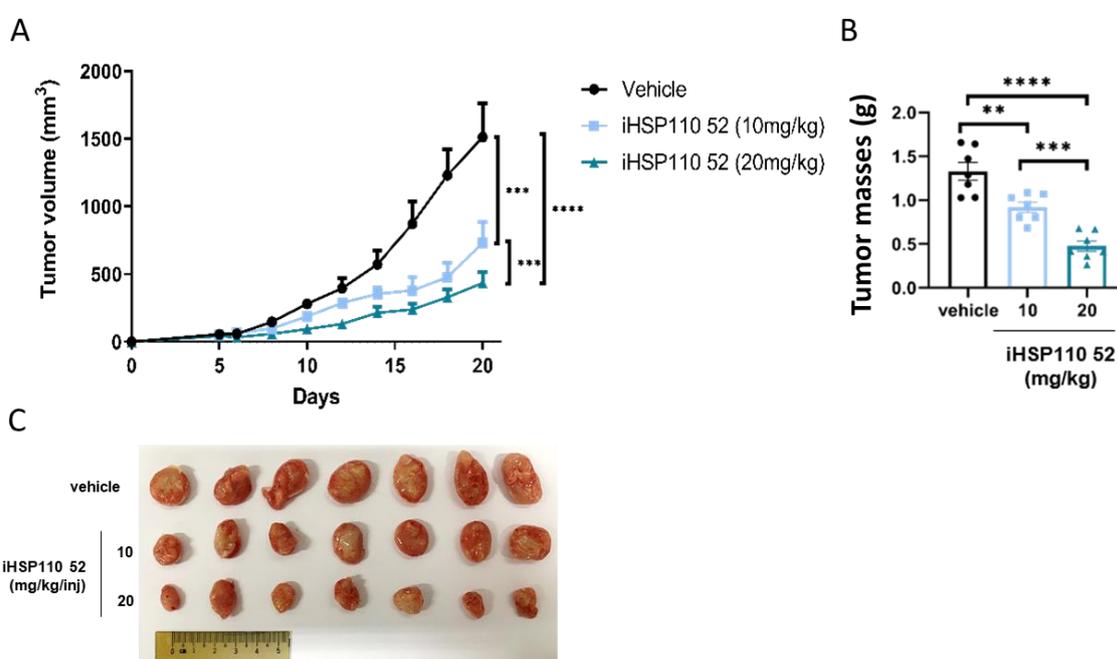


Figure 18 : Etude de l'impact de l'inhibition d'HSP110 avec l'inhibiteur #52 sur la croissance tumorale. A : mesure de la croissance tumorale d'une lignée de lymphome (TMD8) xéno greffée à J0 (15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG. Les traitements avec inhibiteur #52 ont commencé J6 et ont été effectués tous les deux jours en même temps que la prise des mesures tumorales. B : après mise à mort, les tumeurs ont été prélevées et pesées. C : image d'illustration de certaines tumeurs prélevées post-mortem

Les traitements ont commencé à J5, quand les masses tumorales étaient détectables. Nous pouvons constater **Figure 18A** que dès la deuxième injection à J8, il y a une légère différence dans la croissance tumorale entre les souris traitées et les contrôles, mais aussi entre les deux doses de traitement. Les écarts se creusent entre les souris traitées 10mg/kg et les souris contrôles, alors qu'entre les traitements 10 et 20mg/kg, les écarts semblent se maintenir. Au final, avant mise à mort, nous pouvons constater des différences significatives dans le volume tumoral, notre inhibiteur réduit efficacement la prolifération des cellules TMD8, et cet effet est d'autant plus important avec une

double dose d'inhibiteurs. Nous n'avons constaté aucune mort lors de l'expérience, sous-entendant que les doses employées sur 8 injections ne sont pas toxiques pour les souris. Une autre façon de voir l'effet de nos inhibiteurs sur la croissance tumorale peut se faire après mise à mort. Nous pouvons voir **Figure 18B et C** les différences significatives dans les masses tumorales des différents groupes de traitement.

En conclusion de cette partie, nous avons donc maintenant un effet clair de l'inhibition d'HSP110 par notre inhibiteur #52, à la fois *in vitro* sur la viabilité et la mort par apoptose de nos lignées de lymphome mais aussi sur la croissance tumorale d'une de nos lignées dans un modèle de xéno greffe *in vivo*. Par la suite, nous allons explorer l'implication d'HSP110 dans les différentes voies de signalisation de l'ABC-DLBCL, nous allons aussi chercher à expliquer quelles sont les voies impactées par l'inhibition d'HSP110 ainsi que comprendre les mécanismes mis en jeu lors de traitements avec nos inhibiteurs d'HSP110.

Impact de l'inhibition d'HSP110 sur la voie de signalisation majeure impliquée dans l'ABC-DLBCL : la voie du BCR

Impact de l'inhibition d'HSP110 sur les acteurs terminaux de la signalisation du BCR : NF- κ B et I κ B

Nous avons pu caractériser un effet de nos inhibiteurs, notamment #52, sur la viabilité des cellules. Nous savons qu'il faut au moins 96 heures pour avoir un effet sur ce paramètre, mais nous comprenons bien que même si l'effet observable sur les cellules ne se manifestent qu'à partir de ce temps-ci, les changements internes dans la cellule, sur les voies de signalisation cellulaire, doivent avoir lieu avant ces 96 heures. Il y a toujours un décalage entre les effets d'une molécule sur la signalisation et sur le phénotype. Dans le cas de l'ABC-DLBCL, les actions finales de la signalisation de la voie majeure du BCR avant l'entrée de NF- κ B dans le noyau sont des phosphorylations au niveau de p65, une des sous-unités de NF- κ B, et de I κ B, un inhibiteur empêchant la translocation de NF- κ B dans le noyau. C'est ainsi que des traitements ont été effectués sur deux lignées d'ABC-DLBCL, OCI-LY3 et TMD8, avec nos inhibiteurs d'HSP110 afin de voir un potentiel impact sur ces phosphorylation essentielle à la transduction des signaux de survie passant par la voie du BCR.

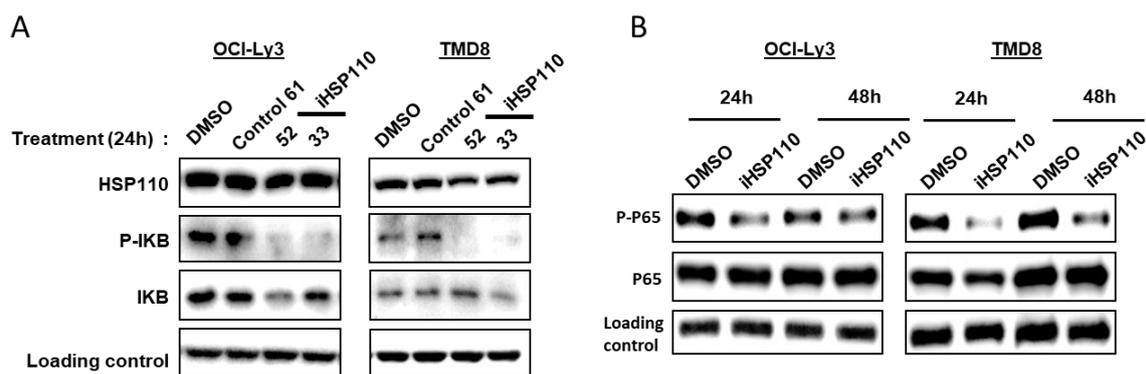


Figure 19 : Effets des inhibiteurs d’HSP110 sur les phosphorylations de IκB (sérines 32 et 36) et de p65 (sérine 276), essentielles pour la translocation du complexe NF-κB dans le noyau, et donc de la transduction du signal, sur les lignées OCI-LY3 et TMD8. **A :** Les lignées ont été traitées 24 heures avec les inhibiteurs #52 et #33, ainsi que du contrôle #61 à 10μM, puis les lysats ont été déposés pour marquages de phospho-IκB et IκB totale. **B :** Les lignées ont été traitées 24 et 48 heures avec l’inhibiteur #52 à 10μM, puis les lysats ont été déposés pour marquages de phospho-p65 et p65.

Nous constatons **Figure 19A** que notre inhibiteur d’HSP110 n’a aucun impact sur l’expression d’HSP110. Ceci est quelque chose d’absolument essentiel : nos inhibiteurs sont des inhibiteurs fonctionnels, ils ne doivent surtout pas impacter la production de notre HSP. Depuis le début de cette partie résultats, tous les effets observés sont bien dus à une perte de fonction d’HSP110, et non par sa diminution en termes de quantité. Nous observons ensuite que les quantités de IκB totales ne sont pas, voire très peu impactées, cet effet est surtout visible avec l’inhibiteur #52 sur OCI-LY3. Nous avons vu précédemment que OCI-LY3 est beaucoup plus sensible à l’inhibiteur #52 que par l’inhibiteur #33, nous pouvons envisager d’expliquer cet effet par la sensibilité de cette lignée à #52, menant à une perturbation de l’expression de certaines protéines, et donc de IκB totale. Lorsqu’on s’intéresse à la phosphorylation de IκB, nous n’observons pas ou peu d’impact par notre contrôle #61, mais une quasi-disparition de notre marquage dans les deux lignées traitées avec les inhibiteurs #52 et #33. Nous avons donc un effet très fort sur la signalisation du BCR, car sans phosphorylation de IκB, menant à la dégradation de ce dernier, la transduction du signal ne peut pas se faire. Pour continuer sur l’étude de NF-κB, nous pouvons voir sur la **Figure 19B** que notre inhibiteur #52 n’impacte pas l’expression de p65 totale, mais aussi et surtout que quelle que soit la lignée et le temps de traitement, la phosphorylation de p65 est réduite, impliquant alors une baisse de la signalisation globale NF-κB.

Cela démontre un puissant effet de nos inhibiteurs sur l’aboutissement de la signalisation du BCR. L’inhibition d’HSP110 impacte deux phosphorylations essentielles à la transduction du signal dans deux lignées de lymphome ABC-DLBCL. Maintenant, pour chercher à approfondir l’action précise de HSP110 dans la signalisation du BCR, plusieurs expériences ont été menées afin de comprendre l’action précise de l’inhibition d’HSP110 en amont du complexe NF-κB.

Impact de l'inhibition d'HSP110 sur le chaperonnage de MyD88, acteur majeur dans la signalisation du BCR

Un article paru dans Blood [2], publié par mon équipe d'accueil, montre un rôle d'HSP110 dans le chaperonnage de MyD88, une protéine impliquée dans la signalisation TLR et membre du supercomplexe My-T-BCR, menant à la phosphorylation de I κ B. HSP110 protège et empêche la dégradation de MyD88, permettant un maintien de cette protéine dans la signalisation du BCR et un signal constitutif de survie en hyperphosphorylant I κ B. Une des premières hypothèses de travail a été de vérifier si l'activité inhibitrice de nos composés #52 et 33 pouvaient impacter le chaperonnage de HSP110 pour MyD88.

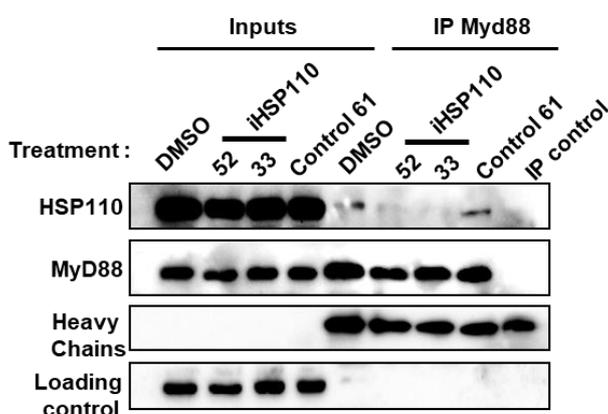


Figure 20 : Western blot d'une co-immunoprécipitation de MyD88 dans la lignée d'ABC-DLBCL HBL1, traitées avec #61, #52 et #33 à 20 μ M sur 24 heures, tiré de la thèse « Expression et rôle d'HSP110 dans le lymphome B diffus à grandes cellules de type activé ou ABC-DLBCL », <https://www.theses.fr/2018UBFCI014>. Les chaînes lourdes des anticorps de capture servent de témoins de charge pour les fractions d'immunoprécipitations, et la GAPDH sert de témoins de charge pour les inputs.

Des expériences de co-immunoprécipitations ont été réalisées par mon équipe d'accueil [139]. MyD88 a été capturé, et nous avons cherché à confirmer le chaperonnage par HSP110 et voir un possible impact de nos inhibiteurs. Les résultats sont observables **Figure 20**, où nous pouvons voir dans un premier temps dans les fractions d'immunoprécipitations une quantité égale de chaînes lourdes dans toutes les conditions, sous-entendant qu'il y a bien eu la même quantité d'anticorps de capture dans chacune des conditions. Nous constatons aussi que MyD88 a été capturé dans des quantités similaires parmi toutes les conditions de traitement, signifiant que s'il y a une co-capture de HSP110 dans des proportions différentes entre les conditions, la différence sera vraie. Enfin, nous voyons que les quantités de témoins de charge mais aussi de MyD88 et HSP110 sont toutes identiques dans les inputs quels que soient les traitements, impliquant que nos traitements n'ont pas impactés l'expression de MyD88 ni de HSP110. Lorsque nous nous intéressons plus particulièrement à la capture d'HSP110, nous pouvons voir des bandes au niveau des conditions contrôle (avec DMSO et #61), mais aucune dans la condition avec immunoglobuline contrôle. Cela nous donne l'information suivante : l'interaction entre HSP110 et MyD88 est vraie dans ces deux conditions. Il faut une capture spécifique

de MyD88 pour co-capturer HSP110. Nous confirmons alors les résultats de l'équipe, avec en plus la confirmation que le composé #61 n'a aucune action sur l'activité chaperonne de HSP110. Maintenant, lorsque nous nous intéressons aux conditions 52 et 33, nous constatons qu'il n'y a pas de bandes, de la même façon que dans la condition immunoglobuline contrôle. Cela implique qu'il n'y a pas eu de capture de HSP110 lorsque MyD88 est immunoprécipité, il n'y a pas d'interaction. Nous pouvons alors conclure que dans les conditions normales de culture, dans la lignée HBL1, il y a bien une interaction entre HSP110 et MyD88, qui n'est d'ailleurs pas perturbée par le composé contrôle #61. En revanche, avec l'ajout des inhibiteurs #52 et #33 dans le milieu de culture, il y a une diminution, voire la perte de l'interaction entre HSP110 et MyD88, sans pour autant perturber les quantités cellulaires de ces protéines.

Nous avons découvert un des effets de l'inhibition d'HSP110, pouvant expliquer la baisse de phosphorylation de IκB. Au vu de l'implication d'HSP110 dans la voie du BCR, d'autres expériences de traitements ont été menées afin de constater un possible effet de l'inhibition d'HSP110 sur les protéines directement en aval du récepteur des cellules B.

Impact de l'inhibition d'HSP110 sur différents acteurs de la voie du BCR

De nombreux acteurs proximaux au BCR sont impliqués dans la mise en place du supercomplexe My-T-BCR. La plupart sont des kinases, qui s'autophosphorylent et en phosphorylent d'autres jusqu'à atteindre le sous complexe CARD11-MALT1-BCL10. Afin d'en étudier certaines, de nouveaux traitements avec notre inhibiteur #52 sur lignées cellulaires ont été effectués, afin d'observer les quantités protéiques et les possibles modifications en termes de contenu cellulaire.

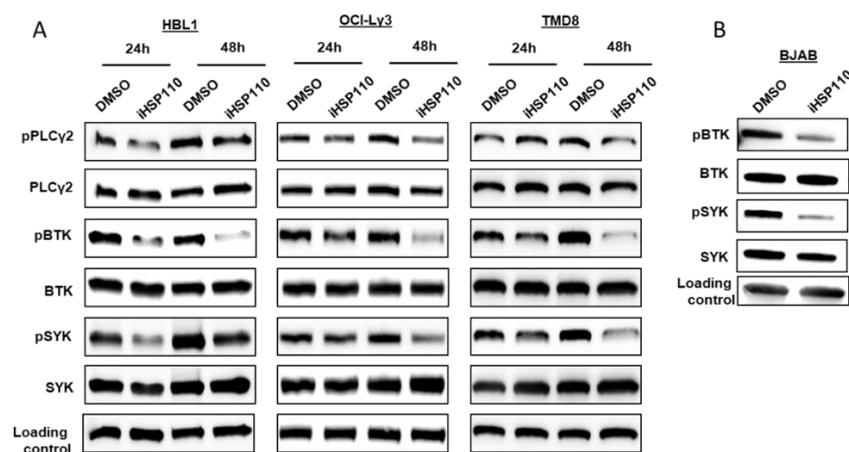


Figure 21 : Western blot de traitement #52 (10μM) réalisés sur différentes lignées cellulaires afin d'y révéler différents acteurs impliqués dans la signalisation proximale du BCR ainsi que leurs formes phosphorylées, la tyrosine 759 pour PLCγ2, la tyrosine 352 pour SYK et la tyrosine 223 pour BTK. A : Marquages des formes totales et phosphorylées des kinases PLCγ2, SYK et BTK sur lignées d'ABC-DLBCL (HBL1, OCI-LY3 et TMD8) après traitement pendant 24 et 48 heures, chez qui la signalisation du BCR est constitutive. B : Marquages des formes totales et phosphorylées des kinases SYK et BTK sur lignées de lymphome de Burkitt BJAB après traitement pendant 48 heures, chez qui la signalisation du BCR a été induite avec 2,5μg/mL de fragment Fab de chèvre anti-IgM humain pendant 5 minutes.

Sur lignées d'ABC-DLBCL, nous pouvons constater **Figure 21A** que, quels que soient la lignée et le temps de traitement étudié, les formes totales des protéines ne varient pas dans leurs quantités. Nous constatons également que les niveaux de phosphorylations de BTK et de SYK diminuent de manière évidente avec les traitements dès 24 heures, et que l'effet est plus fort à 48 heures. En revanche, cela est moins évident pour la PLC γ 2, chez qui les diminutions sont plus subtiles. L'un dans l'autre, ces deux constats mènent à la conclusion suivante : il y a une perte de l'activité des kinases étudiées lorsque HSP110 est inhibée, sous-entendant une diminution dans la signalisation du BCR dans les lignées d'ABC-DLBCL lorsque HSP110 est inhibée. Pour aller plus loin dans l'étude de ces kinases, ces mêmes traitements ont été effectués sur une lignée de lymphome de Burkitt, nommée BJAB. Ce modèle a été choisi parce que les lignées cellulaires de ce type de lymphome possèdent bien leur immunoglobuline de surface, mais la signalisation du BCR n'y est pas constitutive. C'est ainsi que cette lignée a été traitée à 10 μ M de #52 pendant 48 heures, afin de mettre en place une inhibition forte d'HSP110, puis les immunoglobulines de surface de BJAB ont été stimulées avec des fragments Fab d'anticorps de chèvre dirigés contre les IgM humains pendant 5 minutes. Le choix d'un temps aussi court de traitement est délibéré, car dans ce genre de lignées la stimulation est transitoire, et disparaît complètement dès 10 minutes de traitement. De nombreuses publications présentent des cinétiques, et 5 minutes est généralement le temps préconisé pour une stimulation efficace de la lignée BJAB. Les résultats des traitements #52 sur BJAB stimulées se trouvent **Figure 21B**, où il est possible de voir que sur cellules où HSP110 a été préalablement inhibé, les quantités totales de BTK et SYK ne varient pas par rapport au contrôle non-traité, comme dans les lignées d'ABC. Il est aussi possible de voir qu'il y a une diminution des phosphorylations de BTK et SYK. Il est connu que la stimulation de cette lignée est indispensable pour la phosphorylation des protéines kinases impliquées dans la voie du BCR, ainsi voir des niveaux de phosphoprotéines plus faibles lorsque HSP110 est inactif montre bien que HSP110 possède un rôle dans la phosphorylation des protéines du BCR.

En mettant ensemble ces résultats dans les lignées d'ABC et dans la lignée BJAB qu'on comprend l'implication de HSP110 dans la signalisation du BCR. Dans notre modèle d'étude, nous voyons que les niveaux de phosphoprotéines sont plus importants quand HSP110 est active, et ceci est soutenu par un modèle artificiel de stimulation de la voie BCR. Nous avons ainsi un ensemble de preuve solide *in cellulo* sur l'implication d'HSP110 dans la signalisation proximale du BCR. Pour soutenir ces résultats, différents marquages immunohistochimiques de protéines étudiées dans cette partie « Impact de l'inhibition d'HSP110 sur la voie de signalisation majeure impliquée dans l'ABC-DLBCL : la voie du BCR » ont été réalisés sur les tumeurs de souris, issues de l'expérience de xéno greffes de la lignées TMD8 dans les souris NSG de la **Figure 18**.

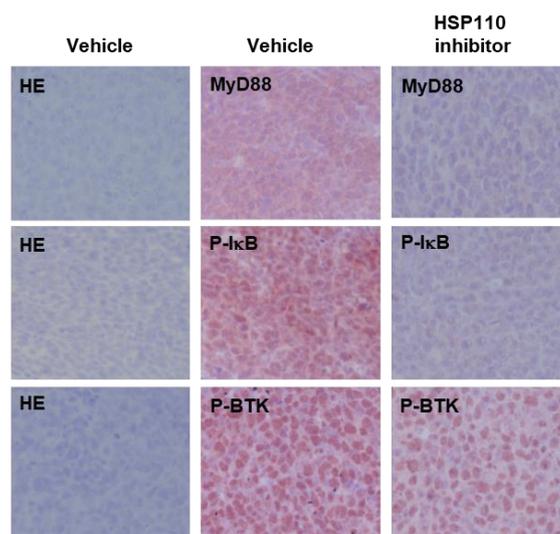


Figure 22 : Marquages immunohistochimiques des protéines de signalisation MyD88, phospho-IκB et phospho-BTK sur tumeurs xéno greffées d'une lignée de lymphome humaine (TMD8, 15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG, traitées tous les deux jours avec inhibiteur d'HSP110 #52 (10mg/kg). A J20, les souris sont mises à mort et les tumeurs ont été prélevées, fixées et incluses en bloc paraffine.

De manière générale, nous constatons **Figure 22** que tous les marquages effectués sont plus faibles dans la condition traitée avec l'inhibiteur d'HSP110 #52 (10mg/kg) que par rapport au véhicule DMSO. Les diminutions des marquages MyD88 et phospho-IκB sont flagrantes mais plus légère avec phospho-BTK. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus *in cellulo*. Ces résultats peuvent être mis en perspectives de ceux de la **Figure 18**, où nous avons pu voir un fort effet inhibiteur du composé #52 dès 10mg/kg sur la croissance tumorale. La signalisation de survie et viabilité des cellules tumorales étant réduite, les tumeurs prolifèrent de manière bien plus lente.

Pour conclure sur cette partie, nous avons pu voir que l'inhibition d'HSP110 semblait mener à une diminution de la phosphorylation de IκB, à une perte de la protection de MyD88 et enfin, à une diminution globale des niveaux de phosphorylation des kinases proximales du BCR. Tous ces effets *in cellulo* sont confirmés *in vivo* par des marquages immunohistochimiques sur tumeurs de lignée humaine. Cela renforce les données d'un mécanisme *vitro* et *vivo* de HSP110, par lequel HSP110 maintient le signal de survie non seulement via la protection de MyD88, déjà mise en évidence par mon équipe, mais implique aussi un nouveau rôle d'HSP110 dans la signalisation proximale du BCR, tout ceci aboutissant à un impact sur la signalisation NF-κB. Pour pleinement comprendre le mécanisme complet de l'inhibition d'HSP110 sur la signalisation du BCR, de nouvelles expériences visant à montrer l'interaction protéique entre HSP110 et les protéines proximales de la voie du BCR ont été menées. Il s'agit de trouver à quel niveau HSP110 intervient dans cette signalisation. Avec les western blots de la **Figure 21A**, nous avons l'indice que s'il y a un chaperonnage de HSP110, alors il s'agit d'une kinase plutôt en amont de la voie.

Identification du partenaire d'HSP110 impliqué dans la signalisation proximale du BCR et impact de l'inhibition d'HSP110 sur cette interaction

Identification du partenaire d'HSP110 dans la signalisation du BCR

Comme expliqué précédemment, de nombreuses preuves viennent soutenir une implication d'HSP110 dans la voie du BCR, en amont de la formation du supercomplexe My-T-BCR. Des premières expériences de co-immunoprécipitations d'HSP110 ont été réalisées, dans le but d'identifier un partenaire avec les protéines majeures de la voie. L'une d'entre-elles semble interagir avec HSP110, il s'agit de la kinase SYK. Des résultats de ces co-immunoprécipitations sont visibles **Figure 23A et B**. Dans la **Figure 23A**, HSP110 a été immunoprécipitée dans les lignées OCI-LY3 et TMD8, ce qui se matérialise par une forte bande présente dans les fractions d'immunoprécipitation de HSP110 et une bande très faible voire inexistante dans la fraction avec immunoglobuline contrôle. Parmi l'ensemble des protéines de signalisation testées (données non-montrées), seule la kinase SYK semble être co-immunoprécipitée. Dans la **Figure 23B** cette fois-ci, des immunoprécipitations de SYK ont été réalisées dans les mêmes conditions. De la même façon que pour les immunoprécipitations d'HSP110, nous constatons une forte capture de SYK dans les pistes avec anticorps de capture anti-SYK, ainsi qu'un marquage HSP110 dans les pistes SYK, impliquant que si HSP110 est présente en immunoprécipitant SYK, c'est parce que cette protéine a été co-immunoprécipitée, ce que nous pouvons conclure par une interaction. Il ne faut toutefois pas oublier que nous ne pouvons tirer des conclusions sur les immunoprécipitations seulement si les anticorps de capture ont été introduits en même quantité, ou bien s'il y en a plus dans notre piste avec immunoglobuline contrôle, ce qui est le cas ici. Nous avons donc un début de preuve, des co-immunoprécipitations d'HSP110 ainsi que des co-immunoprécipitations de SYK montrant une interaction entre ces deux protéines. Afin de confirmer ces données, des expériences de ligature de proximité (ou PLA) ont été effectuées. Il s'agit d'une technique d'hybridation *in situ* où des cellules sont fixées et perméabilisées, puis co-incubées avec deux anticorps d'espèces différentes (un de lapin et un de souris). Puis, des anticorps secondaires baptisés « sondes » portant des fragments d'ADN complémentaires (un fragment sur l'anticorps anti-lapin, l'autre fragment sur l'anticorps anti-souris) vont reconnaître les anticorps primaires, et si ceux-ci sont suffisamment proches, sous-entendant que les protéines cibles sont proches, il y aura hybridation, puis polymérisation et incorporation de nucléotides fluorescents. Nous pouvons observer les résultats de ces expériences sur les **Figure 23 C et D**, des transfections par électroporation de siARN spécifique d'HSP110 ont été effectuées sur cellules OCI-LY3 et TMD8 pendant 48 heures avant de réaliser les PLAs.

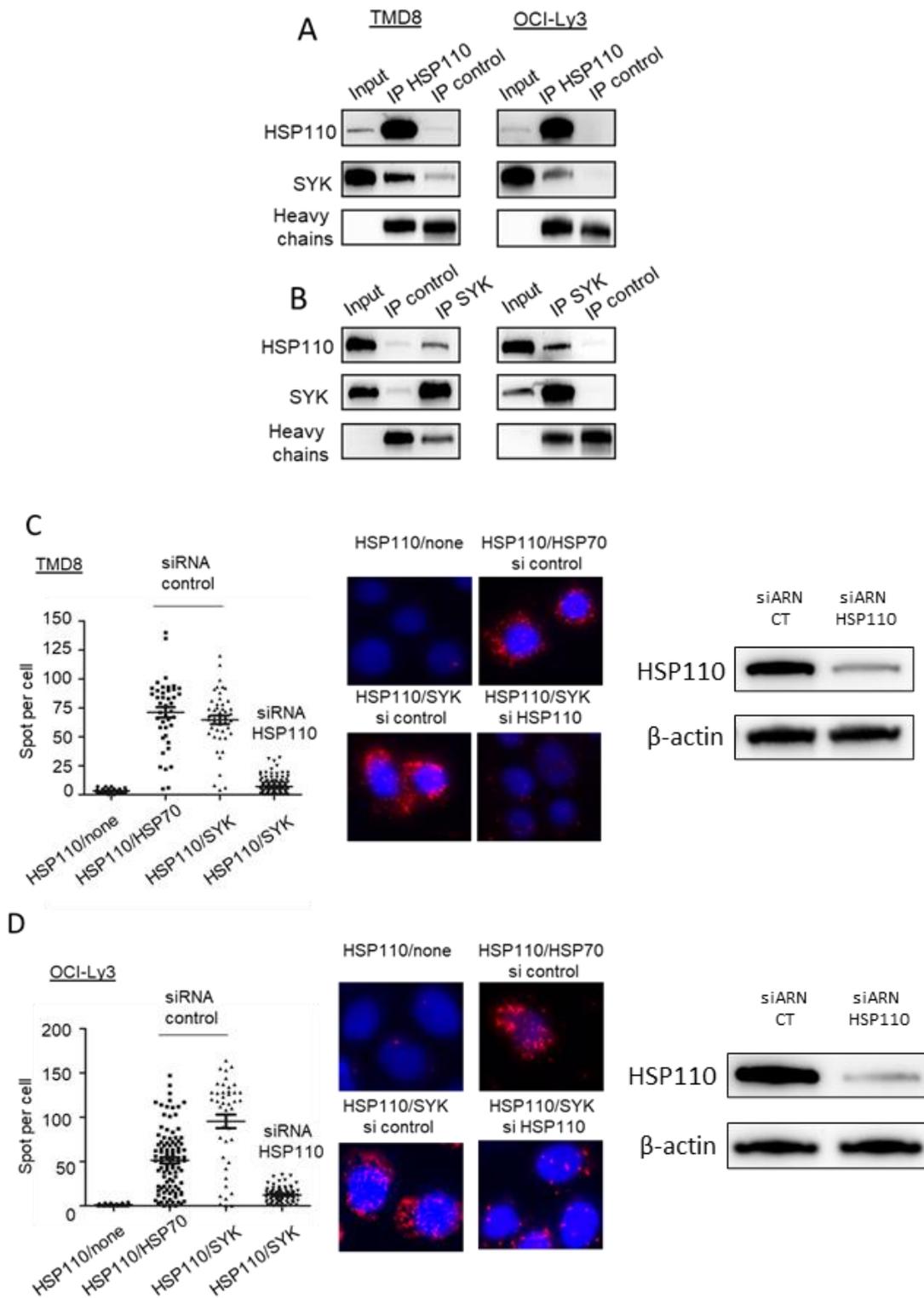


Figure 23 : Etude de l'interaction avec la kinase majeure de signalisation de la voie du BCR SYK sur les lignées OCI-LY3 et TMD8 d'ABC-DLBCL. A : Co-immunoprécipitations d'HSP110, réalisées avec 2 μ g d'anticorps de capture anti-HSP110 ou 2 μ g d'anticorps contrôle ajoutés dans 700 μ g de lysats protéiques d'OCI-LY3 ou TMD8 par anticorps. **B :** Co-immunoprécipitations de SYK, correspondant à l'immunoprécipitation inverse de la partie **A**, réalisées dans les mêmes conditions avec 4 μ g d'anticorps de capture anti-SYK ou 4 μ g d'anticorps contrôle. **C et D :** expériences de ligature de proximité entre HSP110 et SYK sur cellules OCI-LY3 et TMD8, fixées avec de la PFA 4% et perméabilisées avec du méthanol 100%. Les anticorps anti-HSP110 et anti-SYK ont été co-incubés sur la nuit à 4°C. HSP70 a été choisie comme contrôle d'interaction positif pour HSP110, et l'interférence ARN d'HSP110 (1nmol) sert à montrer la spécificité de l'interaction entre HSP110 et SYK. Les western blots servent à confirmer l'interférence ARN.

Ces électroporations ont été faites à des fins de contrôle, pour s'assurer que la proximité entre les protéines est vraie. De même, la proximité et l'interaction bien connue entre HSP110 et HSP70 sert de contrôle positif pour cette expérience. Tout d'abord, que ce soit la lignée TMD8 (**Figure 23C**) ou la lignée OCI-LY3 (**Figure 23D**), nous constatons sur le graphique que la quantité de points par cellule est nulle lorsqu'il n'y a qu'un seul anticorps, ce qui est attendu. Nous constatons également qu'il y a une grande quantité de points par cellule (~75 chez TMD8 et ~50 chez OCI-LY3) pour la proximité entre HSP110 et HSP70, ce qui pose le seuil d'une proximité forte dans cette expérience nous voyons dans la condition avec siARN contrôle qu'il y a une proximité entre HSP110 et SYK, aussi forte que celle entre HSP110 et HSP70 dans TMD8 et plus forte encore dans OCI-LY3. Enfin, pour s'assurer que cette proximité entre HSP110 et SYK est vraie, nous nous intéressons à cette proximité dans les conditions avec siARN dirigé contre HSP110. Tout d'abord, les western blot à droite des images d'illustration confirment que l'interférence ARN a bien fonctionné dans les deux lignées, puis nous voyons sur les graphiques que la proximité qui semblait être forte entre HSP110 et SYK dans les deux lignées est très efficacement réduite avec l'interférence ARN HSP110. Cela signifie, en clair, qu'en réduisant artificiellement la quantité d'un des deux partenaires, la quantité de points par cellule est réduite. Ceci est la preuve que la proximité observable dans les lignées d'ABC-DLBCL est vraie, car si la quantité de points restaient inchangée entre les conditions siARN CT et siARN HSP110, cela voudrait dire que la quantité de point observée n'est pas spécifique de la proximité supposée.

Ensemble avec les résultats de co-immunoprécipitations, nous avons la preuve que HSP110 interagit avec SYK. Il s'agit maintenant de comprendre dans quelle mesure est-ce que cette interaction est importante pour les cellules.

Identification du rôle d'HSP110 envers SYK dans l'interaction nouvellement découverte

Maintenant que nous avons un partenaire solide d'HSP110 impliqué dans la voie du BCR, il s'agit de pleinement caractériser cette interaction et d'en comprendre l'intérêt pour les cellules de lymphome. Pour y parvenir, des immunoprécipitations de SYK ont été réalisées sur U2932 et HBL1. Il est connu maintenant que la lignée HBL1 est dépendante de la signalisation du BCR pour sa survie et sa prolifération, mais ce n'est pas le cas du U2932 : en effet, la plupart des mutations majeures menant à l'activation constitutive de la voie du BCR (CD79, CARD11, MYD88...) ne sont pas mutées, mais la lignée maintient pourtant la phosphorylation de I κ B grâce à des mutations inactivatrices dans TNFAIP3 (aussi nommée A20), qui est un facteur suppresseur de tumeur en dé-ubiquitinylant phospho-I κ B, empêchant sa dégradation. Ainsi, la lignée U2932 maintient sa signalisation NF- κ B, indépendamment des kinases proximales du BCR, dont SYK.

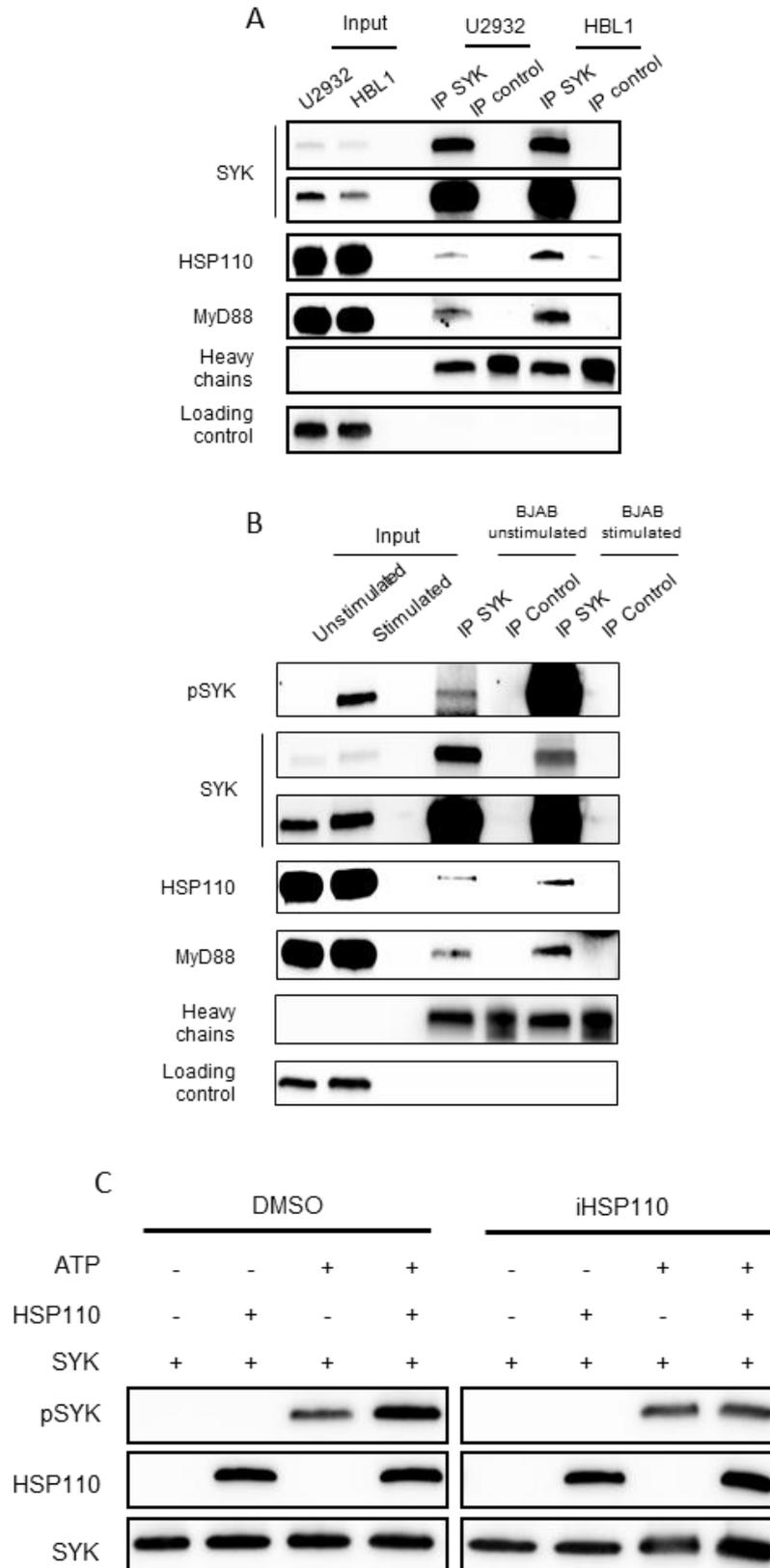


Figure 24 : Etude de l'interaction entre HSP110 et SYK dans différents modèle *cellulo* et *in vitro* par immunoempreintes. A : co-immunoprécipitation de SYK dans les lignées U2932 (MyD88^{WT}) et HBL1 (MyD88^{L265P}) d'ABC-DLBCL. **B :** co-immunoprécipitation de SYK dans la lignée BJAB stimulée ou non avec 5µg/mL de Fab de chèvre anti-IgM humain pendant 5 minutes. **C :** expérience de phosphorylation *in vitro* avec protéines recombinantes. Les protéines ont été co-incubées ensemble, puis la réaction de phosphorylation a été lancée avec l'ajout d'ATP pendant 10 minutes à 30°C en présence soit d'inhibiteur d'HSP110 #52 à 300µM, soit avec un volume équivalent de DMSO

Nous observons sur les immunoprécipitations de SYK de la **Figure 24A** que la capture de SYK est homogène dans les deux lignées, avec des quantités d'anticorps de capture similaires dans les conditions d'immunoprécipitations. Ce qu'on constate dans un premier temps, c'est que si l'on compare les marquages des pistes de précipitation de SYK et des pistes contrôles, nous avons bien co-immunoprécipité HSP110 et MyD88 dans chacune des lignées. Cela signifie que, quel que soit le statut mutationnel des deux lignées, HSP110 et MyD88 interagissent bien avec SYK. Ceci n'est pas surprenant pour HBL1, nous avons déjà pu valider l'interaction entre HSP110 et SYK dans OCI-LY3 et TMD8, nous confirmons cette interaction dans une autre lignée. Cependant, nous validons une nouvelle interaction entre SYK et MyD88. MyD88 étant impliquée plus dans la partie TLR du supercomplexe My-T-BCR, voir une interaction avec SYK renforce le rôle de la kinase SYK dans la signalisation globale du BCR, qui jusque-là n'était connue que pour son rôle de kinase proximale du BCR. Nous validons également les interactions de SYK avec HSP110 et MyD88, mais c'est lorsque nous comparons les deux lignées entre-elles que ressort une donnée fondamentalement intéressante : pour une même quantité de SYK capturée, nous pouvons voir des quantités plus grandes de HSP110 et de MyD88 co-immunoprécipitées chez HBL1, par rapport à la lignée U2932. Cela signifie que chez HBL1, chez qui la partie proximale du BCR est essentielle à la signalisation de survie globale, HSP110 est bien plus impliquée dans le chaperonnage de SYK, par rapport la lignée U2932 qui en dépend moins. Pour confirmer ce rôle plus important d'HSP110 dans une signalisation du BCR active, des expériences de co-immunoprécipitations de SYK ont été réalisées sur la lignée BJAB, stimulées avec fragment Fab de chèvre anti-IgM humain ou sans stimulation. Pour rappel, BJAB est une lignée de lymphome de Burkitt, chez qui la signalisation du BCR n'est constitutivement pas active. L'idée est de forcer la signalisation en stimulant, et de voir dans quelles conditions HSP110 chaperonne SYK. Ces résultats figurent **Figure 24B**, où nous confirmons tout d'abord que les anticorps ont été introduits dans des quantités similaires, mais nous constatons que SYK a été capturé moins efficacement dans les BJAB qui ont été stimulées. Il est difficile d'expliquer cela : ce phénomène est reproductible. Il n'y a, a priori, pas de raison d'observer cela. Toutefois, cela ne perturbe en rien l'interprétation des résultats, même sans densitométrie, car c'est dans cette piste que nous observerons les partenaires d'HSP110 dans la condition stimulée. Tout d'abord, nous validons grâce aux inputs que seules les BJAB stimulées phosphorylent leur SYK, ce que nous pouvons aussi constater dans les pistes d'immunoprécipitation de SYK chez les BJAB non stimulées et stimulées. Et lorsque nous nous intéressons aux protéines MyD88 et HSP110, nous pouvons voir que ces protéines sont présentes en plus grandes quantités chez les BJAB stimulées, par rapport aux autres. C'est d'autant plus vrai que SYK a été capturé dans des quantités plus faibles dans la piste IP SYK dans les BJAB stimulées. Cela signifie que HSP110 et MyD88 interagissent préférentiellement avec SYK uniquement lorsque la voie du BCR est active dans cette lignée de lymphome de Burkitt. Ceci, avec les données obtenues **Figure 24A**, constitue une preuve qu'il

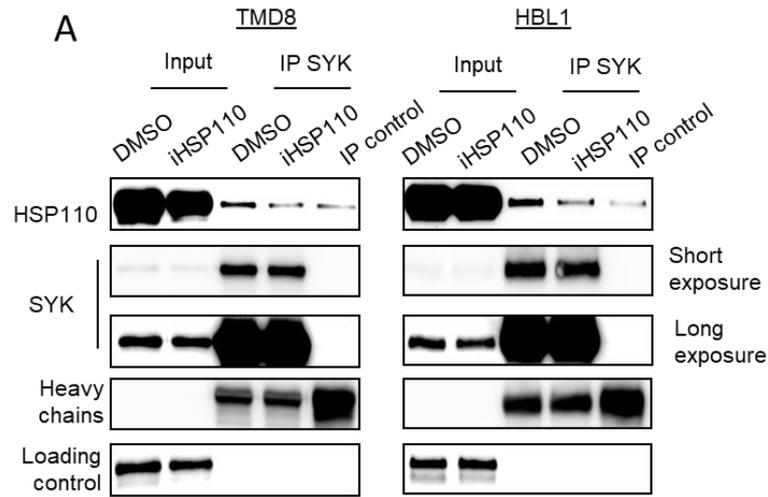
faut un BCR actif, et donc une implication importante de SYK pour voir un chaperonnage de cette kinase par HSP110 mais aussi l'interaction de SYK avec une protéine majeure du supercomplexe MyT-BCR. Pour cette fois-ci comprendre le côté fonctionnel de l'interaction d'HSP110 avec SYK, des expériences *in vitro* avec protéines recombinantes ont été réalisées **Figure 24C**. La kinase active SYK recombinante, dont l'activité est garantie notamment par sa production dans des cellules d'insectes, a été incubée seule ou avec HSP110, avec ou sans ATP et avec DMSO ou avec l'inhibiteur d'HSP110 #52 à 300µM. Le choix d'une telle concentration a été déterminé selon des expériences réalisées précédemment au sein de l'équipe : il faut une inhibition qui puisse être rapide, et dans le contexte de deux protéines recombinantes, l'effet « off-target » est forcément très limité. La réaction est rapide, et dure 10 minutes à 30°C. La réaction est stoppée avec ajout de Laemmli, et les échantillons ont été directement déposés. Pour l'instant, nous ne nous intéresserons qu'à la partie gauche de la **Figure 24C**. Tout d'abord, dans les deux premières conditions (SYK seule et SYK + HSP110 seules), nous constatons que SYK est incapable de s'autophosphoryler en absence d'ATP. Cela nous permet aussi de voir qu'il n'y a pas de phosphorylation constitutive de SYK détectable en western blot. Puis, lorsque SYK est seule et que la phosphorylation est déclenchée en ajoutant de l'ATP, nous pouvons constater un niveau d'autophosphorylation détectable par western blot. Enfin, en regardant l'autophosphorylation de SYK en présence d'HSP110 en ajoutant de l'ATP, nous pouvons comparer et noter que la proportion de SYK autophosphorylée est plus élevée par rapport à la condition précédente. Cela semble indiquer qu'HSP110 apporte une aide à la phosphorylation de SYK, et donc à son activité de kinase, dans ce modèle purement *in vitro*. Si nous nous intéressons cette fois-ci à la partie droite de la figure, il s'agit des mêmes conditions déposées dans le même ordre, à l'exception que cette fois-ci il y a présence de l'inhibiteur d'HSP110 #52. De la même façon que pour la partie gauche, dans les deux premières pistes nous constatons aucune phosphorylation de SYK, et lorsque SYK est seule avec de l'ATP, nous observons un niveau de phosphorylation détectable par western blot. Mais cette fois-ci, avec l'ajout d'HSP110, nous ne voyons pas d'augmentation du niveau de phosphorylation de SYK. Là où avec contrôle solvant (DMSO) nous avons pu voir l'apport d'une aide à la phosphorylation de SYK, avec l'inhibiteur #52 nous ne la voyons plus, comme s'il n'y avait pas d'HSP110 ajouté dans l'échantillon. Ce qu'on peut déduire facilement, dans un premier temps, c'est qu'HSP110 a tout simplement été inhibée dans son action, par son inhibiteur spécifique, effet qui semble très logique puisque #52 est un inhibiteur fonctionnel de la protéine HSP110. Mais l'observation la plus importante ici, c'est que lorsqu'HSP110 est fonctionnelle, donc avec une activité chaperonne active, SYK a une activité kinase plus importante, et que lorsqu'HSP110 n'est plus fonctionnelle, l'activité kinase de SYK est inchangée. Sachant qu'HSP110 interagit avec SYK, nous pouvons donc conclure que le rôle du chaperonnage de SYK par HSP110 est une aide à l'activité kinase de cette dernière, la rendant plus efficace dans ce modèle *in vitro*. Lorsque nous mettons ces données en perspective des données des **Figure 24A et B**,

nous comprenons maintenant que lorsque la signalisation du BCR est active, impliquant alors l'activité kinase de SYK pour transduire le signal aux autres effecteurs en aval, l'interaction de HSP110 avec SYK est en fait une aide, un soutien pour cette kinase essentielle *in cellulo*, et ce que soit constitutivement chez HBL1 ou de manière artificielle avec BJAB.

Ainsi, il semblerait que nous ayons élucidé le rôle de l'interaction entre HSP110 et SYK, et un début de compréhension du fonctionnement de l'inhibiteur #52 d'HSP110 semble se dégager. En effet, avec ces premiers résultats *in vitro*, semblent indiquer une diminution dans la fonction de chaperon moléculaire d'HSP110. Pour confirmer cet effet, de nouvelles expériences cette fois-ci sur cellules lignées cellulaires et sur tissu tumoral humain xéno greffé ont été effectuées.

Identification de l'effet in cellulo et in vivo de l'inhibition d'HSP110 sur l'interaction entre HSP110 et SYK

Afin de comprendre l'effet de l'inhibition d'HSP110 sur l'interaction entre HSP110 et SYK, de nouvelles expériences de co-immunoprécipitations et de PLAs ont été effectuées. Pour commencer, nous pouvons voir **Figure 25A** des résultats de co-immunoprécipitations de SYK réalisées sur les lignées HBL1 et TMD8. Celles-ci ont été traitées avec une dose plutôt forte d'inhibiteur #52 (20µM) sur un temps plutôt court (24 heures). Ce choix a été fait dans le but d'inhiber rapidement et efficacement HSP110 cellulaire, sans pour autant impacter la viabilité des cellules. Dans un premier temps, nous confirmons que SYK a été capturée dans des proportions similaires dans les deux conditions de traitement (DMSO et #52), et ce dans les deux lignées. Nous constatons cependant un excès de charge dans les pistes avec immunoglobuline contrôle, mais cela ne gêne en rien l'interprétation des résultats, il faut simplement garder en tête que la capture aspécifique de l'anticorps contrôle sera montrée comme plus forte que ce qu'elle est réellement. Dans un premier temps, sans regarder les conditions de traitement #52, nous observons dans les deux lignées que HSP110 a été co-immunoprécipitée dans la piste IP SYK en plus grande proportion que dans la piste IP contrôle, et ce dans les deux lignées d'ABC. Nous validons que les quantités de DMSO introduites, solvant de l'inhibiteur #52, n'impactent pas l'interaction entre SYK et HSP110. Lorsque nous nous comparons cette fois-ci les pistes d'immunoprécipitations de SYK en conditions DMSO et #52, nous constatons des quantités amoindries d'HSP110 dans les pistes #52 dans les deux lignées. Ceci signifie qu'avec l'inhibition d'HSP110, il y a une altération dans l'interaction d'HSP110 avec SYK *in cellulo*.



B

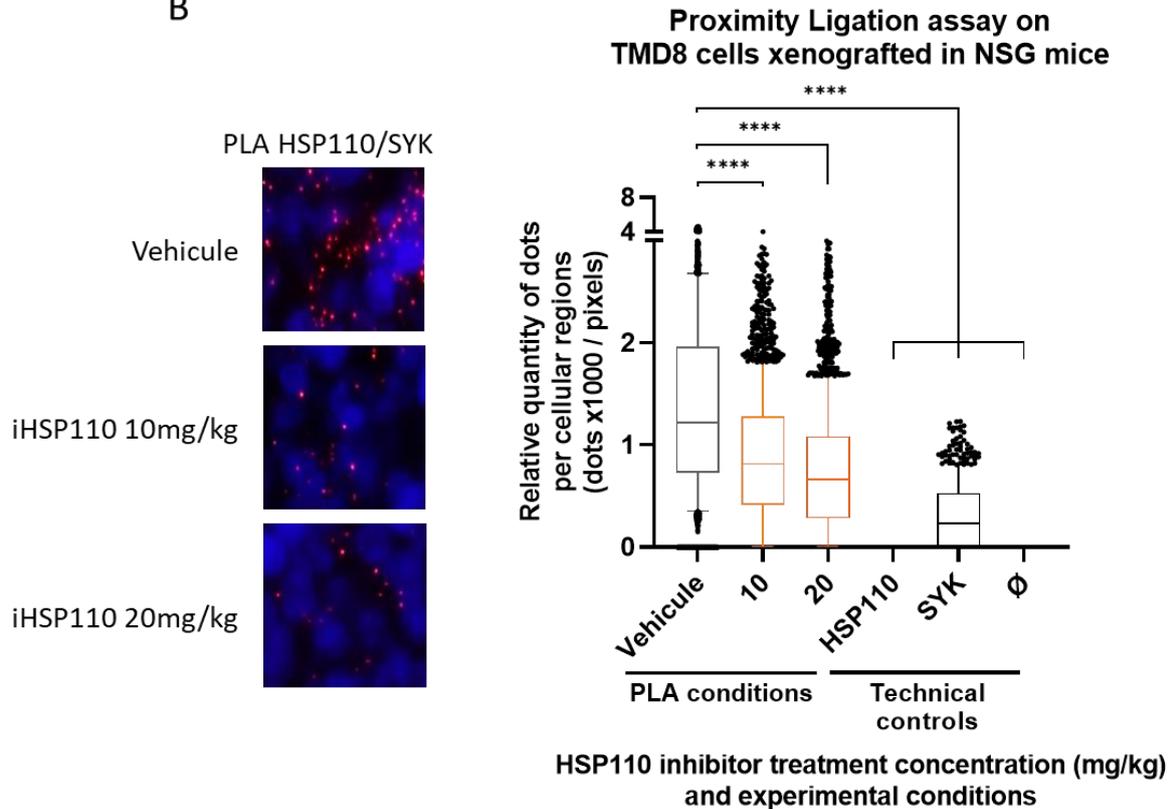


Figure 25 : Etude de l'effet de l'inhibiteur #52 d'HSP110 sur l'interaction entre HSP110 et SYK. A : Co-immunoprécipitations de SYK réalisées sur les lignées cellulaires d'ABC-DLBCL HBL1 et TMD8 traitées avec 20µM d'inhibiteur #52 sur 24 heures. **B :** Expériences de ligature de proximité (PLA) réalisées sur xéno greffes d'une lignée de lymphome humaine (TMD8, 15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG, traitées tous les deux jours avec inhibiteur d'HSP110 #52 (10mg/kg). A J20, les souris sont mises à mort et les tumeurs ont été prélevées, fixées et incluses en bloc paraffine pour marquage en PLA

Pour confirmer ces résultats sur lignées cellulaires *in vitro*, des expériences de PLA ont été effectuées **Figure 25B** sur tissu tumoral de lignée humaine de lymphome TMD8 xéno greffées dans des souris NSG. L'expérience est similaire à celle réalisée sur lignées **Figure 23 C et D**, la seule différence étant que la quantité de points visualisés sur tissu est rapportée par rapport à la surface cellulaire. Dans un premier temps, nous voyons que le graphique à droite de la **Figure 25B** montre que les

contrôles techniques HSP110 seule et « aucun anticorps » ne présentent aucun point, et que la condition anticorps anti-SYK seul présente une quantité faible de point. La condition anticorps anti-SYK seul présente la plus faible quantité de points devant chaque groupe de traitement (DMSO, 10mg/kg et 20mg/kg) et toutes les différences sont statistiquement significatives (comparaison multiple, Kruskal-Wallis). Nous observons premièrement que parmi toutes les conditions de traitement, la plus grande quantité de points se trouve dans la condition DMSO. Dans cette condition, il n'y a pas de traitement, et nous avons pu voir **Figure 18** une croissance tumorale plus importante qu'avec les conditions de traitement, et **Figure 22** nous avons pu voir des quantités de protéines majeures de signalisation les plus présentes et actives. Ce que nous confirment cette première donnée, c'est que c'est bien dans cette condition DMSO que la proximité entre HSP110 et SYK est la plus forte, là où les tumeurs prolifèrent le plus. Dans les conditions de traitement avec inhibiteur d'HSP110 #52, nous constatons une réduction du nombre de point par régions cellulaires, réduction d'autant plus importante que la dose de #52 augmente. Si nous mettons ensemble cette observation avec ce que nous avons déjà pu voir sur cellules **Figure 25B**, nous comprenons alors que l'effet vu sur les lignées est le même observé *in vivo* : avec la présence de l'inhibition d'HSP110, il y a une diminution de l'interaction entre HSP110 et SYK, altérant alors la signalisation du BCR, pouvant expliquer les réductions dans la croissance tumorale et dans les marquages immunohistochimiques de protéines majeures de signalisation du BCR.

Pour conclure sur cette sous-partie, un partenaire d'HSP110 a été trouvé parmi les protéines proximales de signalisation du BCR. Cette protéine est SYK, cette interaction étant prouvée par co-immunoprécipitation dans les deux sens, mais aussi par PLA. Nous avons également observé que SYK était une kinase critique dans la signalisation du BCR lorsque celui-ci est pleinement actif, et que c'est dans cette situation que HSP110 interagit le plus avec SYK. Nous avons démontré un rôle de soutien de la part d'HSP110 pour l'activité kinase de SYK, pouvant expliquer qu'HSP110 interagisse plus avec SYK lorsque celle-ci est mobilisée dans la voie du BCR et enfin, nous avons pu voir qu'en inhibant l'activité chaperonne d'HSP110, l'aide apportée par HSP110 sur SYK est non seulement perdue, mais qu'HSP110 interagit de manière bien moindre avec la kinase SYK.

Pour conclure de manière générale sur cette grande partie 1, il semblerait que nous ayons identifié un des mécanismes d'HSP110 dans la voie du BCR. Il était déjà connu que HSP110 maintenait le signal TLR via le chaperonnage et la protection de MyD88, ce qui était associé à une survie et une prolifération accrue des cellules. Ici, nous avons pu voir qu'HSP110 était aussi impliquée dans le

chaperonnage de SYK, constituant une aide à l'activité kinase de cette dernière, là où la signalisation du BCR est la plus mobilisée. Nous avons aussi pu voir que l'inhibition d'HSP110 altérait cette interaction, menant à une perte de l'aide à l'activité kinase de SYK. Celle-ci est associée à une diminution globale des niveaux de phosphorylation des protéines en aval de SYK, conduisant à des baisses de phosphorylation de I κ B et de p65, limitant alors l'entrée de NF- κ B dans le noyau et altérant les signaux de survie et prolifération. Cela se traduit phénotypiquement par une diminution de la viabilité et de la survie des lignées, et de la croissance tumorale. Sur la **Figure 26** se trouve un résumé schématique de la présence d'HSP110 au sein d'une cellule d'ABC-DLBCL. Ainsi l'inhibition d'HSP110 présente un intérêt de ciblage thérapeutique dans le traitement de l'ABC-DLBCL.

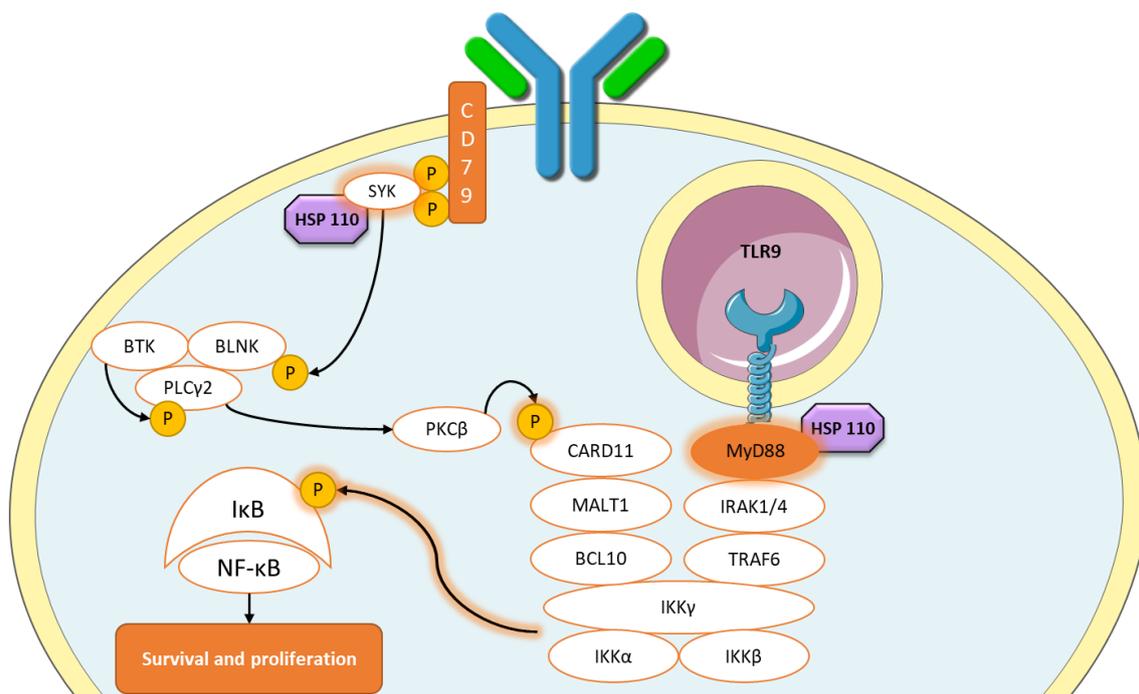


Figure 26 : Schéma de conclusion de la partie 1 des résultats, montrant une cellule d'ABC-DLBCL dans des conditions normales, montrant l'implications d'HSP110 dans la voie du BCR, notamment l'interaction et le chaperonnage de SYK et de MyD88.

Connaissant maintenant l'implication d'HSP110 dans la voie du BCR et l'intérêt de son inhibition pour d'éventuels traitements, des co-traitements de notre inhibiteur avec des composés déjà employés en tant que traitements ciblés ont été envisagés. Lorsque nous regardons en détail la **Figure 10**, il est connu qu'une voie alterne à la signalisation du BCR, impliquant aussi les immunoglobulines de surface, mène à la survie et à la prolifération des cellules d'ABC-DLBCL, mais aussi de GC-DLBCL. En particulier, la voie de signalisation alterne du BCR impliquant la kinase PI3K ne partage que peu d'acteurs avec la voie du BCR telle que nous l'avons étudiée jusqu'ici, c'est pourquoi il a été envisagé de combiner notre composé #52 avec un inhibiteur de tous les types de PI3K (pan-PI3K), nommé copanlisib, afin d'impacter deux des voies majeures de signalisation dans les cellules d'ABC-DLBCL. Ce qui a confirmé ce choix, c'est un article publié en 2017, où des cotraitements avec la

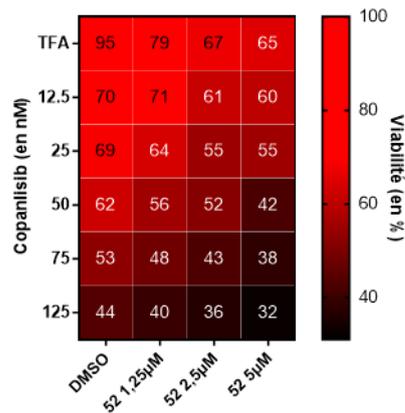
copanlisib et un inhibiteur spécifique de BTK nommé ibrutinib, semblent montrer qu'une double inhibition de ces kinases ont des effets synergiques sur les cellules de DLBCL [61]. BTK est une kinase qui, comme SYK, est impliquée dans la voie du BCR. En sachant que notre inhibiteur d'HSP110 impacte lui aussi la signalisation du BCR, c'est naturellement que l'idée d'employer notre inhibiteur d'HSP110 en combinaison avec la copanlisib nous est apparue comme intéressante.

Impact de la combinaison des traitements avec inhibiteur d'HSP110 et copanlisib sur la viabilité des lignées cellulaires d'ABC-DLBCL et la croissance tumorale d'une lignée humaine d'ABC-DLBCL xéno greffée dans des souris NSG

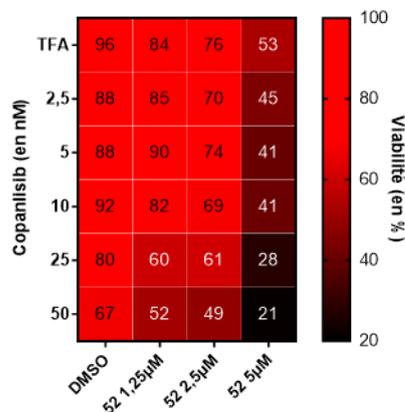
Effet in vitro de la co-inhibition de PI3K et d'HSP110 sur la viabilité de lignées d'ABC-DLBCL

Des expériences de viabilité ont été mises en place dans trois lignées d'ABC-DLBCL HBL1, OCI-LY3 et TMD8. Les cellules ont été co-traitées pendant 72 heures avec différentes doses de notre inhibiteur d'HSP110 #52 et différentes doses de copanlisib, en fonction de la sensibilité des cellules. Ces résultats **Figure 27** sont obtenus via un kit, le Cell Titer Glo 2.0 qui fonctionne différemment de l'XTT que nous avons pu voir **Figure 16A**. Les cellules ont étéensemencées en plaques fonds noirs opaques, et à la fin des 72 heures de traitement, celles-ci sont lysées et une réaction impliquant de la luciférase produit de la luminescence qui dépend de la quantité d'ATP présente dans les puits. Plus il y a de cellules viables dans les puits, plus le signal de luminescence est fort. Les résultats sont normalisés par rapport à la plus grande valeur pour obtenir un pourcentage de viabilité. Les résultats se présentent comme suit : la moyenne des quadruplicats techniques la plus élevée est en rouge, et la couleur devient de plus en plus sombre à mesure que la viabilité décroît.

A Viabilité mesurée sur cellules HBL1 cotraitées avec Copanlisib et inhibiteurs d'HSP110 sur 72 heures



B Viabilité mesurée sur cellules OCI-LY3 cotraitées avec Copanlisib et inhibiteurs d'HSP110 sur 72 heures



C Viabilité mesurée sur cellules TMD8 cotraitées avec Copanlisib et inhibiteurs d'HSP110 sur 72 heures

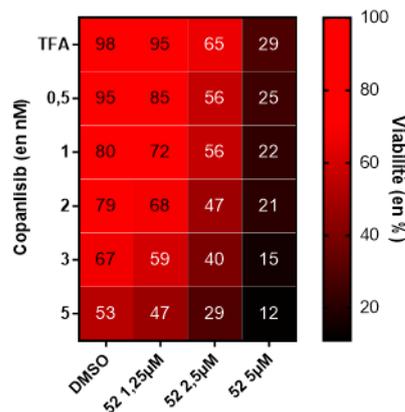


Figure 27 : Expériences de viabilité avec kit CTG 2.0 sur lignées cellulaires d'ABC-DLBCL HBL1 (en A), OCI-LY3 (en B) et TMD8 (en C) co-traitées avec inhibiteur d'HSP110 et copanlisib sur 72 heures.

Nous pouvons constater **Figure 27** que toutes les lignées ne sont pas sensibles de la même façon pour les inhibiteurs individuellement, mais aussi en combinaison. **Figure 27A**, nous voyons que HBL1 possède une viabilité d'environ 55% lorsqu'elle est traitée avec 75nM de copanlisib sans #52, même chose avec 50nM de copanlisib et 1,25μM de #52, avec 25nM de copanlisib et 2,5μM de #52 et même chose avec 12,5nM de copanlisib et 5μM de #52. Ceci se matérialise sur la figure par une

diagonale de même couleur, semblant alors indiquer que pour un même effet sur la viabilité, l'ajout de #52 sensibilise les cellules HBL1 à la copanlisib. En regardant maintenant les lignées OCI-LY3 **Figure 27B**, et TMD8 **Figure 27C**, nous constatons d'abord que leur viabilité est fortement impactée dès 5µM de #52. Contrairement à la lignée HBL1, nous ne retrouvons ces « diagonales de viabilité » uniquement dans les conditions DMSO et 1,25µM de #52, impliquant qu'il y a aussi sensibilisation à la copanlisib des lignées avec l'inhibiteur #52, mais avec les concentrations supérieures de cet inhibiteur, la sensibilité au traitement semble accrue. Si nous considérons alors les effets sur la viabilité de notre inhibiteur d'HSP110 seul, de la copanlisib seule et des combinaisons, nous pouvons conclure à un effet additif de nos co-traitements sur la viabilité des lignées d'ABC-DLBCL.

Effet in vivo de la co-inhibition de PI3K et d'HSP110 sur la viabilité sur souris NSG xénotreffées avec une lignée humaine d'ABC-DLBCL

Pour confirmer l'effet observé sur la viabilité des cellules d'ABC-DLBCL, des expériences de xénotreffes similaires à ce qui avait été fait pour les traitements 33 seuls ont été réalisées. La lignée TMD8, a été xénotreffées dans des souris NSG à 15 millions de cellules par souris et traitées avec notre inhibiteur d'HSP110 #52 par voie intrapéritonéale et/ou avec la copanlisib par voie intraveineuse tous les 2 jours. Nous pouvons constater **Figure 28A** que l'effet observé au jour 21 de l'inhibiteur #52 seul est similaire aux expériences réalisées **Figure 18**. Nous constatons aussi que la copanlisib seule possède un effet très puissant sur la réduction de la croissance tumorale, supérieur à celui de #52 seul. Enfin, lorsqu'on s'intéresse à la combinaison des deux composés, nous observons un effet sur la croissance plus fort que pour les mono-traitements. Il semblerait que la croissance tumorale dans cette condition est constante et proche de l'axe des abscisses, sous-entendant qu'en présence des deux molécules, les tumeurs ne prolifèrent pas. Après mise à mort **Figure 28B**, nous constatons des différences significatives de la taille des tumeurs entre les véhicules et les mono-traitements, et entre les mono-traitements et le co-traitements. Cela nous indique un effet plus important de la co-inhibition d'HSP110 et de pan-PI3K, confirmant alors les données observées *in vitro* **Figure 27**.

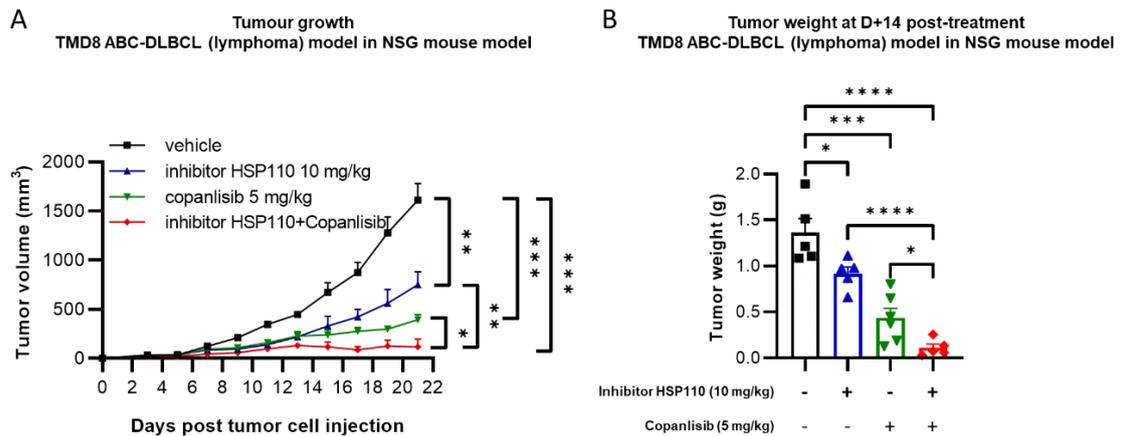


Figure 28 : Etude de l'impact de la co-inhibition d'HSP110 avec l'inhibiteur #52 et de pan-PI3K avec la copanlisib sur la croissance tumorale. A : mesure de la croissance tumorale d'une lignée de lymphome (TMD8) xéno greffée à J0 (15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG. Les traitements avec inhibiteur #52 (voie intrapéritonéale) et/ou copanlisib (voie intraveineuse) ont commencés J3 et ont été effectués tous les deux jours en même temps que la prise des mesures tumorales. **B :** après mise à mort, les tumeurs ont été prélevées et pesées.

Afin de pleinement comprendre les effets de la combinaison sur la viabilité des lignées d'ABC-DLBCL et sur la croissance tumorale, nous avons étudié les protéines impliquées dans la voie du BCR, plus précisément les kinases proximales du BCR, mais aussi la protéine AKT, impliquée dans la signalisation mobilisant PI3K.

Impact de la combinaison des traitements sur la signalisation cellulaire des lignées d'ABC-DLBCL et dans le tissu tumoral d'une lignée humaine d'ABC-DLBCL xéno greffée dans des souris NSG

Effets de la co-inhibition de PI3K et d'HSP110 sur les voies de signalisation des lignées d'ABC-DLBCL

Pour cette étude, des co-traitements avec #52 et la copanlisib ont été réalisés sur lignée d'ABC-DLBCL et les résultats sont analysés par western blot **Figure 29**. Nous constatons dans un premier temps que les niveaux de phosphorylation de AKT (sérine 473) semblent inchangés avec notre inhibiteur #52, mais chutent avec les mono-traitements copanlisib, avec un effet très prononcé chez HBL1. Ceci semble logique, puisque la copanlisib affecte la voie PI3K/AKT. Lorsqu'on s'intéresse à la combinaison, l'effet semble légèrement plus prononcé qu'avec la copanlisib seule, mais les effets sont très légers. En revanche, lorsque nous nous intéressons au marquage phospho-BTK, nous voyons des diminutions importantes de la combinaison, plus forte qu'avec les mono-traitements sur OCI-LY3 et TMD8, avec un effet plus subtil chez HBL1. Enfin, ce qui ne laisse aucun doute, c'est le marquage phospho-SYK, où quelle que soit la lignée étudiée, la combinaison possède un effet puissant sur la baisse du niveau de phosphorylation, notamment chez OCI-LY3 ou phospho-SYK n'est même plus détectable.

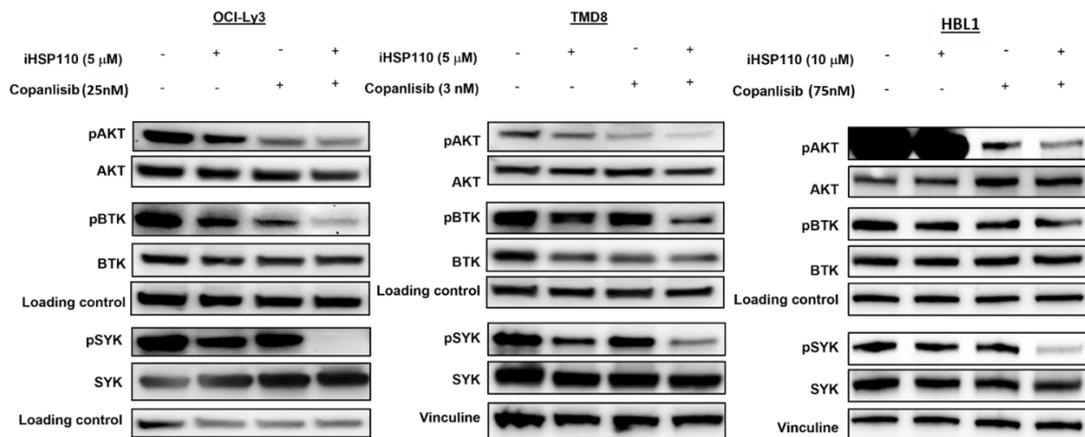


Figure 29 : Western blot montrant l'impact des mono-traitements et co-traitement avec inhibiteur d'HSP110 #52 et copanlisib sur lignées d'ABC-DLBCL HBL1, OCI-LY3 et TMD8 traitées pendant 48 heures pour y révéler des phosphoprotéines majeures dans la signalisation globale de ce type de cancer

De manière générale, nous pouvons voir une diminution globale des voies de signalisation du BCR et de PI3K/AKT. Pour étudier en profondeur cet effet en signalisation, des marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur les tumeurs issues des expériences de la **Figure 28**.

Effets sur la signalisation cellulaire in vivo de la co-inhibition de PI3K et d'HSP110

Dans le but de confirmer les résultats obtenus *in vivo* **Figure 28**, des marquages similaires à ce qui a été fait **Figure 22** ont été effectués. Ces résultats sont visibles **Figure 30**, où nous pouvons constater dans un premier temps des marquages phospho-I κ B et phospho-BTK détectables dans les conditions Vehicule, iHSP110 #52 et Copanlisib en comparant avec le marquage avec immunoglobulines contrôles (condition HE). Lorsque nous nous intéressons à la condition de combinaison des inhibiteurs, le marquage est toujours présent mais beaucoup plus subtile. De manière générale, cela signifie que la combinaison impacte non seulement efficacement la voie du BCR au niveau des kinases proximales de l'immunoglobuline de surface, mais aussi la signalisation générale avec la baisse de phospho-I κ B. Pour l'étude de la phosphorylation de la kinase SYK, il n'y a pas d'anticorps validés en IHC nous permettant de faire ce marquage. C'est pourquoi une approche différente a dû être mise en place. Nous pouvons voir **Figure 31** des images de PLA, réalisée entre SYK totale et les phosphotyrosines. Cette approche nous permet de voir alors phospho-SYK sur tous ces sites de phosphorylation. Nous pouvons constater une baisse des niveaux de phosphorylation de SYK avec inhibiteurs d'HSP110 et avec copanlisib seuls mais qui ne sont que des tendances. Mais lorsqu'il y a combinaison des inhibiteurs, il y a une différence qui est statistiquement significative.

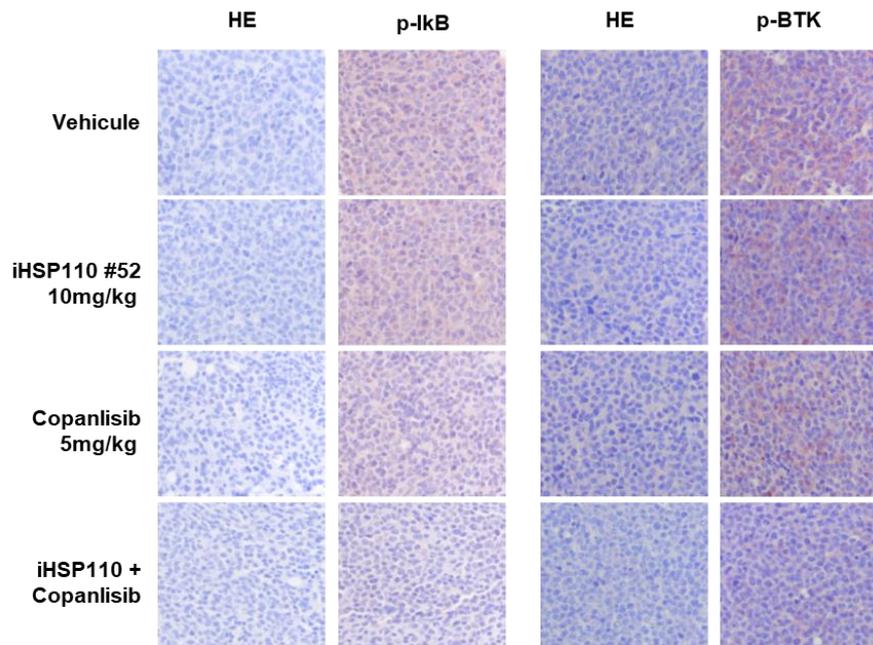
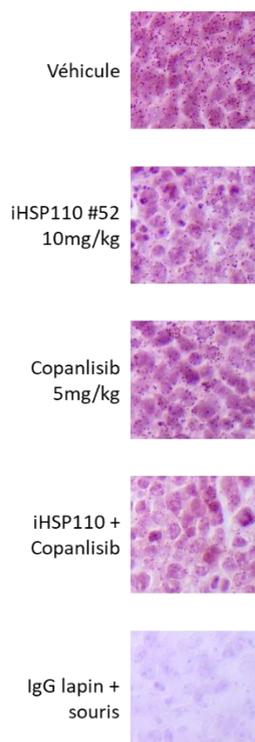


Figure 30 : Marquages immunohistochemiques des protéines de signalisation phospho-IkB et phospho-BTK sur tumeurs xéno greffées d'une lignée de lymphome humaine (TMD8, 15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG, traitées tous les deux jours avec inhibiteur d'HSP110 #52 (10mg/kg) et/ou avec copanlisib (5mg/kg). A J21, les souris sont mises à mort et les tumeurs ont été prélevées, fixées et incluses en bloc paraffine.



Expérience de ligature de proximité (PLA) entre SYK et phospho-tyrososine sur tumeurs xéno greffées de cellules TMD8 dans des souris NSG

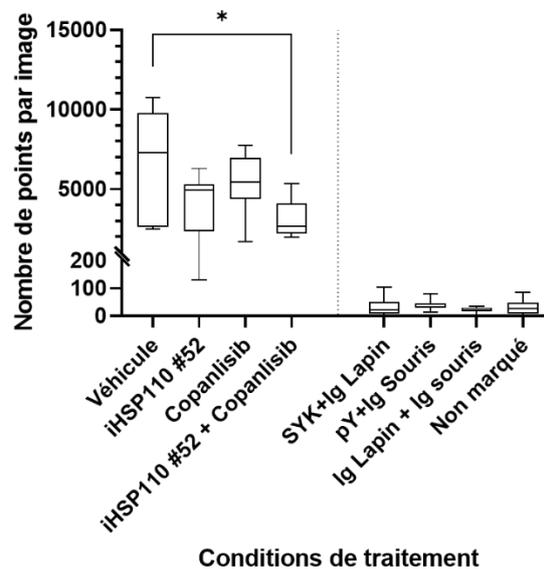


Figure 31 : Marquage immunohistochemique de phospho-SYK par PLA « Brightfield » sur tumeurs xéno greffées d'une lignée de lymphome humaine (TMD8, 15 millions de cellules en sous-cutané) sur souris NSG, traitées tous les deux jours avec inhibiteur d'HSP110 #52 (10mg/kg) et/ou avec copanlisib (5mg/kg). A J21, les souris sont mises à mort et les tumeurs ont été prélevées, fixées et incluses en bloc paraffine. Un tel marquage a été réalisé en faisant une PLA contre SYK totale et contre les phosphotyrosines

Pour conclure de manière générale sur cette partie 1, nous avons pu voir que l'inhibition d'HSP110 et l'inhibition de pan-PI3K impactait la viabilité de lignées cellulaires d'ABC-DLBCL, et la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe sur souris NSG. Nous avons aussi pu voir un effet accru de la co-inhibition lorsque nous comparons avec les mono-traitements sur ces mêmes paramètres. Nous expliquons cela grâce à des marquages par western blot, où les signalisations du BCR et PI3K/AKT semblent impactées plus efficacement en co-traitant les cellules, résultats qui par ailleurs se confirment *in vivo* par immunohistochimie. Pris ensemble, ces résultats semblent indiquer un intérêt thérapeutique à combiner notre inhibiteur d'HSP110 avec la copanlisib afin de potentialiser l'action de cette dernière et impacter efficacement la croissance tumorale.

Ces travaux ont fait l'objet d'une communication orale lors du 12^{ème} forum du Cancéropôle Grand-Est qui s'est tenu le 17 et 18 novembre 2021 à Dijon. Ces travaux ont aussi été présentés sous forme de poster au congrès international de « The European Hematology Association » (EHA) à Vienne du 9 au 12 juin 2022 (document en annexe).

Une revue en premier auteur a été réalisée dans le temps du projet concernant les HSPs dans les leucémies et lymphomes (document en annexe).

Partie 2 : Implication d'HSP110 dans le sous-type PMBL des lymphomes B diffus à grandes cellules

Genèse du projet

Le point de départ de ce projet d'étude de l'implication de HSP110 dans le PMBL provient d'un constat, réalisé sur une très petite cohorte de patients, chez qui le transcriptome a été étudié par puce à ARN. Les niveaux d'expression d'HSP110 ont été évalués par analyse ARN microarray **Figure 32**, où un seuil a été placé par nos collaborateurs afin de différencier deux populations : des patients exprimant fortement HSP110 (ligne bleue) et les patients avec une faible expression d'HSP110 (en rouge). Nous constatons en partie **Figure 32A** que la survie sans progression est bien plus importante chez les patients exprimant plus HSP110, constat que nous pouvons retrouver **Figure 32B**, avec une mortalité globale nulle chez les patients exprimant peu HSP110. C'est grâce à cette première analyse que l'idée d'étudier HSP110 dans ce lymphome a semblé pertinente, d'autant plus qu'une partie du travail de mon équipe d'accueil semblait montrer un intérêt d'étudier HSP110 dans l'ABC-DLBCL [2].

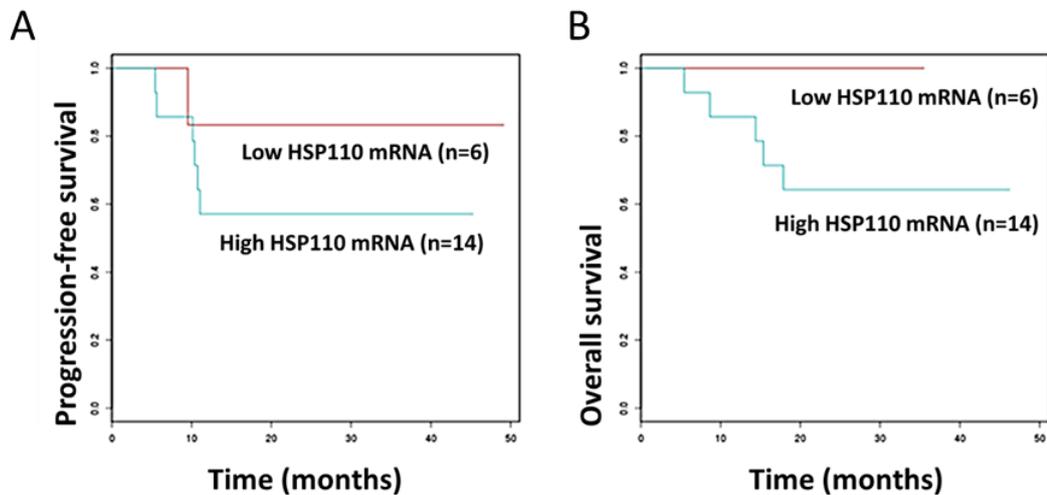


Figure 32 : Etude de l'expression d'HSP110 sur une cohorte de patients atteints de PMBL qui possèdent une faible quantité d'ARNm HSP110 (en rouge) et qui possèdent une forte quantité d'ARNm HSP110 (en bleu), niveaux évalués par ARN microarray. **En A :** survie sans progression des patients en fonction du temps. **En B :** survie globale des patients en fonction du temps.

Dans le sens où il était connu dans l'équipe que HSP110 pouvait interagir avec XPO1 dans le cancer colorectal [97], que XPO1 est retrouvée mutée E571K dans environ 25% des cas de PMBL chez les patients [140] et que STAT6, une protéine majeure de la signalisation dans le PMBL est un cargo d'XPO1 [67], une première partie du travail réalisée dans ce projet « Implication d'HSP110 dans le sous-type PMBL des lymphomes B diffus à grandes cellules » a été de valider dans le PMBL les affirmations ci-dessus et d'expliquer la nature de la relation entre HSP110 et XPO1.

Localisation subcellulaire d'HSP110 dans les cellules de PMBL

Puisque nous allons nous intéresser plus tard à XPO1, responsable de l'export de nombreuses protéines, un travail préliminaire a été de connaître dans les lignées de PMBL la localisation subcellulaire d'HSP110. Ainsi, deux expériences différentes sur deux lignées cellulaires de PMBL ont été mises en place pour visualiser cette protéine.

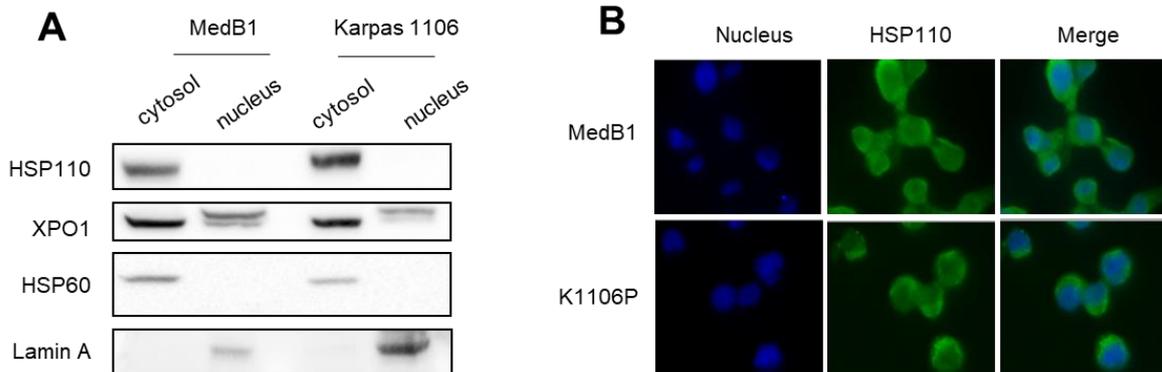


Figure 33 : Etude de la localisation subcellulaire d'HSP110 dans deux lignées de PMBL, K1106P et MedB1. En A : Isolements cytoplasmes-noyaux réalisés et visualisés par western blot, avec en contrôle cytoplasmique HSP60 et en contrôle nucléaire la lamine A. **En B :** Marquage d'HSP110 réalisés par immunofluorescence sur cellules fixées et perméabilisées

Tout d'abord, **Figure 33A**, un isolement cytoplasmes-noyaux a été réalisé sur deux lignées de PMBL, Karpas1106P (K1106P, ou K1106) et MedB1 dont les résultats sont visualisables par western blot. Nous validons dans un premier temps l'efficacité de l'isolement avec les contrôles HSP60 (cytoplasmique) et Lamine A (nucléaire). Nous voyons aussi que HSP110 est présente dans les deux lignées, et que sa localisation est essentiellement cytoplasmique. L'absence de bandes au niveau du cytoplasme ne veut pas dire qu'il n'y a pas d'HSP110 nucléaire, seulement que le western blot ne permet pas de la détecter. Nous pouvons néanmoins conclure à une présence essentiellement cytoplasmique d'HSP110. Pour ce qui est d'XPO1, nous constatons une présence à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des deux lignées de PMBL. Ce n'est pas étonnant, car XPO1 exporte des protéines du noyau vers le cytoplasme, et doit être réimporter ensuite. C'est une dynamique, il était bien attendu de voir ces résultats. Pour ce qui est de la **Figure 33B**, il s'agit d'un marquage par immunofluorescence d'HSP110 dans les deux mêmes lignées de PMBL. Nous pouvons voir un marquage d'HSP110 qui semble être dans toute la cellule, avec toutefois des quantités plus importantes dans le cytoplasme.

Ainsi, à première vue HSP110 possède une localisation subcellulaire plutôt cytoplasmique, avec des quantités très faible dans le noyau. XPO1 quant à elle se trouve à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, même si les expériences d'isolements cytoplasmes-noyaux ne permettent pas de nous dire dans quelle proportion. Mais puisqu'à priori les deux protéines fréquentent les mêmes

compartiments cellulaires, et au vu de l'interaction entre HSP110 et XPO1 déjà observée dans le cancer colorectal, nous allons nous intéresser par la suite à confirmer cette interaction dans le PMBL.

Interaction entre HSP110 et XPO1

Pour atteindre ce but, deux types d'expériences ont été mises en place. Tout d'abord, comme d'écrit dans la partie « genèse du projet » et dans l'introduction, XPO1 est mutée E571K dans 25% des patients atteints de PMBL [140]. Il est donc très important de prendre en compte cette mutation pour nos expériences d'interactions, d'autant plus que la mutation E571K est connue pour altérer l'interactome de XPO1 [140]. Nos lignées de PMBL possèdent un statut mutationnel de XPO1 différent : K1106P est homozygote (WT/WT) et MedB1 est hétérozygote (WT/E571K). Tout d'abord, par tests de ligature de proximité (PLA), nous pouvons voir **Figure 34A** et **Figure 34B** qu'il y a des quantités de points détectables dans les conditions XPO1 et BRCA1 dans les deux lignées de PMBL, correspondant à notre contrôle positif d'interaction, et quelques point épars dans les conditions HSP110 et BRCA1 qui correspondent à notre contrôle négatif d'interaction. Nous pouvons observer dans les conditions XPO1 et HSP110 des quantités de points largement supérieures par rapport aux conditions XPO1 et BRCA1, impliquant alors une proximité très forte entre HSP110 et XPO1, et ce quelles que soient les lignées utilisées, et donc quel que soit le statut mutationnel de XPO1. Pour confirmer l'interaction, des co-immunoprécipitations du tag mCherry ont été réalisées dans la lignée HEK293 co-transfectées avec HSP110-GFP, XPO1^{WT}-mCherry ou XPO1^{E571K}-mCherry et les résultats sont visualisés par western blot **Figure 34C**. Nous pouvons constater que le tag mCherry de la protéine XPO1-mCherry a été efficacement immunoprécipité, avec une absence dans les pistes contrôles. Nous voyons que HSP110-GFP a été efficacement co-immunoprécipité dans les deux western blot, impliquant que quel que soit le statut mutationnel de XPO1, HSP110-GFP interagit avec. Ces données confirment la PLA obtenue précédemment.

Ainsi, nous venons de voir que HSP110 interagit avec XPO1 mutée et non-mutée. Les HSPs et les exportines possèdent toutes deux un très vaste interactome : les HSPs chaperonnent leurs clients, tandis que les exportines exportent leurs cargos. La suite du travail consiste ici à comprendre la nature de la relation entre HSP110 et XPO1. HSP110 chaperonne-t-elle XPO1, ou bien HSP110 est un cargo de XPO1, ou bien les deux ?

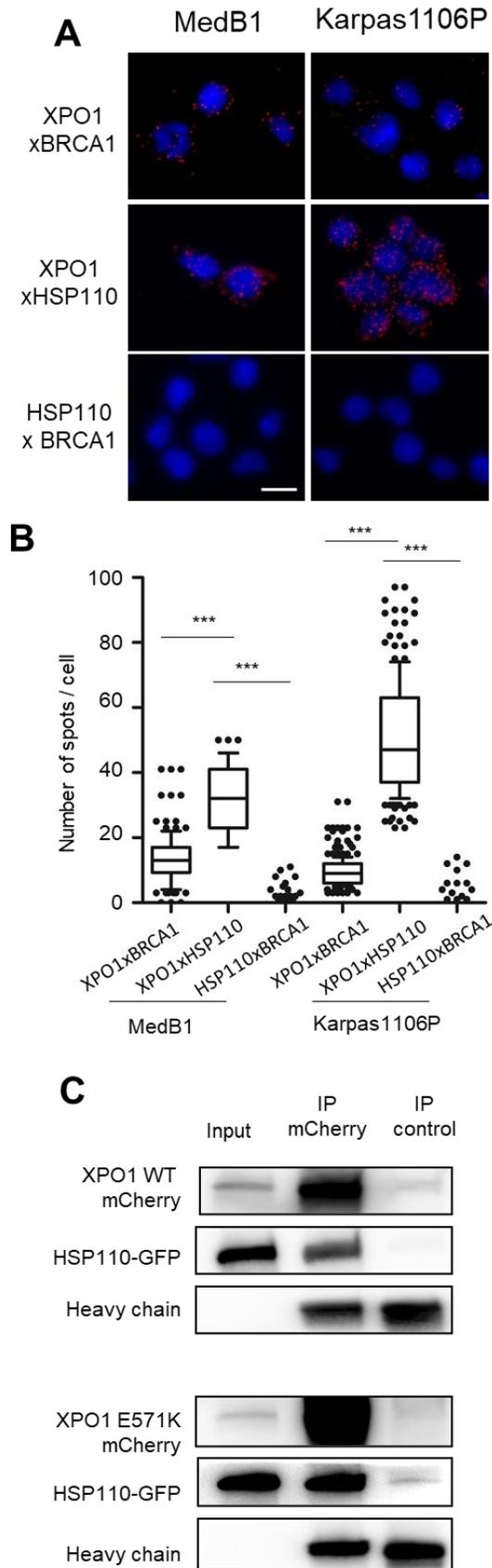


Figure 34 : Etude de l'interaction entre HSP110 et XPO1. En A et B : Tests de ligature de proximité entre HSP110 et XPO1 (avec BRCA1, contrôle positif d'interaction avec XPO1 et contrôle négatif d'interaction avec HSP110) sur lignées K1106P (XPO1 WT) et MedB1 (XPO1 E571K). **En C :** co-immunoprécipitations entre HSP110 et XPO1^{WT} et XPO1^{E571K} sur lignées HEK293 transfectées avec HSP110-GFP et XPO1^{WT}-mCherry ou XPO1^{E571K}-mCherry

La nature de la relation entre HSP110 et XPO1

Nous savons que HSP110 et XPO1 interagissent. Ainsi, pour comprendre la nature de cette interaction, un outil essentiel pour parvenir à cette fin est le selinexor, ou KPT-330. Il s'agit d'un inhibiteur spécifique de XPO1, et son utilisation empêche les cargos de cette exportine de sortir du noyau [141]. Donc, des expériences d'isolement cytoplasmes-noyaux ont été réalisées sur lignées K1106P (**Figure 35A**) et HEK293 (**Figure 35B**), traitées pendant 4 heures avec 1 μ M de selinexor.

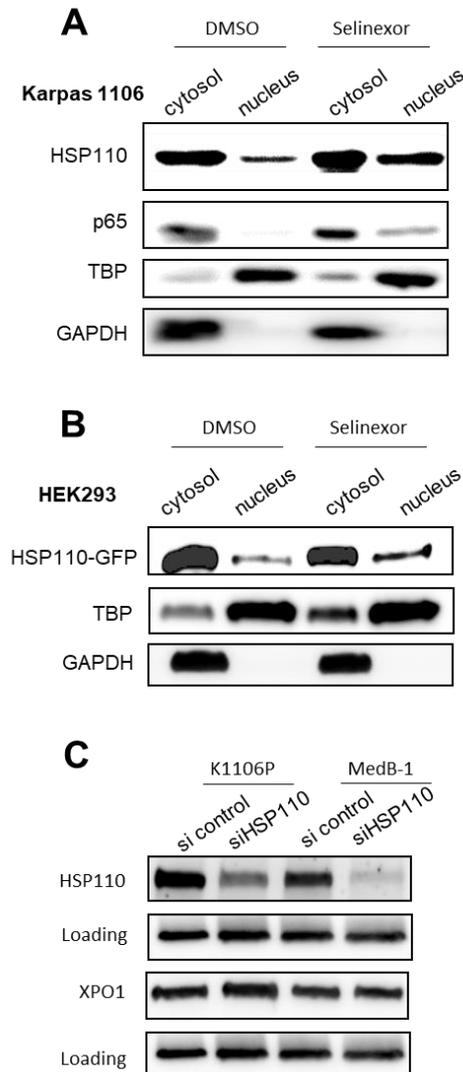


Figure 35 : Etude de la nature de l'interaction entre HSP110 et XPO1. En A : isolement cytoplasmes-noyaux réalisé sur la lignée K1106P traitées avec 1 μ M de selinexor pendant 4h et visualisé par western blot. p65 est un contrôle du blocage de l'export, la TATA-box Binding Protein est un contrôle cytoplasmique, et la GAPDH est un contrôle nucléaire. En B : isolement cytoplasmes-noyaux réalisé sur la lignée HEK293, transfectée avec HSP110-GFP et traitées avec 1 μ M de selinexor pendant 4h, et visualisé par western blot. En C : expérience d'électroporation de K1106P et MedB1 avec 1nmol de siARN HSP110 et visualisé par western blot.

Nous validons dans la lignée K1106P (**Figure 35A**) le blocage de l'export de p65, un des éléments constitutifs de NF- κ B, par le selinexor. Il est très bien connu que p65 est un cargo de XPO1 [142], cela nous permet de confirmer l'inhibition de XPO1. Cela se matérialise par la présence d'une

bande dans la piste « noyaux » avec le selinexor. Lorsque nous regardons cette fois-ci HSP110, nous voyons dans la condition contrôle qu'il y a une petite proportion d'HSP110 nucléaire, proportion qui semble plus grande lorsque nous comparons avec la condition selinexor. En regardant cette fois-ci HEK293 (**Figure 35B**), nous pouvons tirer les mêmes conclusions, avec une hausse du marquage HSP110 dans le noyau des cellules traitées avec selinexor. Ainsi, en empêchant le fonctionnement normal de XPO1, HSP110 se trouve restreinte dans le noyau, semblant alors indiquer que HSP110 est un cargo de cette exportine. Pour évaluer si HSP110 est un chaperon de XPO1, des expériences d'interférence ARN ont été effectuées par électroporation sur K1106P et MedB1 **Figure 35C**. Dans un premier temps, nous validons l'interférence ARN, car les quantités d'HSP110 sont plus faibles avec siARN HSP110. Lorsque nous nous intéressons aux quantités de XPO1, nous voyons alors qu'il n'y a aucun changement. Cela semble indiquer que quels que soient les niveaux d'HSP110 cellulaires, les quantités d'XPO1 restent inchangées, et que donc HSP110 ne chaperonne pas XPO1.

Nous comprenons maintenant quelle est la relation entre HSP110 et XPO1. HSP110 chaperonne de nombreux clients, et certains d'entre eux sont importés dans le noyau. C'est par exemple le cas du facteur de transcription STAT3 [6]. Nous pouvons en déduire qu'HSP110 peut donc avoir besoin d'être exporté vers le cytoplasme, et l'ensemble des expériences réalisées jusqu'ici semblent nous montrer que c'est XPO1 qui s'en charge.

Implication de STAT6 pour la suite du projet

Comme dit précédemment, il est connu qu'HSP110 peut chaperonner des facteurs de transcription, et c'est notamment le cas de STAT3 dans le cancer colorectal. Récemment, il a été montré par des expériences d'immunofluorescence et de PLA que STAT6, une molécule de signalisation majeure dans la signalisation du PMBL, est un cargo d'XPO1 [67]. Pour confirmer cela, une expérience de co-immunoprécipitation (**Figure 36**) a été réalisée sur une lignée HEK293 transfectée stablement pour permettre la surexpression de STAT6, et sur la lignée MedB1 de PMBL. Nous confirmons sur le western blot de l'immunoprécipitation que STAT6 a été capturée dans la condition IP STAT6, et que XPO1 a bien été co-immunoprécipitée. Ainsi, par une technique différente de ce qui a été déjà publié, nous observons l'interaction entre XPO1 et STAT6.

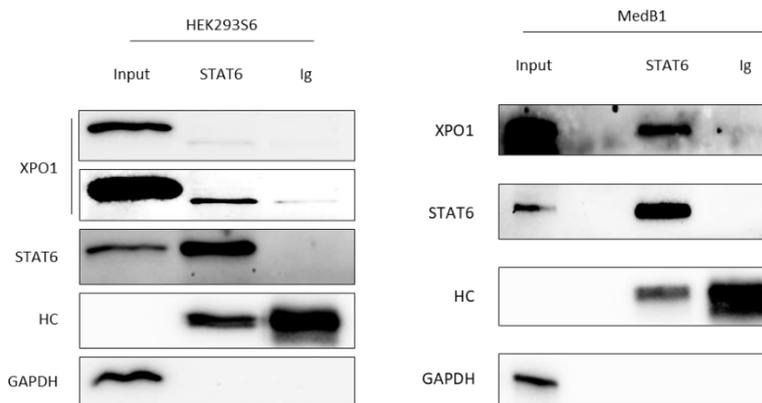


Figure 36 : Immunoprécipitation de STAT6 dans un modèle HEK293 modifiée pour surexpression de STAT6 (alors nommée HEK293S6) et sur MedB1, montrant l'interaction entre STAT6 et XPO1.

Pour la suite du projet, nous avons vu que HSP110 et STAT6 possèdent un partenaire commun, XPO1, et il est déjà connu que HSP110 interagit avec STAT3 dans le cancer colorectal [6]. Nous nous sommes demandé ainsi si une interaction entre HSP110 et STAT6 existe, et impliquée dans la voie de signalisation majeure JAK2/STAT6/XPO1 du PMBL. La poursuite de ce travail sera discutée plus tard.

Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à la rédaction d'une publication, dont je suis le 5^{ème} auteur. Cette publication porte sur la mutation E571K de l'exportine 1 et son rôle dans le PMBL. Cette publication se trouve en annexe du document de thèse. En effet, le gène XPO1 code pour l'exportine 1 (XPO1) qui contrôle l'export nucléaire de protéines et d'ARN cargo. Près de 25 % des cas de lymphomes B médiastinaux primaires (PMBL) et de lymphomes hodgkiniens classiques (cHL) présentent une mutation ponctuelle récurrente de XPO1 (NM_003400, chr2:g61718472C>T) entraînant la substitution E571K dans le sillon hydrophobe de la protéine, le site de fixation du cargo. Le cargo d'une exportine correspond aux protéines pouvant être prises en charge par l'exportine pour être exportée du noyau au cytoplasme. Dans cet article, l'impact de la mutation XPO1^{E571K} est étudiée en utilisant des cellules de PMBL et de cHL ayant différents statuts mutationnels de XPO1 et des cellules éditées par CRISPR-Cas9 dans lesquelles la mutation E571K a été introduite ou retirée. La conclusion de cet article est que la mutation ne modifiait pas la capacité d'exportation mais plutôt la localisation subcellulaire de XPO1 elle-même. En effet, XPO1^{E571K} est plutôt cytosolique comparé à XPO1^{WT}.

Partie 3 : HSP110 dans les petites vésicules extracellulaires, potentiel biomarqueur des DLBCLs ?

Genèse du projet

Nous avons pu voir dans la partie 1 des résultats de ce manuscrit que HSP110 est très fortement exprimée dans l'ABC-DLBCL et soutient la survie et la prolifération des cellules, mais aussi la croissance tumorale. Une idée qui a germé pendant cette étude est d'étudier l'expression d'HSP110 en fonction du développement des DLBCLs chez les patients, ainsi qu'en fonction de réponses aux traitements. L'intérêt est de déterminer si HSP110 pourrait être un marqueur du développement d'un DLBCL et de la réponse précoce à la chimiothérapie. De nombreuses études semblent montrer que les HSPs peuvent être libérées directement dans le sang sous forme libre [143], mais aussi dans des vésicules extra-cellulaires nommées exosomes [144]. Les exosomes font partie des petites vésicules extra-cellulaires (PVECs), et peuvent contenir et porter à leurs membranes de nombreux éléments : des lipides, du matériel génétique, mais aussi des protéines entre autres-choses [145]. Dans cette troisième partie, nous avons caractérisé ces PVECs de lignées cellulaires de DLBCLs et de patients atteints de DLBCLs, ainsi que leur expression d'HSP110.

Etablissement du profil d'expression d'HSP110, de la localisation d'HSP110 dans les cellules de DLBCL et de la présence d'HSP110 dans les PVECs

La première étape dans ce travail a été de vérifier les niveaux d'expression d'HSP110 dans plusieurs lignées de DLBCLs. Nous pouvons voir **Figure 37A** qu'HSP110 est exprimée globalement de la même façon dans toutes les lignées, à l'exception de U2932, qui en exprime moins. Ainsi, HSP110 est exprimée dans toutes les lignées de DLBCLs testées, que ce soient de l'ABC (HBL1, SU-DHL2, OCI-LY3, TMD8 et U2932), du GC (SU-DHL4) ou du PMBL (U2940). Une des façons les plus faciles d'expliquer la présence d'une protéine dans les exosomes est de regarder sa présence dans la membrane plasmique [145]. Ainsi, des isollements cytoplasmes-membranes ont été réalisés sur certaines lignées d'ABC et de PMBL **Figure 37B**. Nous constatons tout d'abord un isolement réussi, avec de faibles contaminations de la part des autres fractions. Nous n'observons pas d'HSP110 dans la membrane plasmique, du moins pas à des niveaux suffisants pour être détectables par western blot. Ces expériences semblent montrer des niveaux d'HSP110 totale et d'HSP110 cytoplasmique identiques. Par ailleurs, nous pouvons voir que c'est dans la lignée où HSP110 est le plus faiblement exprimée que HSP70 est la plus exprimée, et quasiment exclusivement dans le cytoplasme. Ainsi, si HSP110 peut se retrouver dans les exosomes de manière détectable par western blot, alors son origine sera au moins majoritairement intracellulaire. Des isollements de PVECs ont été effectués par ultracentrifugation et les résultats sont observables par western blot **Figure 37C**. Plusieurs témoins positifs exosomaux (TSG-101, CD63, Flotilin-1, CD9 et CD81)

sont visibles, et des témoins négatifs ne sont présents que dans un dépôt de lignée cellulaire (gp96, BCL-XL et TOMM20). Nous pouvons constater des quantités différentes d'HSP110 parmi les exosomes de lignées d'ABC (HBL1, SU-DHL2, OCI-LY3, TMD8 et U2932) et de GC (B593), mais néanmoins détectables. Nous savons maintenant qu'HSP110 est présente dans plusieurs lignées de DLBCLs, et que son origine est à priori cytoplasmique. Cela nous permet de nous intéresser cette fois-ci à la présence d'HSP110 et HSP70 dans les PVECs des patients atteints de DLBCLs.

Détection des différentes HSPs dans les PVECs isolées à partir de plasmas de patients atteints de DLBCLs au moment du diagnostic

Nous savons maintenant que HSP110 se trouve dans les PVECs de lignées de DLBCLs. Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux PVECs plasmatiques de patients avec DLBCLs. Nous voyons dans la **Figure 38A** que les marqueurs exosomaux sont bien présents dans les préparations exosomales des patients, et les marqueurs négatifs (BCL-XL et gp96) ne le sont pas. Nous remarquons sur la **Figure 38B** que HSP110 est exprimée de façon homogène chez les 3 patients, et que HSP70 est plutôt hétérogène dans son expression, même si elle est tout de même présente chez les 3 patients. Ainsi, de la même façon que dans les lignées cellulaires, nous avons la preuve qu'HSP110, ainsi qu'HSP70 sont bien présentes dans les PVECs de patients.

Nous avons poursuivi cette étude en lien avec le service d'hématologie clinique du CHU de Dijon afin de quantifier HSP110 dans le serum et les PVECs sériques de patients atteints de DLBCL. Les exosomes ont été purifiés par ultracentrifugation puis caractérisés par technologie NTA (NanoTracking Analysis, ou analyse du suivi individuel de particules). Enfin, les quantités d'HSP110 ont été mesurées par ELISA. Ces résultats sont en cours d'analyse en lien avec la clinique.

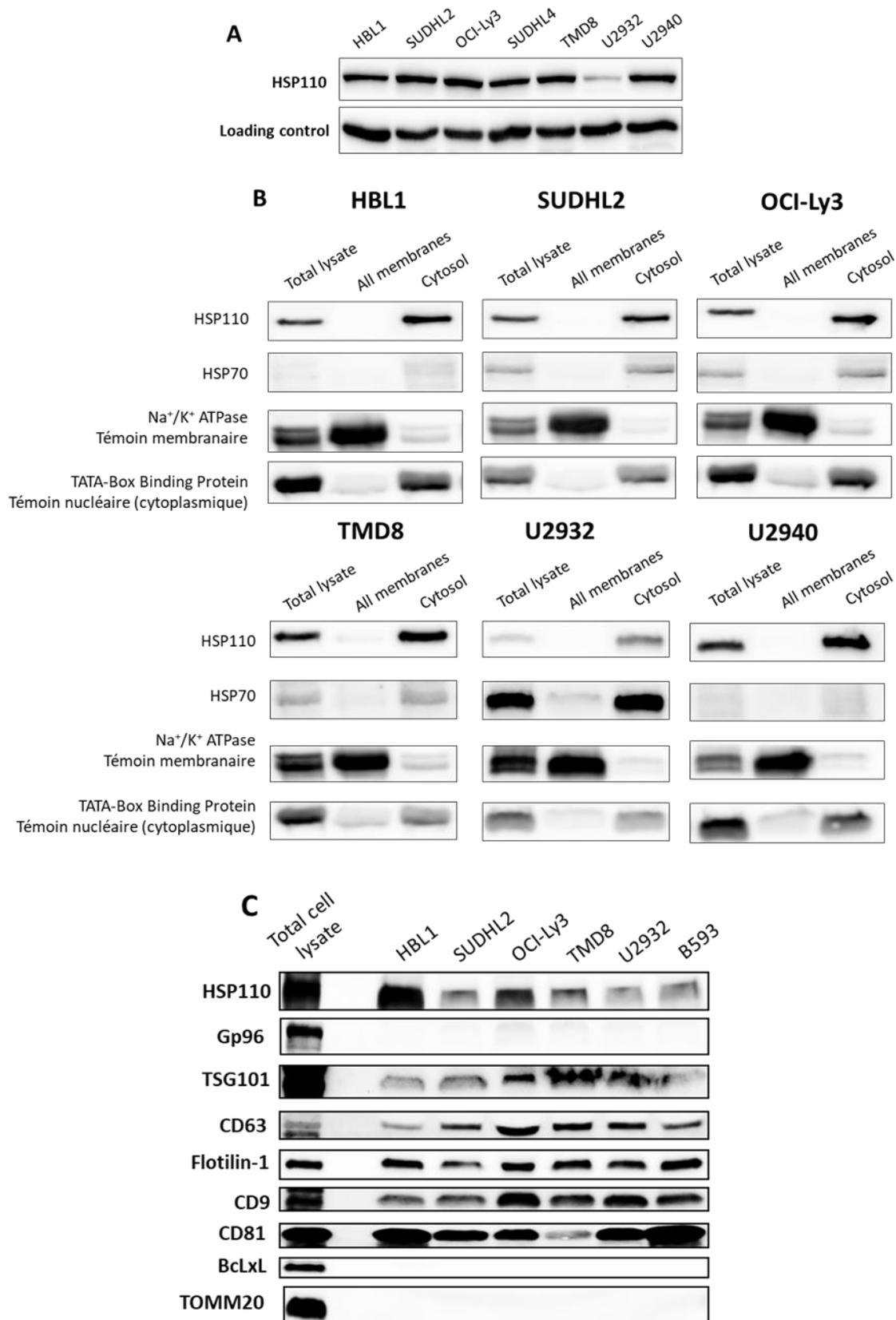


Figure 37 : Etude de la localisation et du profil d'expression d'HSP110 dans les lignées de lymphomes et dans les PVECs. HBL1, SU-DHL2, OCI-LY3, TMD8 et U2932 sont des lignées d'ABC, SU-DHL4 et B593 sont des lignées de GC-DLBCL et U2940 est une lignée de PMBL. En A : profil d'expression d'HSP110 par différentes lignées humaines de DLBCL visualisé par western blot. En B : Isollements cytoplasmes-membranes sur différentes lignées de DLBCL visualisés par western blot. En C : Profil d'expression d'HSP110 et de différents marqueurs exosomaux pour confirmer l'isolement des PVECs

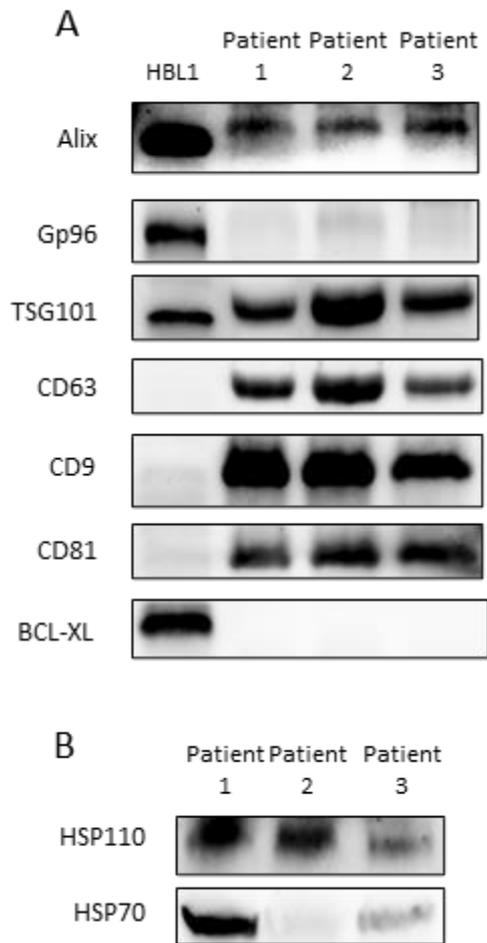


Figure 38 : Isolements de PVECs de patients atteints de DLBCLs au moment du diagnostic visualisés par western blot. En A : marqueurs exosomaux contrôlant la qualité de l'isolement, avec une lignée cellulaire d'ABC-DLBCL (HBL1) en contrôle. En B : Marquages par western blot des échantillons de PVECs précédemment isolées

Discussion

Concernant l'ABC-DLBCL

Le travail réalisé dans ce manuscrit de thèse présente l'inhibition d'HSP110 comme possédant un intérêt thérapeutique dans le traitement des lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC. En effet, HSP110 est impliquée dans la viabilité, la survie, la prolifération des lignées cellulaire, et dans la croissance tumorale. Pour expliquer cela, un partenaire d'HSP110 a été identifié dans la voie du BCR, et l'utilisation d'un de nos inhibiteur d'HSP110 a montré une réduction de l'activité kinase de SYK, ainsi qu'une perte d'interaction avec HSP110, menant à une baisse globale de la signalisation du BCR, expliquant la baisse des paramètres phénotypiques précédemment évoqués, à la fois *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo*. L'interaction d'HSP110 avec MyD88 a également été confirmée, et l'inhibition de ce chaperon mène à une diminution dans cette interaction, qui avait été montrée comme importante dans le maintien des signaux de survie [2]. De plus, en combinant l'inhibition d'HSP110 avec l'inhibition de pan-PI3K par la copanlisib, il y a une potentialisation de cette molécule employée en thérapie ciblée, avec notamment des effets visibles *in cellulo* sur la viabilité, et *in vivo* sur la croissance tumorale, pouvant être expliqués par des baisses dans les quantités de certaines phosphoprotéines majeures dans la signalisation cellulaire (**Figure 39**). Ainsi, ajouter l'inhibition de cette HSP dans le traitement de l'ABC-DLBCL semble intéressant, et les inhibiteurs développés montrent des effets seuls, mais semblent aussi soutenir une thérapie déjà existante utilisée dans le traitement de certains lymphomes B.

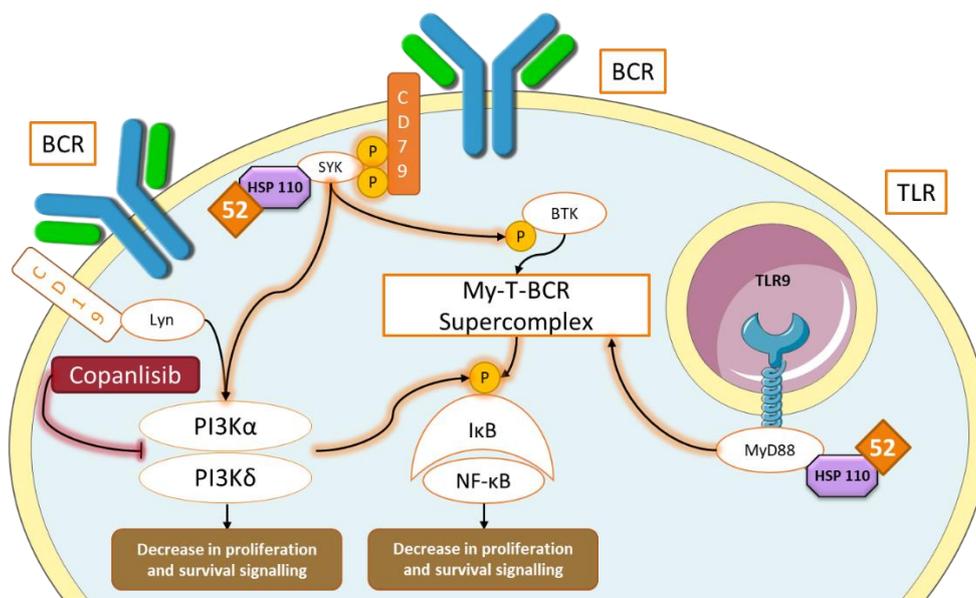


Figure 39 : Schéma de conclusion de la partie résultat concernant l'ABC-DLBCL du manuscrit de thèse, montrant une cellule d'ABC-DLBCL dans des conditions de co-inhibition d'HSP110 et PI3K, montrant les cibles des inhibiteurs comment ils impactent la signalisation globale.

Même si ce travail peut sembler avancé dans l'étude et l'inhibition de l'interaction entre HSP110 et SYK, de nombreux points restent à améliorer, notamment dans les modèles vivants employés et dans les combinaisons de traitements possibles avec nos inhibiteurs d'HSP110.

Etude globale de la signalisation cellulaire

Pour comprendre les effets observés *in cellulo* et *in vitro*, plusieurs kinases ainsi que leurs versions phosphorylées ont été étudiées. Ceci a été observé par western blot, mais seulement quelques-unes de ces kinases ont été étudiées. Ce qui aurait été optimal, c'est une étude phosphoprotéomique du contenu cellulaire des lignées traitées avec inhibiteurs d'HSP110 et contrôle. Ainsi, l'impact de l'inhibition sur la signalisation aurait été global, et il aurait sûrement été possible de voir les répercussions sur les phosphoprotéines du supercomplexe My-T-BCR.

Pour visualiser la translocation nucléaire de NF- κ B (p65 et p50), événement qui survient suite à la phosphorylation d'I κ B par le supercomplexe My-T-BCR, des isollements cytoplasmes-noyaux auraient pu être faits. En traitant avec les inhibiteurs d'HSP110, il aurait été possible de voir s'il y avait translocation ou non, ce qui aurait complété ce qui a déjà été fait en termes de phosphorylations.

Un partenaire d'HSP110, la kinase SYK, a été identifié, et celle avec MyD88 a été confirmée. Mais rien ne dit qu'il s'agit des deux seuls partenaires de ce chaperon. Par définition, les chaperons moléculaires protègent et interagissent avec un nombre conséquent de protéines pour leur rôles généraux de stabilisation, de repliement ou de désassemblage les amas, mais aussi pour des rôles plus spécifiques. Notamment des rôles de maintien d'une protéine dans une voie de signalisation (ce qui est le cas d'HSP110 pour MyD88) mais aussi des rôles de soutien pour l'activité d'une protéine (ce qui est le cas d'HSP110 pour SYK). Il aurait été intéressant d'étudier les échantillons d'immunoprécipitation d'HSP110 par étude protéomique, par rapport à une immunoglobuline contrôle. En s'intéressant à la signalisation du BCR, plusieurs autres partenaires d'HSP110 auraient pu être repérés ; pour aller plus loin, en condition d'inhibition d'HSP110, les pertes d'interaction auraient pu être observables et quantifiables pour une concentration d'inhibiteurs d'HSP110 donnée.

De manière générale, le travail réalisé ne permet de savoir dans quelle mesure les inhibiteurs d'HSP110 impactent de manière générale le transcriptome. Puisque l'inhibition d'HSP110 diminue les quantités cellulaires de BCL2 et BCL-XL, il aurait pu être intéressant de s'intéresser à d'autres oncogènes majeurs impliqués dans les DLBCL, qui auraient été visibles par l'analyse du RNAseq. L'implication d'autres oncogènes tels que c-Myc ou encore BCL6 par exemple auraient pu être révélée. Également, il est naturel de penser que, puisque l'étude porte sur un chaperon moléculaire, seuls les niveaux protéiques des différents partenaires d'HSP110 seront impactés. Cependant, certaines preuves vont dans le sens d'une régulation de la stabilisation des ARN messagers par certains membres

de la superfamille d'HSP70, notamment HSP110, HSP72 et HSC70 [146], [147]. Ainsi, par étude transcriptomique, il aurait été possible de voir si HSP110 avait un rôle de la stabilisation d'ARNm, notamment de protéines impliquées dans la signalisation du BCR.

Une des plus grosses critiques concernant l'outil principal de ce travail, c'est-à-dire nos inhibiteurs d'HSP110, c'est que ceux-ci doivent s'utiliser à des concentrations qui ne sont pas compatibles avec des traitements thérapeutiques. Pour comparaison, la copanlisib utilisée dans ce manuscrit s'utilise à 125nM maximum, contre 5µM pour notre inhibiteur d'HSP110. Bien sûr, ils sont spécifiques et leurs actions ont été mise en évidence par des tests *in vitro* de repliement de luciférase dénaturée par la chaleur [7]. Mais des concentrations élevées riment souvent avec des effets non ciblés (off-target), c'est pourquoi les inhibiteurs employés dans ce manuscrit de thèse sont qualifiés de première génération. Des collaborations menées par le laboratoire d'accueil ont permis très récemment d'obtenir une deuxième génération d'inhibiteur, encore plus spécifique et efficace, qui semblent permettre de réduire les doses employées, notamment *in vivo*.

Une grande limitation technique concernant l'étude de l'inhibition d'HSP110 a été les marquages de phospho-SYK sur sa tyrosine 352. Il existe 3 phosphorylations majeures de SYK : la tyrosine 323, la tyrosine 352 et les tyrosines 525/526. Bien que la mutation en Y323 semble particulièrement intéressante dans d'autres cancers du sang tels que la leucémie aigüe myéloblastique [148], c'est surtout la phosphorylation Y352 qu'il a été choisi d'étudier, par son implication dans la leucémie lymphoïde chronique, les lymphomes folliculaires, les lymphomes à cellules du manteau et surtout les DLBCLs [149]. Les tyrosines Y525/526 quant à elles sont trans-autophosphorylées, et dépendent donc d'au moins une des deux phosphorylations évoquées précédemment. Pour l'immunohistochimie, l'étude de la phosphorylation Y352 n'est pas simple, il existe fondamentalement peu d'anticorps sur le marché pouvant la reconnaître et la majorité d'entre eux ne sont validés que pour l'étude en western blot. C'est une des raisons pour laquelle phospho-SYK n'est montrée que par cette technique dans ce manuscrit. De très nombreuses tentatives de mise au point de marquages immunohistochimiques de phospho-SYK Y352 ont été effectuées, notamment en travaillant avec une plateforme d'imagerie sans pouvoir catégoriquement valider les marquages. Une des plus grosses problématiques de ce marquage repose sur le fait que SYK et une autre protéine kinase de la même famille, nommée ZAP70, sont tellement semblable que la séquence en acide-aminés autour de la phosphorylation Y352 est presque identique à la région autour de la phosphorylation Y319 de ZAP70. Même s'il est connu que ZAP70 est phosphorylée à cet endroit, surtout dans la signalisation du TCR [150], il n'est pas exclu d'en retrouver dans certains lymphomes B [149]. Pour lever cette limitation, des expériences de PLA entre les phosphotyrosines et SYK totales ont été effectuées. Il s'agit là d'une technique pleinement validée pour évaluer certaines modifications post-traductionnelles. Cela rend

compte de toutes les phosphorylations que SYK peut avoir, et ne peut donc pas nous permettre d'étudier exclusivement la phosphorylation Y352. Mais cela nous permet tout de même de connaître les niveaux globaux de phosphorylation de cette kinase, sans pour autant risquer d'aspécificité en détectant la phosphorylation d'une autre protéine à proximité de SYK [151]. Pour en revenir au western blot, il n'a pas été facile d'analyser cette kinase pour cette phosphorylation, car même si la majorité des anticorps du commerce sont validés pour cette application, la détection reste difficile, avec beaucoup d'aspécificité et un signal à la bonne masse moléculaire plutôt faible. C'est en étudiant en détail la protéine SYK (notamment son point isoélectrique) et en comprenant que les anticorps semblent mal la reconnaître que des tests ont été menés, notamment sur le tampon de transfert. En utilisant la formulation de Dunn [152], qui est à base de carbonate de soude et bicarbonate de soude, connu pour être basique (pH = 9,9) sans ajuster et pour partiellement renaturer les protéines lors du transfert, les marquages de phospho-SYK ont été bien plus faciles à obtenir. Enfin, beaucoup de marquages par cytométrie en flux ont été tentés sur différentes lignées d'ABC-DLBCL pour renforcer, mais malheureusement beaucoup des anticorps soi-disant validés pour phospho-SYK Y352 le sont en fait pour phospho-ZAP70 Y319, ne permettant pas d'avoir de marquage par cette technique. Tout ceci résume à quel point l'étude de phospho-SYK est difficile. Une chose qui aurait été possible de faire est d'étudier la ou les phosphorylation Y525 et Y526, qui sont un miroir de l'activité de SYK. Même si cette auto-transphosphorylation peut se faire à partir de Y323 et Y352, une idée globale de l'activité de cette enzyme, soutenue ou non par HSP110 en fonction des conditions de traitement, aurait pu être évaluée via ces phosphorylations.

Modèles d'étude de développement de lymphomes B agressifs

Dans ce travail, les modèles *vivo* ont été peu développés. En effet, les effets obtenus sur la viabilité et/ou sur la survie des cellules ont été confirmés sur un modèle de souris NSG xénotransplantées avec une lignée humaine, la lignée TMD8. Plusieurs reproches peuvent être faits sur ces expériences.

Lignées cellulaires

Seule la lignée TMD8 est employée. Mais il avait été prévu de renforcer ces données en utilisant une autre lignée, OCI-LY3. De nombreuses tentatives et optimisations ont été réalisées, dans le but d'avoir une croissance semblable à ce qu'on peut trouver dans certains articles. Notamment, dans « Specific covalent inhibition of MALT1 paracaspase suppresses B cell lymphoma growth » DOI : 10.1172/JCI99436 [153], il est possible de voir ce qu'une croissance normale d'OCI-LY3 doit donner dans un modèle NSG avec 5 millions de cellules par souris. Il est possible de comparer les croissances avec véhicules sur les **Figure 40A et B**. Il est clair que la lignée OCI-LY3 a tout simplement cessé de proliférer dès les premiers jours de la xénotransplantation dans le travail de ce manuscrit **Figure 40A**, n'atteignant pas les volumes tumoraux observés dans l'expérience **Figure 40B**, sans traitement.

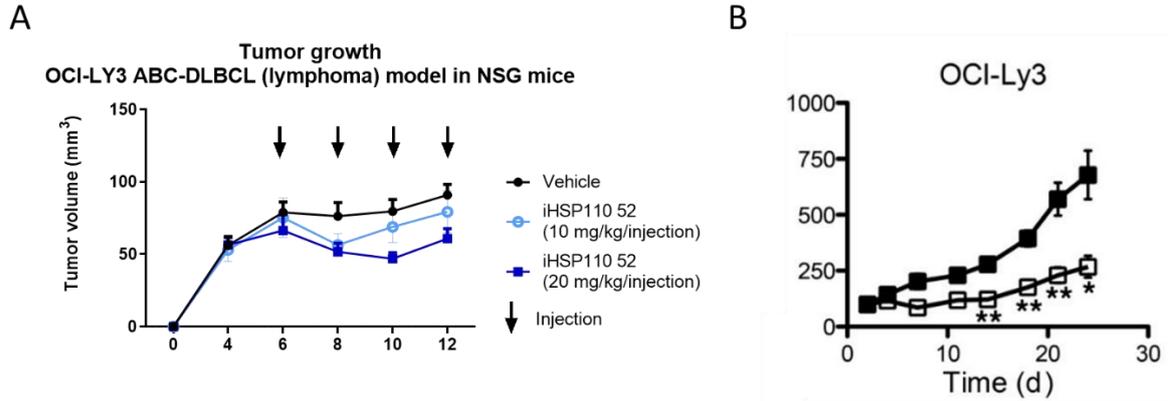


Figure 40 : Xénogreffes de lignée OCI-LY3 dans des souris NSG. A : Tentative réalisée de xénogreffer 15 millions d’OCI-LY3 pour soutenir les expériences déjà réalisées sur TMD8 dans ce manuscrit. Les traitements avec inhibiteur d’HSP110 #52 ont commencés à J6 et ont été faits tous les 2 jours en même temps que les mesures tumorales. Une première mesure à été réalisée à J4 (7 animaux par groupe). **B :** Partie de figure tirée de « Specific covalent inhibition of MALT1 paracaspase suppresses B cell lymphoma growth » DOI : 10.1172/JCI99436, montrant une croissance de 5 millions d’OCI-LY3 dans le même modèle animal en conditions non-traitées (carrés noirs) et avec un traitement (carrés blancs).

Ainsi, d’autres lignées humaines auraient pu être testées, en privilégiant les lignées pour lesquelles MyD88 est mutée L265P, notamment la lignée HBL1 connue pour se xénogreffer plus facilement. La lignée OCI-LY10 aurait également pu être testées, possédant la mutation MyD88^{L265P}, mais il est difficile de la faire proliférer et il aurait fallu du temps pour en avoir suffisamment avant xénogreffe, et d’autant plus de temps pour que la croissance commence. D’autres lignées d’ABC-DLBCL auraient eu beaucoup moins d’intérêt, comme SUD-HL2 mutées MyD88^{S222R}, qui est aussi une mutation activatrice de MyD88 mais dont l’effet est moindre devant celui de MyD88^{L265P} [154], ou encore U2932 qui possède un MyD88 sauvage (MyD88^{WT}).

Modèles animaux

Dans le travail présenté dans ce document de thèse, le seul modèle animal employé est la souris NSG. NSG signifie NOD scid gamma mouse, il s’agit du modèle animal immunodéficient le mieux décrit à l’heure actuelle [155]. Il s’agit d’un modèle général, employé surtout dans les expériences de xénogreffe de lignées, souvent par voie sous-cutanée par facilité. Ce modèle présente des avantages : sans système immunitaire, la xénogreffe peut prendre facilement, sans rejet, et il y est alors facile d’étudier les effets des traitements sur la croissance tumorale seulement. Les mesures des dimensions des tumeurs, mais aussi leur récupération après mise à mort est plutôt facile. Mais il y a de très nombreux inconvénients. Notamment, dans ce modèle, il n’y a pas d’immunosurveillance, ce qui ne rend pas compte de la réalité biologique derrière tout développement tumoral : en fonction du niveau de développement de la tumeur et des niveaux d’expression de certains points de contrôle immunitaires, le système immunitaire peut soit totalement éliminer la tumeur, soit maintenir un équilibre en maîtrisant le développement sans pour autant l’éliminer, soit ne pas interférer dans la croissance tumorale lorsque les cellules ont développé suffisamment de mécanismes pour échapper à

l'immunité. C'est pourquoi pour construire des preuves de l'efficacité d'un traitement à visée thérapeutique, il faut des modèles plus précis, ressemblant plus à ce qu'il est possible de trouver chez un patient. Il existe de nombreux modèles développés pour l'étude des leucémies et lymphomes. Pour ce qui est des DLBCLs, des modèles de lymphomes murins consistent à insérer le gène codant pour l'oncogène MYC (transgène E μ -MYC) directement après le promoteur du gène codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines. Cela mène à une surexpression dudit oncogène menant dans 100% des cas à des lymphomes B à des stades précoces de développement. Certains dont les cellules sont plutôt immatures ressemblent plus à des lymphomes de Burkitt, et d'autres plus différenciés ressemblent alors aux DLBCLs [156]. Une façon d'améliorer le développement de lymphomes agressifs en utilisant le même modèle est d'introduire la surexpression de l'oncogène RAS, accélérant alors la mise en place de la lymphomagenèse [156]. Un autre modèle qui a été généré en accouplant des souris BCR^{HEL}, qui possèdent le gène codant pour un BCR pré-arrangé reconnaissant le lysozyme d'œuf de poule (Hen Egg Lysozyme, HEL ou encore sHEL pour la forme soluble), permettant une signalisation du BCR plus active, avec des souris possédant le transgène E μ -MYC évoqué plus tôt. Ces souris développent des lymphomes partageant de nombreuses caractéristiques avec les leucémies lymphoïdes chroniques [157]. Mais avec injection de HEL (couplé à l'adjuvant de Freund), il est possible d'obtenir des lymphomes plus matures, passant par l'activation des cellules B en stimulant le BCR^{HEL}. Ce dernier modèle, nommé E μ -MYC/BCR^{HEL}/sHEL a été beaucoup utilisé pour l'étude d'inhibiteurs de SYK [156].

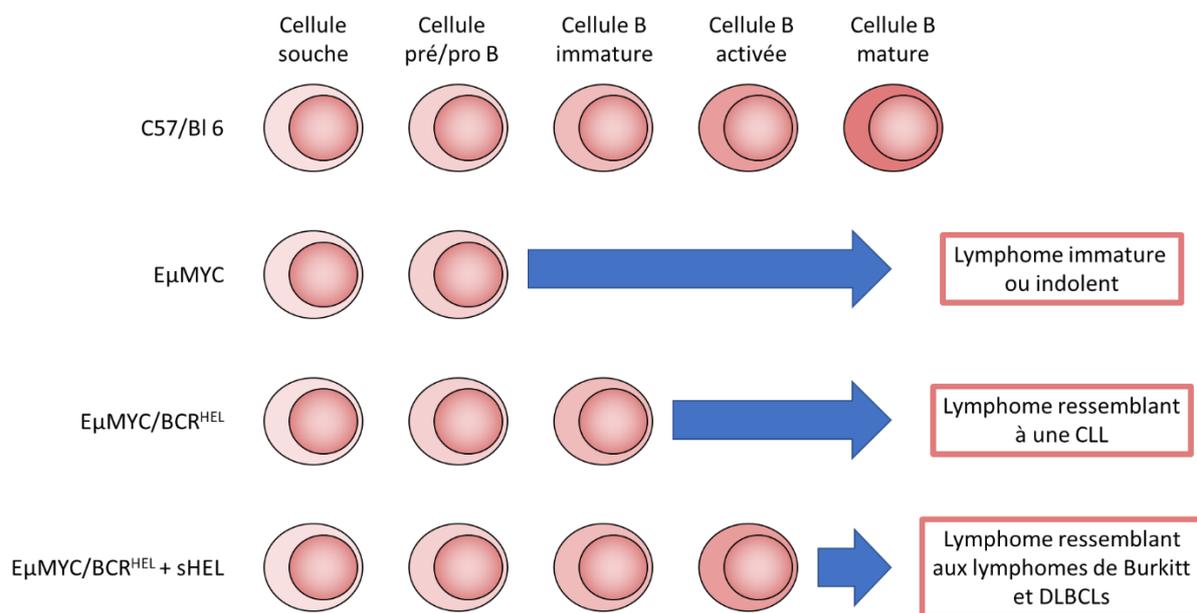


Figure 41 : Schéma adapté de « *Micromanagement of Lymphomas* » DOI : [10.1371/journal.pbio.0060156](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060156), montrant les stades de développement des lymphocytes B de souris impliqués dans la lymphomagenèse des différents modèles présentés jusqu'ici

Il existe d'autres modèles murins de développement de DLBCL. Pour obtenir un modèle ressemblant davantage à un ABC-DLBCL, le gène codant pour MyD88^{L265P} peut être inséré dans des

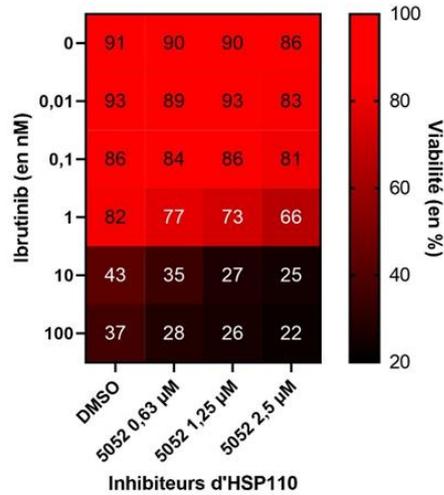
cellules B du centre germinatif. Les souris développent alors au bout de 60 semaines un lymphome diffus à grandes cellules, très agressif, imitant l'ABC-DLBCL qu'on pourrait trouver chez l'être humain [158].

Combinaisons possibles avec les inhibiteurs d'HSP110

Comme montré sur la **Figure 39**, nous avons co-inhibé HSP110 et PI3K, ce qui a eu pour effet une mort cellulaire accrue sur les lignées d'ABC-DLBCL (**Figure 27**) et sur la croissance tumorale (**Figure 28**). Pourtant l'effet obtenu n'a été qu'au moins additif, sans synergie évidente. Ceci est surprenant, puisqu'on impacte à la fois la partie CD19-Lyn, et la partie CD79-SYK de la voie du BCR. L'idée est venue d'un article, où la combinaison avec la copanlisib et l'ibrutinib (un inhibiteur spécifique de BTK) avait un effet synergique sur la viabilité des lignées d'ABC-DLBCL [61]. Une hypothèse possible est que puisque SYK est impliquée dans les deux parties de la voie, la simple inhibition d'HSP110 possède déjà un impact sur la partie CD79-SYK et CD19-Lyn, et que l'apport de l'inhibition de PI3K ne fait que renforcer l'effet d'une inhibition déjà en cours.

Une autre molécule, nommée ibrutinib, a également été testée en combinaison avec nos inhibiteurs d'HSP110. L'ibrutinib est un inhibiteur spécifique de BTK, une kinase proximale du BCR, et impacte directement cette signalisation [159]. L'ibrutinib est employé dans le traitement des lymphomes à cellules du manteau, mais aussi la leucémie lymphoïde chronique et la macroglobulinémie de Waldenström entre-autres. Des expériences préliminaires ont pu être réalisées en traitant la lignées TMD8 avec de l'ibrutinib, l'inhibiteur d'HSP110 #52 et en combinant les deux traitements. Nous pouvons voir **Figure 42A** qu'en traitant uniquement avec l'ibrutinib jusqu'à 10nM, il y a un impact modéré de l'ibrutinib sur la viabilité des cellules (environ 9%) et qu'en traitant uniquement avec #52 jusqu'à 2,5µM, il y a un impact faible sur la viabilité (environ 5%). Si l'effet n'était qu'additif, nous ne devrions observer qu'une baisse de 14% en combinaison, mais nous voyons une baisse de 25%, signifiant que l'effet est plus qu'additif. Nous pouvons voir **Figure 42B** que la survie des cellules traitées uniquement avec l'ibrutinib (couleur grise) ne baisse vraiment qu'à partir de 10nM. Cependant, avec le traitement 52 en combinaison, nous voyons une chute de la survie à 1nM d'ibrutinib, qui ne peut pas s'expliquer par l'emploi de #52 seul. Ainsi, il semblerait que l'utilisation de notre molécule #52 avec l'ibrutinib puisse être quelque chose d'intéressant à tester.

A Viabilité mesurée par CTG sur lignée TMD8 cotraitée avec inhibiteur #52 et ibrutinib sur 72h



B Marquage annexine V-FITC sur TMD8 parentales cotraitées avec 5052 et ibrutinib (24h prétraitement et 72h cotraitement)

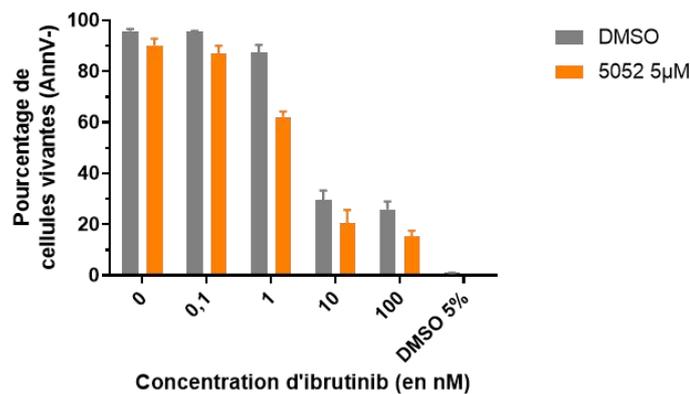


Figure 42 : Résultats préliminaires de la combinaison des inhibiteurs d'HSP110 (composé #52) et de BTK (ibrutinib). En A : expérience de CTG réalisée sur lignée TMD8 montrant l'impact de la co-inhibition pendant 72 heures sur la viabilité cellulaire. En B : marquage annexine V visualisé par cytométrie en flux sur la lignée TMD8 cotraitées pendant 72 heures.

Concernant le PMBL

Ce travail présenté dans la deuxième sous-partie de la partie résultats introduit HSP110 comme une cible d'intérêt pour un potentiel traitement du PMBL, sous-type très particulier des DLBCLs. En effet, HSP110 interagit avec XPO1 qui est déjà une cible thérapeutique. XPO1 est déjà ciblée par le selinexor (KPT330) et est utilisée en 3^{ème} ligne de traitement pour les DLBCL-NOS les plus résistants et pour les myélomes multiples.

Lignées cellulaires et modèles animaux

L'étude biologique et biochimique de ce lymphome rare présente de nombreuses limites vis-à-vis des modèles d'étude existant. Notamment, il n'existe que 3 lignées de PMBL, qui sont K1106P (ou Karpas 1106A, Karpas 1106P), MedB1 et U2940. Pour pallier ce problème, il est fréquent que les études

associent le lymphome de Hodgkin qui présente plusieurs caractéristiques communes. En effet, de la même façon que pour le PMBL, les HLs qui se développent dans le médiastin possèdent des voies de signalisation communes pour la survie et la prolifération, permettant par extrapolation alors d'étudier plus efficacement de nouveaux traitements pour le PMBL [160]. Il n'existe pas de modèles animaux pour l'étude du PMBL.

Suite du projet

Comme pour le travail présenté pour l'ABC-DLBCL, il conviendra de valider l'efficacité de nos inhibiteurs d'HSP110 sur la survie et la prolifération des lignées de PMBL et de HLs. Il faudra identifier le ou les clients d'HSP110 pour comprendre le mode d'action de la cytoprotection médiée par HSP110. Des cotraitements pourront être envisagés, notamment avec le selinexor ou encore le ruxolitinib (inhibiteur de JAK2) qui semble déjà avoir fait ses preuves sur lignées cellulaires [161].

Concernant HSP110 comme biomarqueur

Le travail présenté dans la dernière sous-partie des résultats de ce manuscrit constitue le début d'un travail visant à étudier HSP110 comme un biomarqueur de la lymphomagenèse et aussi comme marqueur de l'efficacité d'un traitement chez les patients. Sur lignées cellulaires de DLBCLs, nous avons pu voir que HSP110 était essentiellement cytoplasmique, et présents dans les exosomes de lignées. Nous avons également pu voir que cette HSP est aussi présente dans les exosomes de 3 patients au moment du diagnostic de la maladie.

Cela constitue une ébauche d'un travail bien plus large qui devra être poursuivi : en effet, la quantification précise des quantités d'HSP110 dans les exosomes de patients devra être effectuée par tests ELISA, et la corrélation avec les données cliniques (thérapies en cours, évolution du lymphome, réponse au traitement...) sera également nécessaire afin d'évaluer l'efficacité d'HSP110 comme biomarqueur.

En collaboration avec l'équipe CRIBL (Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations) de l'INSERM 1262, des isollements de PVECs à partir d'échantillons de sérum d'un modèle de souris développant spontanément un lymphome seront mis en place. Cela nous permettra d'étudier les quantités d'HSP110 sériques et des PVECs tout au long du développement tumoral.

Toute cette étude mènera plus tard à comprendre le rôle d'HSP110 contenu dans les PVECs dans le microenvironnement tumoral. En effet, les PVECs et notamment les exosomes peuvent fusionner leurs membranes à la membrane plasmique des cellules, permettant le partage de contenu [125]. Il est déjà connu que les exosomes d'origine tumorale peuvent remodeler le

microenvironnement tumoral [162], il conviendra alors d'étudier les cellules cibles des PVECs tumorales, et l'impact de l'HSP110 contenu dans ces PVECs sur lesdites cellules par cytométrie en flux. Cela pourrait se faire dans un modèle de xénogreffe de lymphome murin dans des souris avec un système immunitaire. Des PVECs de lignées de lymphome de souris pourraient être isolés, et injectés dans ces souris pour y voir l'immunomodulation médiée par les PVECs.

Conclusion générale

Les lymphomes diffus à grandes cellules représentent entre 30 et 40% des lymphomes non-Hodgkiniens chez l'adulte, il s'agit de l'hémopathie la plus représentée dans ce groupe. C'est un lymphome très agressif, et le sous-type activé possède la plus forte mortalité chez les patients avec moins de 40% de survie globale. Même si de nombreuses avancées scientifiques permettent d'améliorer le pronostic de ces patients, notamment avec l'ajout de rituximab (anticorps anti-CD20) dans les chimiothérapies, il est toujours possible de voir l'apparition de résistance ou tout simplement d'insensibilité aux traitements.

Une très grande partie de ce travail de thèse a été d'explorer l'efficacité des inhibiteurs d'HSP110. Ils apparaissent ainsi comme un outil qui pourraient être employés dans une visée thérapeutique du sous-type donnant le moins bon pronostic du lymphome agressif le plus fréquent chez l'adulte, le lymphome B diffus à grandes cellules de type activé. Je montre aussi que HSP110 est impliquée dans la voie de signalisation majeure JAK2/STAT6 du lymphome B primitif du médiastin, un variant spécifié des lymphomes B diffus à grandes cellules, sous-entendant un rôle important pour le développement de ce lymphome, ce qui en fait une cible intéressante pour le traitement. Enfin, je montre que HSP110 est présente dans les petites vésicules extracellulaires de lignées et chez les patients atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules, ce qui avec de futures investigations pourrait en faire un marqueur prédictif de l'apparition mais aussi de la sensibilité des patients aux traitements des patients.

Bibliographie

- [1] G. Jego, A. Hazoumé, R. Seigneuric, and C. Garrido, "Targeting heat shock proteins in cancer," *Cancer Lett.*, vol. 332, no. 2, pp. 275–285, May 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2010.10.014.
- [2] C. Boudesco *et al.*, "HSP110 sustains chronic NF- κ B signaling in activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma through MyD88 stabilization," *Blood*, vol. 132, no. 5, pp. 510–520, Aug. 2018, doi: 10.1182/blood-2017-12-819706.
- [3] C. Dorard *et al.*, "Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 10, pp. 1283–1289, Oct. 2011, doi: 10.1038/nm.2457.
- [4] A. Collura *et al.*, "Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability and Large Deletions in HSP110 T17 Have Improved Response to 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy," *Gastroenterology*, vol. 146, no. 2, pp. 401–411.e1, Feb. 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.054.
- [5] K. Berthenet *et al.*, "Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer," *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 7, p. e1170264, Jul. 2016, doi: 10.1080/2162402X.2016.1170264.
- [6] K. Berthenet *et al.*, "HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation," *Oncogene*, vol. 36, no. 16, pp. 2328–2336, Apr. 2017, doi: 10.1038/onc.2016.403.
- [7] G. J. Gozzi *et al.*, "Selecting the first chemical molecule inhibitor of HSP110 for colorectal cancer therapy," *Cell Death Differ.*, vol. 27, no. 1, pp. 117–129, May 2020, doi: 10.1038/s41418-019-0343-4.
- [8] L. R. Teras, C. E. DeSantis, J. R. Cerhan, L. M. Morton, A. Jemal, and C. R. Flowers, "2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 66, no. 6, pp. 443–459, Nov. 2016, doi: 10.3322/caac.21357.
- [9] R. A. Kyle *et al.*, "The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications," *Blood*, vol. 117, no. 6, pp. 2962–72, 2008, doi: 10.1182/blood-2007-10-078022.
- [10] S. Shanbhag and R. F. Ambinder, "Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 2, pp. 116–132, Mar. 2018, doi: 10.3322/caac.21438.
- [11] K. Farrell and R. F. Jarrett, "The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma," *Histopathology*, vol. 58, no. 1, pp. 15–25, Jan. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03705.x.
- [12] I. Hartlapp, C. Pallasch, G. Weibert, A. Kemkers, M. Hummel, and D. Re, "Depsipeptide induces cell death in Hodgkin lymphoma-derived cell lines," *Leuk. Res.*, vol. 33, no. 7, pp. 929–936, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.leukres.2008.12.013.
- [13] S. M. Ansell, "Hodgkin lymphoma: Diagnosis and treatment," in *Mayo Clinic Proceedings*, Nov. 2015, vol. 90, no. 11, pp. 1574–1583. doi: 10.1016/j.mayocp.2015.07.005.
- [14] J. O. Armitage, R. D. Gascoyne, M. A. Lunning, and F. Cavalli, "Non-Hodgkin lymphoma," *Lancet*, vol. 390, no. 10091, pp. 298–310, 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32407-2.
- [15] M. Al-Hamadani, T. M. Habermann, J. R. Cerhan, W. R. Macon, M. J. Maurer, and R. S. Go, "Non-Hodgkin lymphoma subtype distribution, geodemographic patterns, and survival in the US: A longitudinal analysis of the National Cancer Data Base from 1998 to 2011," *Am. J. Hematol.*, vol. 90, no. 9, pp. 790–795, Sep. 2015, doi: 10.1002/ajh.24086.
- [16] G. Gualco, C. E. Klumb, G. N. Barber, L. M. Weiss, and C. E. Bacchi, "Pediatric lymphomas in Brazil," *Clinics*, vol. 65, no. 12, pp. 1267–1278, 2010, doi: 10.1590/S1807-59322010001200008.

- [17] S. Löw, C. H. Han, and T. T. Batchelor, "Primary central nervous system lymphoma," *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, vol. 11. SAGE Publications Ltd, Jan. 01, 2018. doi: 10.1177/1756286418793562.
- [18] A. Re, C. Cattaneo, and G. Rossi, "HIV and lymphoma: From epidemiology to clinical management," *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, vol. 11, no. 1. Universita Cattolica del Sacro Cuore, 2019. doi: 10.4084/mjhid.2019.004.
- [19] S. T. Chen, J. Barnes, and L. Duncan, "Primary cutaneous B-cell lymphomas- clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment," *Semin. Cutan. Med. Surg.*, vol. 37, no. 1, pp. 49–55, Mar. 2018, doi: 10.12788/j.sder.2018.014.
- [20] A. E. Quesada, L. J. Medeiros, M. W. Clemens, M. C. Ferrufino-Schmidt, S. Pina-Oviedo, and R. N. Miranda, "Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: a review," *Modern Pathology*, vol. 32, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 166–188, Feb. 01, 2019. doi: 10.1038/s41379-018-0134-3.
- [21] S. M. Ansell, "Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 90, no. 8, pp. 1152–1163, 2015, doi: 10.1016/j.mayocp.2015.04.025.
- [22] N. Sukswai, K. Lyapichev, J. D. Houry, and L. J. Medeiros, "Diffuse large B-cell lymphoma variants: an update," *Pathology*, vol. 52, no. 1. pp. 53–67, 2020. doi: 10.1016/j.pathol.2019.08.013.
- [23] A. A. Alizadeh *et al.*, "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling," *Nature*, vol. 403, no. 6769, pp. 503–511, 2000, doi: 10.1038/35000501.
- [24] F. Cabanillas and B. Shah, "Advances in Diagnosis and Management of Diffuse Large B-cell Lymphoma," *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, vol. 17, no. 12. pp. 783–796, 2017. doi: 10.1016/j.clml.2017.10.007.
- [25] C. P. Hans *et al.*, "Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray," *Blood*, vol. 103, no. 1, pp. 275–282, Jan. 2004, doi: 10.1182/blood-2003-05-1545.
- [26] S. Li, K. H. Young, and L. J. Medeiros, "Diffuse large B-cell lymphoma," *Pathology*, vol. 50, no. 1, pp. 74–87, 2018, doi: 10.1016/j.pathol.2017.09.006.
- [27] Y. Liu and S. K. Barta, "Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment," *American Journal of Hematology*, vol. 94, no. 5. Wiley-Liss Inc., pp. 604–616, May 04, 2019. doi: 10.1002/ajh.25460.
- [28] R. D. Morin, S. E. Arthur, and D. J. Hodson, "Molecular profiling in diffuse large B-cell lymphoma: why so many types of subtypes?," *British Journal of Haematology*, vol. 196, no. 4. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 814–829, Feb. 01, 2022. doi: 10.1111/bjh.17811.
- [29] E. S. Jaffe, "Navigating the cutaneous B-cell lymphomas: avoiding the rocky shoals," *Mod. Pathol.*, vol. 33, no. 1, pp. 96–106, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41379-019-0385-7.
- [30] M. Dominis, S. Débro, S. Gašparov, A. Pešut, and R. Kušec, "Diffuse large B-cell lymphoma and its variants," *Croat. Med. J.*, vol. 43, no. 5, pp. 535–540, 2002, doi: 10.1201/b16685-13.
- [31] A. Dabrowska-Iwanicka and J. A. Walewski, "Primary mediastinal large B-cell lymphoma.," *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, vol. 9, no. 3, pp. 273–83, Sep. 2014, doi: 10.1007/s11899-014-0219-0.
- [32] K. Rajewsky, "Affinity Maturation," in *Encyclopedia of Immunology*, Elsevier, 1998, pp. 52–54. doi: 10.1006/rwei.1999.0014.
- [33] T. Yamano, M. Steinert, and L. Klein, "Thymic B Cells and Central T Cell Tolerance.," *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 376, Jul. 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00376.

- [34] B. Csernus *et al.*, “Mutational analysis of IgVH and BCL-6 genes suggests thymic B-cells origin of mediastinal (Thymic) B-cell lymphoma,” *Leuk. Lymphoma*, vol. 45, no. 10, pp. 2105–2110, Oct. 2004, doi: 10.1080/1042819042000219467.
- [35] W. H. Carr, I. L. Weissman, K. Akashi, L. I. Richie, and T. Miyamoto, “B Lymphopoiesis in the Thymus,” *J Immunol J. Immunol.*, vol. 164, pp. 5221–5226, 2000, doi: 10.4049/jimmunol.164.10.5221.
- [36] J. Perera, L. Meng, F. Meng, and H. Huang, “Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 42, pp. 17011–6, Oct. 2013, doi: 10.1073/pnas.1313001110.
- [37] J. Perera and H. Huang, “The development and function of thymic B cells.,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 14, pp. 2657–63, Jul. 2015, doi: 10.1007/s00018-015-1895-1.
- [38] L. Pasqualucci and R. Dalla-Favera, “The Genetic Landscape of Diffuse Large B-Cell Lymphoma,” *Seminars in Hematology*, vol. 52, no. 2. W.B. Saunders, pp. 67–76, Apr. 01, 2015. doi: 10.1053/j.seminhematol.2015.01.005.
- [39] G. Lenz and L. M. Staudt, “Aggressive lymphomas,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 362, no. 15, pp. 1417–1429, 2010, doi: 10.1056/NEJMra0807082.
- [40] I. S. Lossos *et al.*, “Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 18, pp. 10209–10213, Aug. 2000, doi: 10.1073/pnas.180316097.
- [41] J. D. Phelan *et al.*, “A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma,” *Nature*, vol. 560, no. 7718, pp. 387–391, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0290-0.
- [42] J. Iqbal *et al.*, “Genomic signatures in B-cell lymphoma: How can these improve precision in diagnosis and inform prognosis?,” *Blood Rev.*, vol. 30, no. 2, pp. 73–88, 2016, doi: 10.1016/j.blre.2015.08.002.
- [43] J. Perera *et al.*, “Self-Antigen-Driven Thymic B Cell Class Switching Promotes T Cell Central Tolerance,” *Cell Rep.*, vol. 17, no. 2, pp. 387–398, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.011.
- [44] M. Reth and P. Nielsen, “Signaling circuits in early B-cell development,” *Adv. Immunol.*, vol. 122, pp. 129–175, Jan. 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-800267-4.00004-3.
- [45] V. Seda and M. Mraz, “B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells,” *European Journal of Haematology*, vol. 94, no. 3. pp. 193–205, 2015. doi: 10.1111/ejh.12427.
- [46] L. I. Pao and J. C. Cambier, “Syk, but not Lyn, Recruitment to B Cell Antigen Receptor and Activation Following Stimulation of CD45- B Cells,” *J. Immunol.*, vol. 158, no. 6, 1997.
- [47] J. R. Bedsaul *et al.*, “Mechanisms of regulated and dysregulated CARD11 signaling in adaptive immunity and disease,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. SEP. Frontiers Media S.A., p. 2105, Sep. 19, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.02105.
- [48] S. Gerondakis and U. Siebenlist, “Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function.,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 2, no. 5. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010. doi: 10.1101/cshperspect.a000182.
- [49] C. M. Buchta and G. A. Bishop, “Toll-like receptors and B cells: Functions and mechanisms,” *Immunol. Res.*, vol. 59, no. 1–3, pp. 12–22, 2014, doi: 10.1007/s12026-014-8523-2.
- [50] T. Kawai, O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira, “Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin,” *Immunity*, vol. 11, no. 1, pp. 115–122, 1999, doi: 10.1016/S1074-7613(00)80086-2.

- [51] O. Takeuchi, K. Takeda, K. Hoshino, O. Adachi, T. Ogawa, and S. Akira, "Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades," *Int. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 113–117, 2000, doi: 10.1093/INTIMM/12.1.113.
- [52] S. Goulopoulou, C. G. McCarthy, and R. Clinton Webb, "Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within," *Pharmacol. Rev.*, vol. 68, no. 1, p. 142, 2016, doi: 10.1124/PR.114.010090.
- [53] E. J. Pone, H. Zan, J. Zhang, A. Al-Qahtani, Z. Xu, and P. Casali, "Toll-like Receptors and B-cell Receptors Synergize to Induce Immunoglobulin Class Switch DNA Recombination: Relevance to Microbial Antibody Responses," *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 30, no. 1, p. 1, 2010, doi: 10.1615/CRITREVIMMUNOL.V30.I1.10.
- [54] M. Kuraoka *et al.*, "BCR and Endosomal TLR Signals Synergize to Increase AID Expression and Establish Central B Cell Tolerance," *Cell Rep.*, vol. 18, no. 7, p. 1627, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.CELREP.2017.01.050.
- [55] E. Schweighoffer, J. Nys, L. Vanes, N. Smithers, and V. L. J. Tybulewicz, "TLR4 signals in B lymphocytes are transduced via the B cell antigen receptor and SYK," *J. Exp. Med.*, vol. 214, no. 5, pp. 1269–1280, May 2017, doi: 10.1084/JEM.20161117.
- [56] C. Visco, I. Tanasi, F. M. Quaglia, I. Ferrarini, C. Fraenza, and M. Krampera, "Oncogenic Mutations of MYD88 and CD79B in Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Implications for Clinical Practice," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 10, pp. 1–15, Oct. 2020, doi: 10.3390/CANCERS12102913.
- [57] Z. Z. Xu *et al.*, "Activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in diffuse large B cell lymphoma: Clinical significance and inhibitory effect of rituximab," *Ann. Hematol.*, vol. 92, no. 10, pp. 1351–1358, 2013, doi: 10.1007/s00277-013-1770-9.
- [58] M. Pfeifer and G. Lenz, "PI3K/AKT addiction in subsets of diffuse large B-cell lymphoma," *Cell Cycle*, vol. 12, no. 21. Taylor & Francis, pp. 3347–3348, Nov. 11, 2013. doi: 10.4161/cc.26575.
- [59] D. C. Otero, S. A. Omori, and R. C. Rickert, "CD19-dependent activation of Akt kinase in B-lymphocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 2, pp. 1474–1478, 2001, doi: 10.1074/jbc.M003918200.
- [60] L. Chen *et al.*, "SYK Inhibition Modulates Distinct PI3K/AKT- Dependent Survival Pathways and Cholesterol Biosynthesis in Diffuse Large B Cell Lymphomas," *Cancer Cell*, vol. 23, no. 6, pp. 826–838, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2013.05.002.
- [61] J. Paul *et al.*, "Simultaneous Inhibition of PI3K δ and PI3K α Induces ABC-DLBCL Regression by Blocking BCR-Dependent and -Independent Activation of NF- κ B and AKT," *Cancer Cell*, vol. 31, no. 1, pp. 64–78, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2016.12.003.
- [62] A. J. Brooks and T. Putoczki, "Jak-stat signalling pathway in cancer," *Cancers*, vol. 12, no. 7. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), pp. 1–3, Jul. 01, 2020. doi: 10.3390/cancers12071971.
- [63] W. Wang, L. Wang, and B. Zha, "The roles of STAT6 in regulating B cell fate, activation, and function," *Immunol. Lett.*, vol. 233, pp. 87–91, May 2021, doi: 10.1016/J.IMLET.2021.02.006.
- [64] C. Guiter *et al.*, "Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma," *Blood*, vol. 104, no. 2, pp. 543–549, 2004, doi: 10.1182/blood-2003-10-3545.
- [65] E. Viganò *et al.*, "Somatic IL4R Mutations in Primary Mediastinal Large B-cell lymphoma lead to constitutive JAK-STAT signaling activation.," *Blood*, vol. 131, no. 18, pp. 2036–2046, Feb. 2018, doi: 10.1182/blood-2017-09-808907.
- [66] I. Melzner *et al.*, "Biallelic deletion within 16p13.13 including SOCS-1 in Karpas1106P

- mediastinal B-cell lymphoma line is associated with delayed degradation of JAK2 protein," *Int. J. Cancer*, vol. 118, no. 8, pp. 1941–1944, Apr. 2006, doi: 10.1002/ijc.21485.
- [67] H. Miloudi, K. Leroy, F. Jardin, and B. Sola, "STAT6 is a cargo of exportin 1: Biological relevance in primary mediastinal B-cell lymphoma," ;, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.CELLSIG.2018.02.016.
- [68] F. Ritossa, "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila," *Experientia*, vol. 18, no. 12, pp. 571–573, Dec. 1962, doi: 10.1007/BF02172188.
- [69] H. Saibil, "Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 14, no. 10. Nature Publishing Group, pp. 630–642, Sep. 12, 2013. doi: 10.1038/nrm3658.
- [70] J. L. Brodsky, S. Hamamoto, D. Feldheim, and R. Schekman, "Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic hsc70," *J. Cell Biol.*, vol. 120, no. 1, pp. 95–102, 1993, doi: 10.1083/jcb.120.1.95.
- [71] R. P. Beckmann, L. A. Mizzen, and W. J. Welch, "Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly," *Science (80-.)*, vol. 248, no. 4957, pp. 850–854, 1990, doi: 10.1126/science.2188360.
- [72] D. Lanneau, G. Wettstein, P. Bonniaud, and C. Garrido, "Heat shock proteins: Cell protection through protein triage," *TheScientificWorldJournal*, vol. 10. ScientificWorldJournal, pp. 1543–1552, Aug. 03, 2010. doi: 10.1100/tsw.2010.152.
- [73] A. Ali, S. Bharadwaj, R. O'Carroll, and N. Ovsenek, "HSP90 Interacts with and Regulates the Activity of Heat Shock Factor 1 in Xenopus Oocytes," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 9, pp. 4949–4960, Sep. 1998, doi: 10.1128/mcb.18.9.4949.
- [74] L. Whitesell and S. L. Lindquist, "HSP90 and the chaperoning of cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 10, pp. 761–772, Oct. 2005, doi: 10.1038/NRC1716.
- [75] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [76] I. R. Watson, K. Takahashi, P. A. Futreal, and L. Chin, "Emerging patterns of somatic mutations in cancer," *Nature Reviews Genetics*, vol. 14, no. 10. Nat Rev Genet, pp. 703–718, Oct. 2013. doi: 10.1038/nrg3539.
- [77] J. Gobbo *et al.*, "Restoring Anticancer Immune Response by Targeting Tumor-Derived Exosomes With a HSP70 Peptide Aptamer," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 108, no. 3, Mar. 2016, doi: 10.1093/jnci/djv330.
- [78] Y. Kaneko, H. Nishiyama, K. Nonoguchi, H. Higashitsuji, M. Kishishita, and J. Fujita, "A novel hsp110-related gene, apg-1, that is abundantly expressed in the testis responds to a low temperature heat shock rather than the traditional elevated temperatures.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 5, pp. 2640–5, Jan. 1997, Accessed: Nov. 24, 2017. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006898>
- [79] M. Okui *et al.*, "Expression of APG-2 protein, a member of the heat shock protein 110 family, in developing rat brain," *Neurochem. Int.*, vol. 36, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0197-0186(99)00095-9.
- [80] T. Held *et al.*, "Heat-shock protein HSPA4 is required for progression of spermatogenesis," *Reproduction*, vol. 142, no. 1, pp. 133–144, Jul. 2011, doi: 10.1530/REP-11-0023.
- [81] X. Y. Wang and J. R. Subjeck, "High molecular weight stress proteins: Identification, cloning and utilisation in cancer immunotherapy," *Int. J. Hyperth.*, vol. 29, no. 5, pp. 364–375, Aug. 2013, doi: 10.3109/02656736.2013.803607.

- [82] T. Liu, C. K. Daniels, and S. Cao, "Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential," *Pharmacol. Ther.*, vol. 136, no. 3, pp. 354–374, 2012, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.08.014.
- [83] R. U. H. Mattoo, S. K. Sharma, S. Priya, A. Finka, and P. Goloubinoff, "Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 29, pp. 21399–21411, 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.479253.
- [84] J. Shorter, "The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0026319.
- [85] H. Rampelt *et al.*, "Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation," *EMBO J.*, vol. 31, no. 21, pp. 4221–4235, Nov. 2012, doi: 10.1038/EMBOJ.2012.264.
- [86] J. Wu, T. Liu, Z. Rios, Q. Mei, X. Lin, and S. Cao, "Heat Shock Proteins and Cancer," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 38, no. 3, pp. 226–256, 2017, doi: 10.1016/j.tips.2016.11.009.
- [87] Y. Saito, N. Yamagishi, and T. Hatayama, "Different localization of Hsp105 family proteins in mammalian cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 313, no. 17, pp. 3707–3717, Oct. 2007, doi: 10.1016/J.YEXCR.2007.06.009.
- [88] T. Yamane *et al.*, "Hsp105 α suppresses Adriamycin-induced cell death via nuclear localization signal-dependent nuclear accumulation," *J. Cell. Biochem.*, vol. 120, no. 10, pp. 17951–17962, Oct. 2019, doi: 10.1002/JCB.29062.
- [89] M. Kai, T. Nakatsura, H. Egami, S. Senju, Y. Nishimura, and M. Ogawa, "Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors.," *Oncol. Rep.*, vol. 10, no. 6, pp. 1777–1782, Nov. 2003, doi: 10.3892/or.10.6.1777.
- [90] T. S. Hwang *et al.*, "Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer," *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 18, no. 6, pp. 690–700, Jun. 2003, doi: 10.1046/J.1440-1746.2003.03011.X.
- [91] O. Slaby *et al.*, "Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression," *Oncol. Rep.*, vol. 21, no. 5, pp. 1235–1241, 2009, doi: 10.3892/OR_00000346.
- [92] A. Das *et al.*, "Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration," *American Journal of Pathology*, vol. 185, no. 10, Am J Pathol, pp. 2596–2606, Oct. 01, 2015. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.06.001.
- [93] N. Yu *et al.*, "HSP105 Recruits Protein Phosphatase 2A To Dephosphorylate β -Catenin," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 8, pp. 1390–1400, Apr. 2015, doi: 10.1128/MCB.01307-14.
- [94] S. Hosaka, T. Nakatsura, H. Tsukamoto, T. Hatayama, H. Baba, and Y. Nishimura, "Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo," *Cancer Sci.*, vol. 97, no. 7, pp. 623–632, Jul. 2006, doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00217.x.
- [95] T. Hatayama, N. Yamagishi, E. Minobe, and K. Sakai, "Role of hsp105 in Protection against Stress-Induced Apoptosis in Neuronal PC12 Cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 288, no. 3, pp. 528–534, Nov. 2001, doi: 10.1006/bbrc.2001.5802.
- [96] N. Yamagishi, K. Ishihara, Y. Saito, and T. Hatayama, "Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 312, no. 17, pp. 3215–3223, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.yexcr.2006.06.007.
- [97] S. Z. Causse *et al.*, "HSP110 translocates to the nucleus upon genotoxic chemotherapy and

- promotes DNA repair in colorectal cancer cells," *Oncogene*, vol. 38, no. 15, pp. 2767–2777, 2019, doi: 10.1038/s41388-018-0616-2.
- [98] H. Takahashi *et al.*, "Identification of an overexpressed gene, HSPA4L, the product of which can provoke prevalent humoral immune responses in leukemia patients," *Exp. Hematol.*, vol. 35, no. 7, pp. 1091–1099, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.exphem.2007.03.015.
- [99] K. Gotoh *et al.*, "Apg-2 has a chaperone-like activity similar to Hsp110 and is overexpressed in hepatocellular carcinomas," *FEBS Lett.*, vol. 560, no. 1–3, pp. 19–24, Feb. 2004, doi: 10.1016/S0014-5793(04)00034-1.
- [100] J. G. Facciponte, X. Y. Wang, and J. R. Subjeck, "Hsp110 and Grp170, members of the Hsp70 superfamily, bind to scavenger receptor-A and scavenger receptor expressed by endothelial cells-1," *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 8, pp. 2268–2279, Aug. 2007, doi: 10.1002/EJ.200737127.
- [101] K. Ozawa *et al.*, "150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 10, pp. 6397–6404, Mar. 1999, doi: 10.1074/JBC.274.10.6397.
- [102] K. Ozawa *et al.*, "Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport," *J. Clin. Invest.*, vol. 108, no. 1, pp. 41–50, Jul. 2001, doi: 10.1172/jci11772.
- [103] T. Miyagi *et al.*, "Antitumor effect of reduction of 150-kDa oxygen-regulated protein expression on human prostate cancer cells," *Int. J. Urol.*, vol. 9, no. 10, pp. 577–585, Oct. 2002, doi: 10.1046/J.1442-2042.2002.00519.X.
- [104] H. Asahi, K. Koshida, O. Hori, S. Ogawa, and M. Namiki, "Immunohistochemical detection of the 150-kDa oxygen-regulated protein in bladder cancer," *BJU Int.*, vol. 90, no. 4, pp. 462–466, Sep. 2002, doi: 10.1046/J.1464-410X.2002.02915.X.
- [105] R. Zappasodi *et al.*, "Serological identification of HSP105 as a novel non-Hodgkin lymphoma therapeutic target," *Blood*, vol. 118, no. 16, pp. 4421–4430, Oct. 2011, doi: 10.1182/blood-2011-06-364570.
- [106] R. Zappasodi *et al.*, "HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma," *Blood*, vol. 125, no. 11, pp. 1768–1771, Mar. 2015, doi: 10.1182/blood-2014-07-590034.
- [107] J. Niu *et al.*, "Prognostic value of MYD88 L265P mutation in diffuse large B cell lymphoma via droplet digital PCR," *Mol. Med. Rep.*, vol. 22, no. 2, pp. 1243–1256, Aug. 2020, doi: 10.3892/MMR.2020.11186/DOWNLOAD.
- [108] B. Coiffier *et al.*, "CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, no. 4, pp. 235–242, Jan. 2002, doi: 10.1056/nejmoa011795.
- [109] C. Haioun *et al.*, "Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 protocol--a groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte study," *J. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. 16, pp. 3025–30, Aug. 2000, doi: 10.1200/JCO.2000.18.16.3025.
- [110] B. Coiffier *et al.*, "Rituximab (Anti-CD20 Monoclonal Antibody) for the Treatment of Patients With Relapsing or Refractory Aggressive Lymphoma: A Multicenter Phase II Study," *Blood*, vol. 92, no. 6, pp. 1927–1932, Sep. 1998, doi: 10.1182/BLOOD.V92.6.1927.
- [111] P. McLaughlin *et al.*, "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program," *J. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 8, pp. 2825–2833, 1998, doi: 10.1200/JCO.1998.16.8.2825.

- [112] J. M. Foran *et al.*, “European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. 2, pp. 317–324, 2000, doi: 10.1200/JCO.2000.18.2.317.
- [113] M. S. Czuczman *et al.*, “Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 17, no. 1, pp. 268–276, 1999, doi: 10.1200/JCO.1999.17.1.268.
- [114] J. M. Vose *et al.*, “Phase II study of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin’s lymphoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 2, pp. 389–397, Jan. 2001, doi: 10.1200/JCO.2001.19.2.389.
- [115] B. Coiffier and C. Sarkozy, “Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do?,” *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.*, vol. 2016, no. 1, pp. 366–378, 2016, doi: 10.1182/ASHEDUCATION-2016.1.366.
- [116] F. Frontzek, I. Karsten, N. Schmitz, and G. Lenz, “Current options and future perspectives in the treatment of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma,” *Therapeutic Advances in Hematology*, vol. 13. SAGE Publications, 2022. doi: 10.1177/20406207221103321.
- [117] M. S. Czuczman *et al.*, “A phase 2/3 multicenter, randomized, open-label study to compare the efficacy and safety of lenalidomide versus investigator’s choice in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, no. 15, pp. 4127–4137, Aug. 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2818.
- [118] N. Jain *et al.*, “Targeting phosphatidylinositol 3 kinase- β and - δ for Bruton tyrosine kinase resistance in diffuse large B-cell lymphoma,” *Blood Adv.*, vol. 4, no. 18, pp. 4382–4392, Sep. 2020, doi: 10.1182/bloodadvances.2020001685.
- [119] M. Klanova and P. Klener, “BCL-2 proteins in pathogenesis and therapy of B-Cell non-hodgkin lymphomas,” *Cancers*, vol. 12, no. 4. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Apr. 01, 2020. doi: 10.3390/cancers12040938.
- [120] B. Li and W. J. Chng, “EZH2 abnormalities in lymphoid malignancies: Underlying mechanisms and therapeutic implications,” *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 12, no. 1. BioMed Central, pp. 1–13, Nov. 21, 2019. doi: 10.1186/s13045-019-0814-6.
- [121] V. Camus, H. Miloudi, A. Taly, B. Sola, and F. Jardin, “XPO1 in B cell hematological malignancies: from recurrent somatic mutations to targeted therapy,” *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 10, no. 1. BioMed Central, Feb. 14, 2017. doi: 10.1186/s13045-017-0412-4.
- [122] V. Cabaud-Gibouin, M. Durand, R. Quéré, F. Girodon, C. Garrido, and G. Jeco, “Heat-Shock Proteins in Leukemia and Lymphoma: Multitargets for Innovative Therapeutic Approaches,” *Cancers*, vol. 15, no. 3. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Feb. 01, 2023. doi: 10.3390/cancers15030984.
- [123] Z. Albakova, Y. Mangasarova, and A. Sapozhnikov, “Heat Shock Proteins in Lymphoma Immunotherapy,” *Frontiers in Immunology*, vol. 12. Frontiers Media S.A., p. 769, Mar. 18, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.660085.
- [124] T. H. Phan, S. Y. Kim, C. Rudge, and W. Chrzanowski, “Made by cells for cells - extracellular vesicles as next-generation mainstream medicines,” *Journal of Cell Science*, vol. 135, no. 1. Company of Biologists Ltd, Jan. 01, 2022. doi: 10.1242/jcs.259166.
- [125] I. Prada and J. Meldolesi, “Binding and fusion of extracellular vesicles to the plasma membrane of their cell targets,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 8, Aug. 2016, doi: 10.3390/ijms17081296.
- [126] E. Willms, C. Cabañas, I. Mäger, M. J. A. Wood, and P. Vader, “Extracellular vesicle

- heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. APR, p. 738, Apr. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.00738/BIBTEX.
- [127] A. Yekula *et al.*, "Large and small extracellular vesicles released by glioma cells in vitro and in vivo," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 9, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1080/20013078.2019.1689784.
- [128] Y. Jia *et al.*, "Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications," *Theranostics*, vol. 12, no. 15. Ivyspring International Publisher, pp. 6548–6575, 2022. doi: 10.7150/thno.74305.
- [129] M. Battistelli and E. Falcieri, "Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication," *Biology (Basel)*, vol. 9, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/BIOLOGY9010021.
- [130] S. Arandjelovic and K. S. Ravichandran, "Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis," *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 9, p. 907, Aug. 2015, doi: 10.1038/NI.3253.
- [131] V. Muralidharan-Chari, J. W. Clancy, A. Sedgwick, and C. D'Souza-Schorey, "Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. 10, pp. 1603–1611, May 2010, doi: 10.1242/JCS.064386.
- [132] L. M. Doyle and M. Z. Wang, "Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis," *Cells*, vol. 8, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/CELLS8070727.
- [133] J. L. Hood, S. San Roman, and S. A. Wickline, "Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 11, pp. 3792–3801, Jun. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4455/649700/AM/EXOSOMES-RELEASED-BY-MELANOMA-CELLS-PREPARE.
- [134] K. Menck, S. Sivaloganathan, A. Bleckmann, and C. Binder, "Microvesicles in Cancer: Small Size, Large Potential," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 15, pp. 1–30, Aug. 2020, doi: 10.3390/IJMS21155373.
- [135] S. Zhu, S. Li, M. Yi, N. Li, and K. Wu, "Roles of Microvesicles in Tumor Progression and Clinical Applications," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 16, p. 7071, 2021, doi: 10.2147/IJN.S325448.
- [136] N. M. Namee and L. O'Driscoll, "Extracellular vesicles and anti-cancer drug resistance," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1870, no. 2, pp. 123–136, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.BBCAN.2018.07.003.
- [137] M. D. A. Paskeh *et al.*, "Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–39, Dec. 2022, doi: 10.1186/S13045-022-01305-4/TABLES/4.
- [138] T. Aung *et al.*, "Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 37, pp. 15336–15341, Sep. 2011, doi: 10.1073/PNAS.1102855108/SUPPL_FILE/PNAS.201102855SI.PDF.
- [139] C. Boudesco, "Expression et rôle d'HSP110 dans le lymphome B diffus à grandes cellules de type activé ou ABC-DLBCL," Bourgogne Franche-Comté, Dijon, 2018. Accessed: Mar. 31, 2020. [Online]. Available: <http://www.theses.fr/2018UBFCI014>
- [140] H. Miloudi *et al.*, "XPO1E571K mutation modifies exportin 1 localisation and interactome in b-cell lymphoma," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 10, pp. 1–20, Sep. 2020, doi: 10.3390/cancers12102829.
- [141] B. Galinski *et al.*, "XPO1 inhibition with selinexor synergizes with proteasome inhibition in

- neuroblastoma by targeting nuclear export of IκB,” *Transl. Oncol.*, vol. 14, no. 8, p. 101114, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.tranon.2021.101114.
- [142] Y. Chen *et al.*, “Inhibition of the nuclear export receptor XPO1 as a therapeutic target for platinum-resistant ovarian cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, no. 6, pp. 1552–1563, Mar. 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1333.
- [143] R. Njemini, I. Bautmans, O. O. Onyema, K. Van Puyvelde, C. Demanet, and T. Mets, “Circulating Heat Shock Protein 70 in Health, Aging and Disease,” *BMC Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–8, Mar. 2011, doi: 10.1186/1471-2172-12-24.
- [144] M. Regimbeau, J. Abrey, V. Vautrot, S. Causse, J. Gobbo, and C. Garrido, “Heat shock proteins and exosomes in cancer theranostics,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 86, no. Pt 1, pp. 46–57, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.semcancer.2021.07.014.
- [145] Y. Zhang, Y. Liu, H. Liu, and W. H. Tang, “Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential,” *Cell and Bioscience*, vol. 9, no. 1. BioMed Central, pp. 1–18, Feb. 15, 2019. doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.
- [146] T. Henics, E. Nagy, H. J. Oh, P. Csermely, A. von Gabain, and J. R. Subjeck, “Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 24, pp. 17318–24, Jun. 1999, doi: 10.1074/JBC.274.24.17318.
- [147] A. Kishor, E. J. F. White, A. E. Matsangos, Z. Yan, B. Tandukar, and G. M. Wilson, “Hsp70’s RNA-binding and mRNA-stabilizing activities are independent of its protein chaperone functions,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 34, pp. 14122–14133, Aug. 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.785394.
- [148] K. Boros *et al.*, “Increased SYK activity is associated with unfavorable outcome among patients with acute myeloid leukemia,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 28, pp. 1–13, 2015, doi: 10.18632/ONCOTARGET.4669.
- [149] L. Carsetti, L. Laurenti, S. Gobessi, P. G. Longo, G. Leone, and D. G. Efremov, “Molecular Requirements for Syk-Mediated Intracellular Signaling and B-Cell Transformation,” *Blood*, vol. 112, no. 11, pp. 2837–2837, Nov. 2008, doi: 10.1182/blood.v112.11.2837.2837.
- [150] B. L. Williams, “Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma 1 and Ras activation,” *EMBO J.*, vol. 18, no. 7, pp. 1832–1844, Apr. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.7.1832.
- [151] K. J. Leuchowius, I. Weibrecht, and O. Söderberg, “In situ proximity ligation assay for microscopy and flow cytometry,” *Curr. Protoc. Cytom.*, vol. Chapter 9, no. SUPPL. 56, 2011, doi: 10.1002/0471142956.cy0936s56.
- [152] S. D. Dunn, “Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on western blots by monoclonal antibodies,” *Anal. Biochem.*, vol. 157, no. 1, pp. 144–153, Aug. 1986, doi: 10.1016/0003-2697(86)90207-1.
- [153] L. Fontán *et al.*, “Specific covalent inhibition of MALT1 paracaspase suppresses B cell lymphoma growth,” *J. Clin. Invest.*, vol. 128, no. 10, pp. 4397–4412, Oct. 2018, doi: 10.1172/JCI99436.
- [154] X. Yu *et al.*, “MYD88 L265P mutation in lymphoid malignancies,” *Cancer Res.*, vol. 78, no. 10, pp. 2457–2462, May 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0215.
- [155] L. D. Shultz, F. Ishikawa, and D. L. Greiner, “Humanized mice in translational biomedical research,” *Nat. Rev. Immunol.* 2007 72, vol. 7, no. 2, pp. 118–130, Feb. 2007, doi: 10.1038/nri2017.
- [156] R. Kohnken, P. Porcu, and A. Mishra, “Overview of the use of murine models in leukemia and lymphoma research,” *Front. Oncol.*, vol. 7, no. FEB, Feb. 2017, doi: 10.3389/fonc.2017.00022.

- [157] E. Arpaia and T. W. Mak, "Micromanagement of lymphomas," *PLoS Biology*, vol. 6, no. 6. Public Library of Science, pp. 1144–1147, Jun. 2008. doi: 10.1371/journal.pbio.0060156.
- [158] V. N. Ngo, "In vivo modeling of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) with the myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88) L265P mutation," *Translational Cancer Research*, vol. 5, no. 4. AME Publishing Company, pp. S852–S854, 2016. doi: 10.21037/tcr.2016.10.38.
- [159] M. S. Davids and J. R. Brown, "Ibrutinib: A first in class covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase," *Futur. Oncol.*, vol. 10, no. 6, pp. 957–967, 2014, doi: 10.2217/fon.14.51.
- [160] K. Dunleavy and W. H. Wilson, "Primary mediastinal B-cell lymphoma and mediastinal gray zone lymphoma: Do they require a unique therapeutic approach?," *Blood*, vol. 125, no. 1. American Society of Hematology, pp. 33–39, Jan. 01, 2015. doi: 10.1182/blood-2014-05-575092.
- [161] C. Lees, C. Keane, M. K. Gandhi, and J. Gunawardana, "Biology and therapy of primary mediastinal B-cell lymphoma: current status and future directions," *British Journal of Haematology*, vol. 185, no. 1. Blackwell Publishing Ltd, pp. 25–41, Apr. 01, 2019. doi: 10.1111/bjh.15778.
- [162] Y. Liu *et al.*, *Exosomes and Their Role in Cancer Progression*, vol. 11. Frontiers Media S.A., 2021, p. 792. doi: 10.3389/fonc.2021.639159.

Annexes

Annexe 1 : Revue en 1^{er} auteur, portant sur le potentiel thérapeutique des HSPs dans le traitement des leucémies et lymphomes

Review

Heat-Shock Proteins in Leukemia and Lymphoma: Multitargets for Innovative Therapeutic Approaches

Vincent Cabaud-Gibouin ¹, Manon Durand ¹, Ronan Quéré ¹, François Girodon ^{1,2}, Carmen Garrido ^{1,3} and Gaëtan Jegou ^{1,*}¹ INSERM, UMR1231, Université de Bourgogne, 21078 Dijon, France² Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Universitaire François Mitterrand, 21000 Dijon, France³ Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France

* Correspondence: gaetan.jego@u-bourgogne.fr

Simple Summary: Heat-shock proteins (HSPs) are molecular chaperones overexpressed in tumor cells and are necessary for their survival. In leukemia and lymphoma, HSPs have been reported to have unique cytoprotective effects on different cell death and growth pathways. In this review, we describe the implication of HSPs in those pathways in hematological malignancies and discuss the pertinence of detecting and targeting them for future innovative treatment strategies.

Abstract: Heat-shock proteins (HSPs) are powerful chaperones that provide support for cellular functions under stress conditions but also for the homeostasis of basic cellular machinery. All cancer cells strongly rely on HSPs, as they must continuously adapt to internal but also microenvironmental stresses to survive. In solid tumors, HSPs have been described as helping to correct the folding of misfolded proteins, sustain oncogenic pathways, and prevent apoptosis. Leukemias and lymphomas also overexpress HSPs, which are frequently associated with resistance to therapy. HSPs have therefore been proposed as new therapeutic targets. Given the specific biology of hematological malignancies, it is essential to revise their role in this field, providing a more adaptable and comprehensive picture that would help design future clinical trials. To that end, this review will describe the different pathways and functions regulated by HSP27, HSP70, HSP90, and, not least, HSP110 in leukemias and lymphomas.

Keywords: heat-shock protein; leukemia; lymphoma; targeted therapy



Citation: Cabaud-Gibouin, V.; Durand, M.; Quéré, R.; Girodon, F.; Garrido, C.; Jegou, G. Heat-Shock Proteins in Leukemia and Lymphoma: Multitargets for Innovative Therapeutic Approaches. *Cancers* **2023**, *15*, 984. <https://doi.org/10.3390/cancers15030984>

Academic Editor: Giuseppe Visani

Received: 23 December 2022

Revised: 27 January 2023

Accepted: 31 January 2023

Published: 3 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Leukemias and lymphomas represent 6.5% of cancers worldwide [1]. They emerge from a wide array of cells at different stages of hematopoietic maturation, from hematopoietic stem cells and myeloid and lymphoid progenitors to mature B and T cells. Treatment breakthroughs have been made in recent years thanks to the comprehensive identification of survival pathways and oncogenes, leading to targeted therapies such as kinase inhibitors or anti-apoptotic protein inhibitors [2,3]. At the same time, recent progress in high-throughput molecular analysis combined with bioinformatic power has revealed a more diverse and complex picture of cancer sub-populations than expected, challenging the too simplistic “one treatment fits all” [4]. Furthermore, natural mechanisms of cell death resistance and escape from therapy occur in many patients either from the start of the treatment or after several cycles of chemotherapy, pushing for more specific and innovative drug use in the clinic. Therefore, cancer initiation, development, and cell death resistance are still intense fields of research to identify new therapeutic targets that could foster the development of new treatments.

HSPs have been involved in many cellular processes as they are important house-keeping proteins. Their chaperone function is observed in every cell compartment and is

intrinsically associated with protein translation, migration, localization, stability, and degradation. Traditionally, they have been classified by their molecular weight, with the most studied members in cancer being HSP90, HSP70, HSP27, and, more recently, HSP110. Cell stress is a powerful initiator and booster of HSP expression as it leads to multiple protein structural alterations, such as aggregation, unfitted conformations, and accelerated protein synthesis. Because tumor cells must rewire their metabolism in permanence, they are like highly stressed cells and therefore rely on the strong expression of HSPs for their survival. Consequently, they become more resistant to cell death mechanisms, either of natural origin or therapeutically induced. HSP expression profiles in newly diagnosed patients compared to healthy controls in various hematological malignancies reveal a frequent but heterogeneous expression. In acute myeloid leukemia (AML), HSP70 was strongly expressed in 58% of patients, compared to 26% for HSP60 [5]. Despite this variability of expression, the global HSP family proteome provides widespread protection to tumor cells, as the overall survival of AML patients was inversely correlated to HSP expression. Moreover, when other prognosis factors were considered, HSP expression always an additive pejorative value for the patients' outcomes [5].

Similarly, in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and chronic myeloid leukemia (CML), HSP70 is significantly more expressed in patients than in healthy controls. High levels of HSP70 correlate with resistance to tyrosine kinase inhibitors [6,7]. In lymphoma, a high expression of the mitochondrial HSP70 (mortalin) correlates with treatment resistance and poor survival of patients [8]. As HSP expression is highly modulated by environmental aggressions, HSPs further accumulate in cancer cells after anti-cancer treatments through the induction/activation of the HSPs' transcription factor HSF1. In CLL, increased HSP70 and HSF1 were observed in response to Ibrutinib treatment and signaled a failure of clinical improvement [9]. Conversely, only responders show a decrease in HSP70 expression [7]. HSP27 has been associated with clinical responses as it is highly expressed in pediatric acute leukemia and provides resistance to chemotherapy [10]. HSPs are also secreted, free or with nanovesicles. Some of them, such as HSP70, have a membrane location and can be found both in the cancer microenvironment and in the blood [11]. High HSP70 levels have been detected at the cell surface and in the serum in AML and correlate with limited survival [12,13]. Extracellular HSPs, also described in many solid tumors, can have an immunosuppressive function mostly through macrophage polarization and myeloid suppressive cell activation [14]. The importance of the immune microenvironment in leukemia and lymphoma [15] and the capacity of HSPs to diffuse largely through the body as free proteins or embedded in extracellular vesicles provide solid grounds for studies of their extracellular functions. The most abundant HSP, HSP90, also shows elevated levels in various types of leukemias and lymphomas and could serve as a prognostic marker. In addition, its elevated expression is necessary for the survival and propagation of those cancer cells [16–21]. Finally, the expression of the high-molecular-weight HSP110, a long-forgotten chaperone, has recently been revealed to correlate with the aggressiveness of non-Hodgkin lymphoma (NHL) [22–24].

HSPs are therefore strongly associated with hematological malignancy aggressiveness and responses to therapies. In this review, we will present the most recent advances in understanding the different HSP functions in this specific family of tumors, ranging from their BCR signaling pathway to their metabolic regulation.

2. HSP Families' Overview

2.1. Heat-Shock Factor

In humans, there are six members forming the HSF family: HSF1, HSF2, HSF4, HSF5, HSF6, and HSF7. HSF proteins have specific and overlapping roles. HSF1 is the most studied member of the family and is known to be involved in the expression of HSPs during a response to different types of stresses. However, it is now well established that HSFs are involved in the regulation of a broader array of genes that are not related to HSPs in normal and pathological hematopoiesis [25]. HSF1 is also involved in immune

responses and aging. Together with HSF2, both transcription factors are involved in the development of gametes (sperm and oocytes) and the nervous system. HSF4 has been described to cooperate with HSF1 and is involved in the development and homeostasis of the lens, the survival of the lens cells, and the genesis of neurons [26]. It is also expressed in the brain, muscles, heart, and pancreas. HSF5 is one of the newest members of the family, and although it is expressed in humans, its roles are better understood in animals: in the zebrafish, HSF5 loss of function leads to male infertility, and in mice, HSF5 is known to be involved in spermatogenesis. HSFX is localized on the X chromosome, but its roles are unknown. Finally, HSFY, located on the Y chromosome, has been described as being involved in spermatogenesis, with its deletion causing infertility [27].

HSPs are transcriptionally regulated by two members of the heat shock factor family, HSF1 and HSF2. Various stresses can activate HSF1 and thereby induce HSP expression: an increase in the cytosolic levels of misfolded proteins, a rise in temperature, or an alteration in the cellular pH or redox state. Under normal conditions, HSF1 is restrained in the cytosol by HSP90 or HSP70, and with one of the cell stresses quoted above, HSF1 will dissociate from those HSPs [28]. This will allow HSF1 to phosphorylate and trimerize, and so it will enter the nucleus, binding the HSE sequences and permitting the expression of HSP genes [29]. In general, HSF1 recognizes and binds the heat-shock element (HSE) sequence (nTTCnnGAAnnTTCn) in various regions of HSP genes upon activating signals and promotes their transcription. HSF1 is involved in the proteostasis of the earliest stage of blood cell development. Notably, HSF1 ensures protein synthesis and proteostasis in hematopoietic stem cells [30]. Since HSF1 is a central regulator of stress responses, various studies have demonstrated its implication in cancer development, showing it to be an important target in cancer therapy. In AML, the inhibition of HSF1 with the chemical compound DTHIB decreases the growth and engraftment of AML cells [31]. It has also been shown that the inhibition of the translational factor eIF4a inactivates HSF1 and thereby has anti-leukemic effects both *in vitro* and *in vivo* [32]. In diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL), HSF1 mRNA is upregulated compared with regular B-cells, which can be one of the reasons for the strong expression of a wide variety of HSPs in this type of cancer [33]. Cooperating with STAT3, HSF1 is able to maintain the cancerous phenotype of liver cancer cells [34], and the inhibition of HSF1 in pancreatic cancer decreases their stemness and sensitizes them to gemcitabine [35]. HSF1 knock-down in prostate cancer cell lines sensitizes them to chemotherapy [36]. Recently, it has been shown that HSF2, in an interplay role with HSF1, can also induce the expression of HSPs [37]. HSF2 does not have a significant role in the heat-shock response, but it is able to regulate a common set of genes with HSF1, and among them are the HSP genes. Using HSF1 and/or HSF2 knockout cell lines, dysregulated responses to nutrient stress could be observed, as well as a reduction in tumor progression, making HSF2 a critical co-factor of HSF1 [38]. HSF2 is involved in various types of carcinomas. Notably, HSF2 is known to be constitutively active in embryonic carcinoma cells, leading to the overexpression of HSPs. It is also implicated in the development of breast, lung, thyroid, oesophageal, and prostate cancers [39].

2.2. HSP110 Family

The HSP family with the highest molecular weight is composed of four members: HSP110 (HSP105, NY-CO-25, or HSPH1), APG2 (HSPA4 or HSPH2), APG1 (HSPA4L, Osp94, or HSPH3), and GRP170 (ORP150, HYOU1, or HSPH4). The roles of APG1 and APG2 are not well known. APG1 is involved in testis homeostasis, and APG2 has roles in spermatogenesis and is also expressed in the brain. GRP170 is an endoplasmic reticulum (ER) chaperon induced by glucose deprivation [40]. HSP110 is coded by the gene HSPH1 and was first described as a cochaperone of HSP70 and HSC70. More specifically, it was characterized as a nucleotide exchange factor (NEF) for those HSPs, carrying ATP and so enhancing their chaperoning function [41,42]. HSP110 is known to recognize and bind denatured or misfolded proteins for other HSPs, such as HSP70, to convert them into fully functional proteins [42]. Other HSPs, such as HSP70 or HSC70, are able to perform

this function, but HSP110 is four times more efficient [40]. Therefore, it was thought that HSP110 was dependent on HSP70/HSC70 for its refolding role, but it has been discovered that HSP110, with the help of HSP40, can unfold and refold misfolded proteins on its own [42]. Together with HSP70 and HSP40, the HSP110-HSP70-HSP40 complex is an important chaperone network that disaggregates and refolds aggregates of denatured proteins [40].

2.3. HSP90 Family

HSP90 is probably the best-known family of HSPs involved in hematopoietic malignancies. Its members are well represented in cells, since they constitute between 1% and 2% of whole cellular proteins in mammals [43]. HSP90 family members are spread into different cell compartments: HSP90 α A1 (also called HSPC1, HSP90A, HSP90AA1, or HSP86), HSP90 α A2 (HSPC2 or HSP90AA2), and HSP90 β (HSPC3, HSP90B, HSP90AB1, or HSP84) are cytosolic, while Grp94 (called HSPC4, GRP94, gp96, or HSP90B1) is restrained to the endoplasmic reticulum but can also be in the cell membrane. Finally, the last member, TRAP1 (or HSPC5, HSP90L, or HSP75), is mainly located in the mitochondria. More than 200 cellular proteins have been described as HSP90 client proteins. From proximal molecules of the BCR to transcription factors within the nucleus, HSP90 is a systematic organizer of protein transcription, translation, and activation. Abundant literature illustrates this “hub” function of HSP90 within several signaling pathways. From the cell surface, where tonic or chronic BCR stimulation occurs, HSP90 is present and interacts with BCR components to sustain signals.

2.4. HSP70 Family

The HSP70 family is, along with the HSP90 family, the most studied group of chaperones. There are thirteen members of the HSP70 family, all coded by the HSPA genes. Five of them are particularly studied: HSP70 (also called HSPA1 or HSP72) and HSPA6 (also called HSPB'), which are stress-induced, but also three other constitutively expressed HSP70 members, which are HSC70 (also called HSPA8 or HSP73), mortalin (also called HSPA9), and GRP78 (also called HSPA5 or BiP) [44]. HSP70s are involved in multiple cellular functions, such as the folding of unfolded or misfolded proteins, the maintenance of protein homeostasis, the transport of proteins to different subcellular fractions, and cell survival after stress [44,45]. With the help of its cochaperones, HSP40 and HSP110, HSP70 is able to desegregate and fold denatured proteins and aggregates [40]. The HSP70 family of chaperones is known for its diverse roles in cancer [44]. When it comes to lymphoid malignancies, four of these HSPs are described in the literature: HSP70 (or HSP72), HSC70, Grp78, and mortalin.

2.5. Small HSPs Family

The small HSP family has ten members. The best-known is HSP27 (HSPB1, HSP25, or HSP28), which is cytoplasmic but can translocate to the nucleus under stress, and it has been reported to be involved in cancer development. MKBP (HSPB2) is mainly expressed in the heart and muscles, helping with their structure and functions. HSPL27 (HSPB3, DHMN2C, or HMN2C) is also an HSP involved in muscle functions and is specific to this type of tissue. α A-crystallin (HSPB4, CRYAA, CRYA1, or CTRCT9) is principally expressed in the eye and most specifically in the lens. Unlike most chaperones, it does not refold proteins but holds them, maintaining the solubility of aggregates to maintain cell survival. The α B-crystallin (HSPB5, CRYAB, CRYA2, or MFM2) is a ubiquitous chaperone involved in the development of neurological diseases, certain myopathies, and cancers. HSP20 (HSPB6 or HEL55), like HSPB2 and HSPB3, is involved in muscle and heart functions. HSPB7 (or cvHSP) is known to be involved in heart failures and is suspected of acting as a tumor suppressor, associated with renal carcinomas. HSP22 (HSPB8, H11, HMN2, or E2IG1) has an estrogen-dependent expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells and in some neuromuscular diseases. HSPB9 (or CT51) is the least well-known member of the

family, with a cytoplasmic and nuclear location in cells. Finally, ODF1 (or HSPB10) is a chaperone involved in the cytoskeleton structures of sperm tails. In general, small HSPs have been shown to have roles in cell proliferation, survival, and the progression of cancer cells. Notably, HSPB1 is involved in breast cancer cell lines proliferation [46], and HSPB5 is associated with breast carcinoma progression [47], making HSPB5 a biomarker for the diagnosis of breast cancers [48]. High levels of HSPB5 are associated with low survival rates in hepatocellular, lung, and prostatic carcinomas [49–51].

3. HSPs as Chaperons of Cell Signaling Proteins

3.1. Chaperoning the B-Cell Receptor and the T-Cell-Receptor

The B-cell receptor (BCR) and T-cell receptor (TCR) are essential detectors of antigens on B and T cells, whose binding initiates multiple downstream signaling pathways leading to activation, survival, and differentiation. Their activations are also crucial in the development of leukemias and lymphomas, whose aberrant proliferation is often due to BCR pathway mutations [52]. Several HSPs have been involved in the proximal signaling of the BCR and TCR (Figure 1).

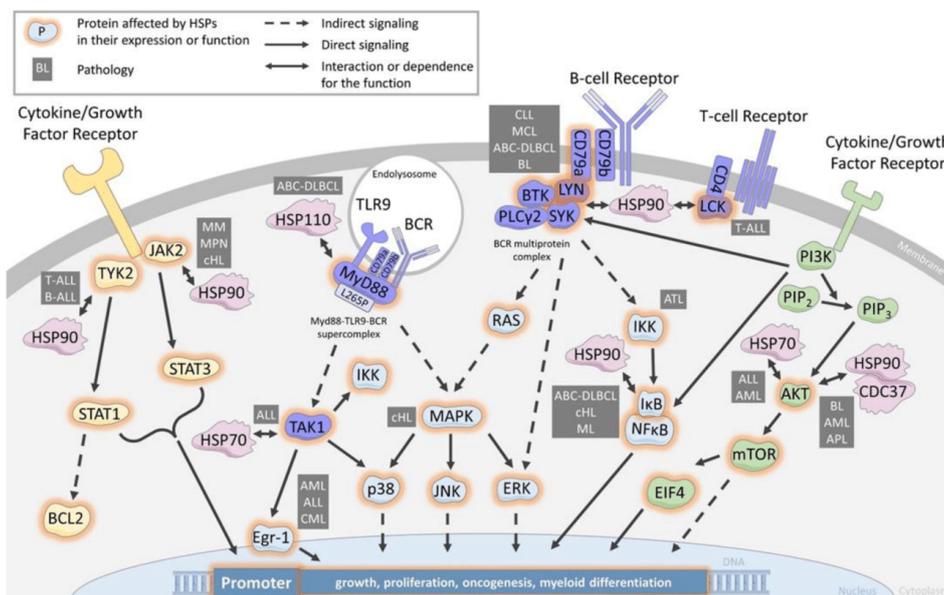


Figure 1. HSP are chaperones of cell signaling components in the BCR/TCR, JAK/STAT and PI3K/AKT pathways. Schematic of a leukemia/lymphoma cell showing the main actors involved in the major signaling pathways BCR/TCR, JAK/STAT and PI3K/AKT, as well as the involvement of the major heat shock protein families. CLL: chronic lymphocytic leukemia, MCL: mantle cell lymphoma, ABC-DLBCL: active B-cell diffuse large lymphoma, ALL: acute lymphoblastic leukemia, AML: acute myeloid leukemia, BL: Burkitt lymphoma, APL: acute promyelocytic leukemia, cHL: classical Hodgkin lymphoma, CML: chronic myeloid leukemia, MM: multiple myeloma MPN: myelo-proliferative neoplasms.

SRC refers to a family of proto-oncogenes encoding the lymphocyte-specific SRC family kinases (SFK). In this family, LCK (for lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) is highly expressed by T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) and is essential for TCR signaling [53,54]. Glucocorticoid resistance is reversed by LCK inhibition in pediatric T-

ALL [55]. The inhibition of LCK by preventing its phosphorylation is an important strategy for the treatment of malignant hematopoiesis such as T-ALL, particularly with the use of bosutinib, dasatinib, or daracatinib, which affect the proliferation of leukemia cells [55–57]. Although it was shown several years ago that LCK interacts with HSP90 [58], only recently has the use of HSP90-specific inhibitors demonstrated the dependence of LCK expression on HSP90 in T-ALL [59]. The use of patient-derived models (PDX) has further shown the negative impact of HSP90 neutralization on primary leukemic cell survival [59].

LCK homologue protein LYN (Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase) is more specifically expressed by B-cell lymphoblastic leukemia (B-ALL) and B-cell lymphoma and is important for BCR signaling. The inhibition of LYN, notably with Dasatinib, is an important strategy for the treatment of B-ALL and B-cell lymphoma. LCK protects cells from glucocorticoid-induced apoptosis, and its inhibition enhances sensitivity to dexamethasone in lymphoma cells [60]. Lymphomas resistant to proteasome inhibitors show increased expression in BCR and activation of the BCR signaling pathway enhances the activity of SFK, especially LYN, and downstream kinases PI3K/AKT/mTOR in proteasome inhibitor-resistant lymphoma cells. Therefore, targeting BCR signaling with dasatinib could be a novel therapeutic approach for patients with mantle cell lymphoma that are refractory to proteasome inhibition with bortezomib. LYN is predominantly expressed in B-lymphocytes and plays a central role in initiating B-cell signaling. Evidence is mounting that strongly implicates an important role for LYN in several types of leukemia and lymphoma, particularly in B-ALL, where studies have confirmed the overexpression of LYN and its critical role in maintaining proliferation and antiapoptotic pathways in leukemic cells.

In CLL and MCL, high HSP90 expression correlates with overexpression of BCR signalosome proteins, including CD79a, PLCg2, LYN, BTK, and SYK. These proteins are associated with HSP90 in a multiprotein complex [21,61,62]. Pharmacological inhibition of HSP90 dislocates the complex and induces cell death, suggesting a critical role for maintenance of the tonic BCR signaling. Similarly, in ABC-DLBCL, HSP90 is a member of the BCR signalosome, and the HSP90 inhibitor PUH71 decreases SYK and BTK phosphorylation [63].

Considering ibrutinib resistance and given this BCR-complex, HSP90 targeting could be envisioned. Indeed, the HSP90 inhibitors SNX-5422 and AUY922 were recently shown to induce cell death in B cell lines expressing BTK C815S [62]. Combining drugs with ibrutinib to increase survival rates is being explored [64], and its association with PUH71 induced the synergistic killing of lymphoma cells [63]. In ABC-DLBCL, only 37% of patients respond to ibrutinib [65]. Phelan et al. have identified that most of these patients harbor dual CD79a and MyD88^{L265P} mutations leading to the formation of a cytoplasmic MyD88-TLR9-BCR supercomplex driving I κ B phosphorylation and thereby to cell survival and proliferation [66]. We have shown that HSP110 expression correlates with MyD88 in patients' lymph node biopsies and that HSP110, by chaperoning MyD88 and MyD88^{L265P}, enhances ABC-DLBCL cell lines survival [24]. Therefore, specific inhibitors of HSP110, like the small chemical compound recently reported by us [67], would destabilize MyD88^{L265P} and subsequently the MyD88-TLR9-BCR super complex. This strategy might be a therapeutic alternative for ibrutinib-resistant patients.

In addition to chronic BCR-activated leukemia and lymphoma, HSP90 also cooperates with BCR signaling in Burkitt lymphoma (BL) as it interacts with SYK in a BCR Y197-dependent manner [68]. SYK/HSP90 interaction seems to play a particularly important role in BL cell survival, as LYN and BTK knock-down by shRNA do not alter the cells' survival, unlike SYK knock-down.

BCR downstream pathways are subsequently impacted by HSP90 inhibition, as demonstrated in MCL, classical Hodgkin lymphoma (cHL), and ABC-DLBCL, where I κ B degradation and reduction of NF κ B signaling are observed [62,63,69]. In addition to indirect BCR effects, other client proteins of multiple signaling pathways are also impacted. In cHL, ERK/MAPK and RAS were reported to be down-regulated, and in ATL, AKT and the NF κ B kinase complex IKK α , β , and δ were degraded [70,71].

The involvement of HSP70 is less well documented than that of HSP90. However, in ALL it seems to play an important role. In this disease, the transforming growth factor- β -Activated Kinase 1 (TAK1), a member of the mitogen-activated protein kinase (MAP3K) family that has serine/threonine protein kinase activity, activates several pathways, including MAPK p38, JNK, and IKK [72]. HSP70 silencing leads to a decrease in the quantity of TAK1, which consequently derepresses Egr-1 expression, a tumor suppressor gene that leads to cell death [73]. Egr-1 low expression plays a major role in normal HSC long-term maintenance and localization; in contrast, its dysregulation is linked to hematopoietic aging [74]. This suggests that HSP70 would favor normal hematopoiesis through HSC regulation and the TAK1/Egr-1 pathway. Conversely, the Egr-1 down-expression observed in AML, ALL, and CML could be reversed by targeting HSP70 [75].

3.2. Chaperoning the JAK/STAT Pathway

Aberrant activation of the Janus-activated kinase (JAK) tyrosine kinase family plays an oncogenic role in leukemias, lymphomas, and other hematopoietic disorders such as myeloproliferative neoplasms (MPN). TYK2 was the first identified JAK family member aberrantly activated in T-ALL and B-ALL. It results in STAT1 activation and up-regulation of the anti-apoptotic protein BCL2 [76,77]. TYK2 has been identified as a HSP90 client protein [58], and in T-ALL, pharmacological inhibition of HSP90 led to TYK2 degradation, reduced STAT1 phosphorylation, and subsequent BCL2 down-expression [78].

In MPN, the JAK2 mutation has been observed in most patients, ranging from 50% with essential thrombocythemia and myelofibrosis to 95% in polycythemia vera [79]. Therefore, JAK inhibitors like ruxolitinib are being used in the clinic. In patients, JAK2 inhibition has been shown to decrease splenomegaly but cannot eradicate the MPN clone [80], leading to the search for alternative targeted therapies. Of note, JAK2 is a client protein of HSP90, and its inhibition leads to JAK2 degradation, followed by abrogation of the JAK/STAT signaling in vitro and in vivo [81,82]. Murine models of MPN treated with a HSP90 inhibitor led to global improvements in the mice with significant survival benefits. This prompted a clinical pilot study with HSP90 inhibitors [83], which showed an in vivo reduction in the spleen's size in all patients. Although these results need to be confirmed in a more ambitious clinical trial, they suggest that HSP90 targeting would be a valuable therapy in MPN. An additional interest in HSP90 inhibitors would be in patients resistant to JAK inhibitors due to JAK2 mutations (G935R, Y931C, and E864K), because those mutant JAK2 are still client proteins of HSP90 [84].

Concerning small HSPs, HSP27 also plays a role in the myelofibrosis form of MPN as it is strongly expressed in bone marrow biopsies of patients in contrast to HSP70 and HSP90 [85]. HSP27, indeed, binds directly to JAK2 and STAT5 to protect STAT5 from its dephosphorylation. It might also favor the molecular assembly JAK2/STAT5. Furthermore, treatment of murine models of myelofibrosis with OGX-427, an antisense oligonucleotide against HSP27, limited the progression of bone marrow fibrosis, normalized the platelet and white blood cell counts.

In cHL, JAK2 and TYK2 activation are also observed and correlate with STAT signaling and cell survival [86]. As in MPN, HSP90 inhibition in cHL and multiple myeloma (MM) leads to loss of STAT3 and 5 tyrosine phosphorylation due to JAK1,3 and TYK2 down-regulation [86,87]. Receptor expression involved in the JAK/STAT3 pathway activation, such as IL6-R and IGRI-R, are also decreased upon HSP90 inhibition in MM [88]. In conclusion, several cancers with JAK2/STAT overactivation, either induced by growth factor stimulation or by receptor mutations, could benefit from HSP90 or HSP27 targeting alone or in combination with JAK2 targeting therapies.

3.3. Chaperoning the PI3K/AKT Pathway

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT regulates many cellular processes that favor cell survival and proliferation in normal and pathological hematopoietic cells. The hyperactivation of this pathway is frequently observed in leukemia and lymphomas

due to either mutations or gene amplifications of PI3K or AKT, but also due to the loss of regulatory proteins such as PTEN [89]. Given the importance of this pathway, many inhibitory compounds have been developed for clinical use and are now being tested [90]. HSP90 and HSP70 have been shown to regulate this pathway.

HSP90 not only binds to AKT with CDC37 in an active complex to promote AKT activity and PI3K signaling [91,92], but also binds to multiple components of the PI3K/ AKT/mTOR pathway (the PI3K catalytic and regulatory subunits, as well as downstream factors mTOR and EIF4E), as shown in BL [93]. As mentioned previously for the association of other signaling pathway inhibitors with HSP90 inhibitors, a synergistic anti-tumor effect was observed with PU-H71 and PI3K/mTOR inhibitors in BL [93]. In AML, the combination of ganetespib with cytarabine also provides synergistic cytotoxicity and is characterized by AKT disappearance [94]. For GC-DLBCL that shows a great dependency on AKT mediated by SYK activation [95,96], HSP90 targeting seems a good option to neutralize two client proteins essential for lymphoma survival. This goal is, however, reversed in acute promyelocytic leukemia (APL), which lacks AKT activation and shows a reduction in HSP90 expression. In this situation, ATRA treatment reverses HSP90 expression and AKT phosphorylation, suggesting a role for HSP90 in restarting myeloid differentiation. Regarding HSP70, the HSP70 inhibitor PFT- μ has been shown to reduce AKT expression in ALL and AML, also suggesting a chaperoning role in this pathway [97]. However, solid demonstrations of direct interaction and regulation are still lacking in those pathologies.

4. HSPs Are Chaperones of Oncogenes

Fusion proteins play a critical role in many leukemia initiations, such as the well-known BCR-ABL fusion in CML. As they are not naturally synthesized and folded proteins, HSPs are mandatory to maintain their correct conformation (Figure 2). BCR-ABL is a client protein for HSP90. The chaperone interacts with its coiled-coil domain in the N-terminal part, thereby preventing the transport of BCR-ABL to the nucleus and permitting the cytosolic promotion of signaling [98]. Conversely, HSP90 inhibition leads to the nuclear transport of BCR-ABL, its degradation, and a subsequent decrease of the downstream signaling molecules P-AKT and P-STAT5 [98,99]. Recently, a newly identified HSP90-specific inhibitor that targets HSP90 dimerization sites, aminoxyrone, has shown a similar effect on BCR-ABL down-expression in both leukemic stem cells and bulk fraction [100]. Other fusion proteins like FOP2-FGFR1, FLT3-ITD, and BCR-FGFR1 in AML are also client proteins of HSP90/CDC37, which holds them in a permanently active conformation [101–103]. HSP90 inhibitors alone or in combination with cytarabine show FP2-FGFR1 downregulation and anti-leukemic activity [104]. Similarly, the association of HSP90 inhibitors with a protein translation inhibitor (homoharringtonine) shows synergistic apoptosis and cell cycle arrest effects in FLT3-ITD AML [105]. Furthermore, this strategy is still valid in patients previously treated in the long term with TK inhibitors for FLT3-ITD and developing resistance through acquired mutations in FLT3-ITD, as HSP90 inhibitors are still very effective in those mutated cells [106]. Cooperation between different HSP family members is sometimes necessary to achieve the correct folding of aberrant proteins. This is the case for the AML1-ETO fusion proteins, the most important oncogenes in AML, whose correct folding is enabled by the associated work of both HSP70 and the chaperonin TRiC [107].

Aberrant transcriptional regulation by either hyperactive transcription factors or transcriptional repressors is also a hallmark of leukemia/lymphoma cells in which HSPs are involved. Bcl6, the transcriptional suppressor highly expressed in GC-DLBCL, and c-MYC, the master cell cycle regulator that promotes BL development, are both sustained by HSP90 and HSP110 (Figure 2). Indeed, HSP90 was shown to bind to BCL6 at the promotor of the targeted genes, stabilizing BCL6 and facilitating BCL6 transcriptional activity [108]. HSP110 expression correlates with c-MYC and Bcl6 protein expression in tumor biopsies of BL, DLBCL, FL, and MCL, and HSP110 knockdown leads to decreases in both oncogenes [23]. As described for the contribution of HSP90 to various signaling pathways, HSP90 is also embedded in multiprotein complexes in the nucleus as it is

associated with BCL6 and WTAP (Wil's tumor-1-associated protein) [109]. C-MYC is also a HSP90 client protein in BL and MCL [110,111], and therefore its degradation by the proteasome is protected by the chaperone.

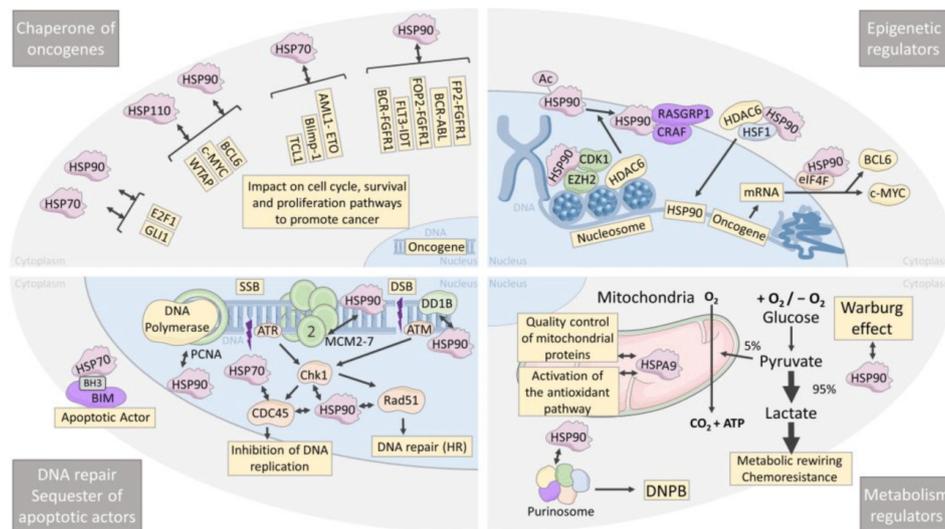


Figure 2. HSP are chaperones of oncogenes, epigenetic regulators, metabolism regulators, chaperones of DNA repair, and sequesters of apoptotic actors in leukemia and lymphoma. Schematic of a leukemia/lymphoma cell showing the four major roles of HSPs in the global cellular homeostasis, which are: chaperones of oncogenes, chaperones of epigenetic regulators, chaperones of DNA repair actors, and their involvement in metabolism. SSB: single-strand break, DSB: double-strand break, DNPB: de novo purine biosynthetic pathway, HR: homologous recombination.

Although BCL6 and c-MYC are promising therapeutic targets, effective inhibitors have not yet reached clinical efficacy, suggesting that indirect inhibition through the destabilization of their protein complexes with HSPs could be an alternative strategy. This is supported by reports of the degradation of BCL6 and c-MYC upon HSP90 or HSP110 inhibition, which is followed by increased cell death. Of note, in MCL, the MYC transcriptional program was particularly and specifically suppressed upon HSP90 inhibition compared to other pathways, confirming the importance of the peculiar HSP90/c-MYC relationship [110]. Many other transcription factors might be regulated by HSP70, HSP90, and HSP110, and future research will probably confirm this. For instance, E2F1, a central factor involved in cell cycle in MCL, and GLI1, the main effector of the hedgehog pathway in AML, have been identified as new HSP90 client proteins that are down-expressed upon HSP90 and HSP70 inhibition [112,113]. Conversely, the accelerated cytosolic degradation of the mutated transcription factors that would, in their wild-type form, normally alleviate the aborted differentiation is a not-so-well-studied mechanism of aberrant HSP chaperoning. This has been demonstrated in ABC-DLBCL, where unstable N-terminally misfolded Blimp-1 mutants are recognized by HSP70 and brought to Hrd1-mediated cytosolic sequestration, ubiquitination, and proteasomal degradation. In this context, HSP70 inhibition restored Blimp-1 mutants' nuclear localization and function [114]. This mechanism of HSP70-mediated aberrant sequestration of a transcription factor is reminiscent of what was observed for GATA-1 in myelodysplastic syndromes [115].

T-cell leukemia/lymphoma 1 (Tcl1) is overexpressed in aggressive CLL and other human B-cell lymphomas. It is known to be a co-activator of AKT and a transactivator of

NFkB [116,117]. HSP70 inhibition induces the proteasomal degradation of TCL1, prevents NFkB activation, and decreases tumor growth in mice xenografted with Daudi and Raji BL cell lines [118]. Therefore, not only transcription factors but also oncogenes that serve as signaling pathway transactivators, such as Tcl1, are stabilized by HSPs, expanding the number of putative therapeutic targets (Figure 2).

5. HSPs Are Epigenetic Regulators

Epigenetic regulators are also masters of gene expression, and their down- or over-expression is frequently associated with chemotherapy resistance [119]. In particular, the histone methyltransferase EZH2 is lost in 50% of AML patients and induces cytarabine resistance [120]. This reduction in EZH2 protein is due to CDK1-dependent phosphorylation within a complex involving HSP90. Accordingly, HSP90 inhibition restores EZH2 and drug sensitivity [121]. The histone deacetylase (HDAC) proteins are powerful epigenetic translational regulators. They mediate chromatin compacting and gene expression by the deacetylation of histones and regulate both the protein stability and activity of non-histone proteins. HDAC6 is a client protein of HSP90 and mediates its deacetylation [122,123]. Therefore, HDAC inhibition leads to HSP90 hyperacetylation and degradation, with all the cascade of client protein disappearance that follows (Figure 2). Particularly, in B-cell lymphomas and T-cell leukemias, RASGRP1 and CRAF, two HSP90 client proteins, are degraded upon HDAC6 inhibition, leading to RASGRP1/CRAF-dependent apoptosis [124]. Being an HSP90 client protein, however, HDAC6 is also degraded upon HSP90 inhibition; therefore, mutual regulation does exist and is a tempting target for combinational therapies. Furthermore, in AML and CML, HDAC inhibition leads to stronger binding of HSP90 to its inhibitor, 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), fostering HSP90 degradation. Accordingly, combinations of HDAC inhibitors and 17-AAG logically result in increased cell death [125]. Finally, the transcriptional regulation of HSP90 is also modulated by HDAC6, first by facilitating HSF1 nuclear translocation, and second by deacetylating histone at the HSP90 gene locus. In conclusion, the search for dual HDAC and HSP90 inhibitors is a promising field to synergistically improve therapeutic strategies [126]. Transcriptional regulation of many oncogenic mRNAs is also controlled by the eukaryotic initiation complex eIF4E, which binds to HSP90 [127]. As in DLBCL, BCL6 and cMYC mRNAs are exported and translated under the control of eIF4E; targeting HSP90 would also make it possible to blunt the production of these oncogenes. In conclusion, HSP90 is known to be a direct regulator of gene expression as a chromatin-bound protein [128].

6. HSPs Are Leukemia and Lymphoma Metabolism Regulators

Metabolism rewiring allows tumor cells to adapt their biosynthesis to the nutrient availability in their microenvironment. Therefore, aggressive lymphomas and leukemias both use oxidative phosphorylation and glycolysis to fulfill their need in ATP. The latter process is amplified and known as the Warburg effect, which contributes to chemoresistance [129]. Oncogenes and aberrant cell signaling such as c-MYC, HIF1a, and the PI3K/AKT/mTOR pathway contribute to the promotion of the Warburg effect, the conversion of pyruvate to lactate, and fatty acid synthesis. By sustaining these pathways and oncogenes directly or indirectly, HSPs can modulate such metabolic rewiring (Figure 2). Recently, it has been reported that HSP90 is involved in this process as a stabilizer of protein complexes rather than as signaling pathway promoters [130]. Indeed, HSP90 coordinates and sustains several metabolic pathways, such as enzymes involved in the metabolism of nucleotides, carbohydrates, and amino acids, by promoting the formation of multienzymatic complexes. More recently, this metabolic function of HSP90 has also been shown in the process of de novo purine biosynthesis (DNPB) under high purine demands during metabolic stress [131]. Purinosome, a multienzymatic complex that drives DNPB, requires HSP90 to maintain its physical properties and thereby promote purine production. Although demonstrated in HeLa cells and not yet in hematological malignancies, this finding

supports the role of HSP90 as a metabolic regulator and encourages future research in this field.

Mitochondria are multicompetent actors in cellular metabolism, and mitochondrial chaperones are important factors. HSPA9 (Mortalin), a mitochondrial HSP70 family member, is involved in the quality control of proteins imported into the mitochondrial matrix. HSPA9 also senses oxidative stress and controls the activation of the antioxidant pathway [132], therefore playing a central role in the mitochondrial stress response. The targeting of mitochondrial chaperones could be envisioned as sensitivity to proteostasis inhibition strategies, commonly used in relapsed MM or MCL patients through bortezomib treatment, which relies on mitochondrial metabolism [133]. This hypothesis is sustained by the fact that inhibition of HSPA9 by HSP70 allosteric inhibitors alleviates proteasome inhibitor resistance in MM cells [134,135]. Globally, HSP70 family members are also good target candidates, as resistance to Bortezomib therapy is associated with their up-regulation [135,136].

7. HSP Are Chaperones of DNA Repair and Sequesters of Apoptotic Actors

DNA damage can result from environmental or endogenous stress, consequently initiating several mechanisms of DNA repair to maintain cells' integrity and survival. The ability of HSPs to promote DNA repair in several cancers has been recently reviewed [137,138]. Here, we will focus on their role in leukemia and lymphomas (Figure 2). Several mechanisms are involved in DNA repair, i.e., DNA damage detection, cell cycle arrest, and DNA synthesis [139]. PCNA (proliferating cell nuclear antigen), which favors the recruitment of DNA polymerase to DNA strand breaks, DDB1 (damage-specific DNA binding protein), which recognizes UV-induced DNA lesions, and MC2, a substrate of ATM and ATR upon DNA damage, are reduced upon HSP90 inhibition by SNX-7081 in CLL [140]. This promotion of DNA repair by HSP90 favors resistance to DNA-damaging drugs like fludarabine. Therefore, treatment with an HSP90 inhibitor restores the cells' sensitivity [141,142]. Similarly, in AML, whose treatment relies mostly on replicative stress induced by nucleoside analogues, HSP90 inhibition reduces Chk1 and Rad51, two HSP90 client proteins that induce cell cycle arrest and promote homologous recombination repair (HR), respectively. Accordingly, treatment of HSP90 inhibitors with cytarabine leads to a stronger cell cycle arrest [143]. Therefore, associating an HSP90 inhibitor with nucleoside analogues for the treatment of AML would permit increasing leukemic cells' responses and limiting the progression of the disease. Regulation of DNA replication and repair could also be modulated at the transcriptional level by E2F1, a client protein of HSP90 and HSP70 that assures the transcription of CDC6, CDC45, MCM4, MCM7, RIM1, and RIM2 in CLL [112,113]. The subtle equilibrium between pro- and anti-apoptotic proteins must be finely tuned. HSP are involved in this adjustment and could shift the balance toward cell survival in cancer cells through direct interaction with key apoptotic proteins. In hematopoietic cells, interaction of HSP70 with the BH3-only pro-apoptotic protein BIM via a BH3 domain has been shown [144]. A dual mechanism simultaneously appears; first, sequestration of BIM from Bcl2, which contributes to cell survival, and second, promotion of the chaperone activity of HSP70 with the aid of BIM, which serves as a co-chaperone. Recently, a specific inhibitor that targets the BH3 domain involved in HSP70-BIM interaction has been shown to disrupt this association and thereby overcome the BCR-ABL independent TKI resistance in CML [145]. Venetoclax is a Bcl2-selective inhibitor approved in 2016 as a treatment of CLL, AML, and shows promising results in MM. Recent studies have shown the efficacy of this inhibitor as a treatment for MCL patients refractory to ibrutinib [146]. However, the development of acquired resistance in some patients remains inevitable. It has been shown that HSP27 may be the cause of this relapse in patients treated with venetoclax for MCL, suggesting that targeting HSP27 could overcome this resistance [147]. Furthermore, in MCL, a robust synergy was observed between the HSP90 inhibitor, LAM-003 and venetoclax in FLT3-ITD AML cells, a particularly aggressive and resistant cell type [148].

8. Recent Progress in Clinical Targeting of HSP90

As said previously, HSP90 is known to facilitate the maturation, stabilization, and activation of over 200 client proteins, covering all cellular processes in cancers. Therefore, huge efforts have been made over the past decades to develop selective inhibitors that directly target HSP90. Most of the HSP90 inhibitors that are currently available and all that have been clinically assessed both in solid and hematological tumors, bind to the nucleotide binding pocket of the N-terminal domain and block the processing of client proteins by preventing ATP binding and hydrolysis.

HSP90 inhibition has shown, for example, some efficacy for the treatment of lymphomas. HSP90 inhibitor ganetespib enhances the sensitivity of MCL to Bruton's Tyrosine Kinase inhibitor ibrutinib [149]. Aberrant HSP90 expression in lymphocytes and HSP90 response to anti-PD-1 therapy in lymphoma patients have also been shown [150]. HSP90 inhibition sensitizes diffuse large B-cell lymphoma cells to Cisplatin [151]. Regarding AML, several HSP90 inhibitors affect cancer cells' growth. For instance, HSP90 inhibitors overcome the resistance to Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) inhibitors in AML [106]. HSP90 inhibitors NVP-AUY922 and ganetespib (STA-9090) have shown synergistic anti-leukemic activity with cytarabine in AML [94,104]. Alveospimycin (17-DMAG), administered intravenously twice weekly to AML patients, was also found to be effective [152]. Co-treatments with 17-AAG and a FLT3 kinase inhibitor or a histone deacetylase inhibitor are highly effective against human AML cells with mutant FLT3 [153,154]. Finally, HSP90 inhibition depletes DNA repair proteins to sensitize AML to nucleoside analog chemotherapeutics [143].

Other studies have also confirmed that there is an elevated expression of HSP90 in CML, suggesting that HSP90 could serve as a prognostic marker [20]. This also explains why several chemical inhibitors of HSP90 have been tested to treat CML [155]. In addition, targeting HSP90 dimerization is effective in imatinib-resistant CML [100]. ACY-1215 suppresses the proliferation and induces the apoptosis of CML cells via the ROS/P TEN/Akt pathway [156]. Preclinical evaluation of the HSP90 inhibitor SNX-5422 in Ibrutinib-resistant CLL has furthermore been described, and destabilization of ROR1 enhances the activity of Ibrutinib against CLL in vivo [64,157].

Regarding ALL, the HSP90 inhibitor PU-H71 has also been shown to be effective in treating T-ALL patient samples that express a high level of NOTCH1 (notch receptor 1) [158]. TAS-116 (pimipitespib), a HSP90 inhibitor, shows efficacy in preclinical models of adult T-ALL [159].

It is well known that HSP90 is involved in many essential cellular processes in non-malignant cells, such as protein maturation and stabilization, chaperoning of kinases, transcription factors, and other major signaling proteins [160,161]. Fortunately, tumor cells rely more on HSP for survival and proliferation than normal cells, limiting the inhibitors' side effects [161]. However, to limit these adverse events, one must pay attention to each HSP90 inhibitor's selectivity towards normal cells, as AUY922 does not preferentially impair the proliferation of cancer cells over normal cells, whereas the C-terminal Hsp90 modulator SM258 only impacts colon cancer cell lines [162]. In monotherapies, HSP90 inhibitors have shown some toxicity, limiting their efficacy, and tumor cells manage to develop resistance [161]. Therefore, combining low doses of HSP90 inhibitors with other anti-cancer drugs would be a solution in the future. Development of inhibitors that would target the tumor-specific conformation of HSP90 would also be a goal [162,163]. Current HSP inhibitors and their stage of clinical development are shown in Table 1.

Table 1. List of HSP inhibitors presented in this review, showing their targets, mechanisms of action, and clinical phases of development.

HSP Inhibitors	Target	Mechanism of Action	Phase of Development	Hematological Malignancies
Foldamers 33 and 52	HSP110	Binding to the ATP binding domain	Pre-clinical research	ABC DLBCL [67]
			Clinical: Phase I	NHL NCT01269593/MPN NCT01393509
PUH71 (Zelavespib)	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Pre-clinical research (with Ibrutinib)	ALL/ABC DLBCL [63]
			Pre-clinical research (with PI3K/mTOR inhibitors)	BL [93]
SNX-5422 (PF-04929113)	HSP90	Convert to SNX-2112 and binding to the ATP binding domain	Clinical: Phase I (with Ibrutinib)	CLL [64,157]
SNX-7081	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Pre-clinical research (with Fludarabine)	CLL [140]
NVP-AUY922 (Luminespib)	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Pre-clinical research (with Cytarabine)	AML [94,104]
Aminoxyrone	HSP90	Binding to C-terminal dimerization domain	Pre-clinical research	CML [100]
17-AAG (Tanespimycin)	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Clinical: Phase II	Hodgkin/MCL/ALCL/MM (NCT00117988)
			Pre-clinical research (with HDAC inhibitors)	AML/CML [125]
LAM-003 (MPC-3100)	HSP90	Convert to LAM-003A	Clinical: Phase I	AML [148]
Ganetespib	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Clinical: Phase I	MM (NCT01485835)
			Pre-clinical research (with Ibrutinib)	MCL [149]
			Pre-clinical research (with cytarabine)	CML [94]
17-DMAG (Alvespimycin)	HSP90	Binding to the ATP binding domain	Clinical: Phase I	Lymphoma & leukemia (NCT00089271)
			Pre-clinical research	AML CLL [71]
TAS-116 (Pimipespib)	HSP90	Binding to the N-terminal domain of HSP90	Pre-clinical research	ALL [159]
PFT- μ (Pifithrin- μ)	HSP70	Binding to the C-terminal domain of HSP70	Pre-clinical research	ALL/AML [97]
VER-155008	HSP70	Binding to the ATP binding domain	Pre-clinical research	MM [135]
JG-98	HSP70	Allosteric HSP70 inhibitors	Pre-clinical research	MM [134]
DTHIB	HSP1	Binding to the DNA binding domain	Pre-clinical research	AML [31]

AML: acute myeloid leukemia; ALL: acute lymphocytic leukemia; MM: multiple myeloma; CML: chronic myeloid leukemia; MCL: mantle cell lymphoma; ALCL: anaplastic large cell lymphoma; CLL: chronic lymphoblastic leukemia; MPN: myeloproliferative neoplasms; ABC-DLBCL: activated B cell diffuse large B cell lymphoma; NHL: non-Hodgkin lymphoma; BL: Burkitt lymphoma.

9. Discussion

Leukemia and lymphoma represent a diverse, although particular, group of cancers that poses specific challenges to researchers. We have presented here the diverse and major roles of HSPs in these diseases, which could help to better target oncogenic processes and contribute to improving therapies. Typical of B- and T-cell populations, BCR and TCR signaling networks are frequently and heavily mutated in lymphoid leukemias and lymphomas and strongly rely on HSPs to transmit sustained signaling. We have also described the stabilization of many oncogenes by HSPs that would otherwise endanger the viability of tumor cells.

We must not forget that the roles of HSP and HSF are not limited to cell signaling but provide critical support to gene expression and epigenetic regulation, particularly through HDAC6. In solid tumors, HSF1, the major HSP transcription factor, also controls various transcriptional programs such as those for cell-cycle regulation, RNA splicing, and resistance to apoptosis [164]. Very few studies have explored these non-classical functions of HSF1 in hematological malignancies. We have shown that HSF1 is highly expressed during myeloid differentiation, modulating PU.1 expression [165]. Of note, chronic myelomonocytic leukemia cells that are frequently associated with defective monocyte differentiation were lacking both HSF1 and PU.1 expression [165]. HSF1 is also known to be involved in metabolic regulation in hepatocellular carcinoma [166]. This could be explored in the context of leukemia and lymphomas as metabolic rewiring is modulated by HSP90 and HSPA9, promoting the production of large amounts of needed ATP [130]. Targeting HSF1 has been difficult to date due to the lack of specific inhibitors. However, recently, Dong et al. [167] identified a small molecule that directly binds to HSF1 and promotes the degradation of its nuclear and active forms. This promising new tool should soon be tested in leukemias and in lymphomas murine models to validate its clinical perspectives.

So far, most studies on the role of HSPs have focused on HSP90 and HSP70 for obvious reasons of cellular abundance and inhibitor availability. This must not overshadow the importance of other HSPs such as HSP27, mitochondrial HSPA9, or HSP110. The latter starts to reveal its critical involvement in the oncogenesis of lymphoma, such as the stabilization of several oncogenes like BCL6, C-MYC, and MyD88. The recent discovery of the first HSP110 inhibitors [67] would probably foster research in other types of hematological malignancies and the identification of more functions.

In this review, we focused on the intracellular functions of HSPs, but one must not forget the extracellular HSPs, either membrane-bound or secreted in the extracellular milieu. HSP70 and HSP110 are expressed on the surface of NHL or released within extracellular vesicles such as exosomes and have the ability to interact with various ligands expressed on immune cells like TLR2 or TLR4 [22,168,169]. These extracellular HSPs are mainly observed in tumors, both in cells and their microenvironment, and have the capacity to activate immune cells associated with immunosuppression [170–172]. Therefore, their targeting or neutralization should be envisioned. This could be achieved by CAR-T cell technology as proposed by Smith J. et al. for HSP70 (patent: EP3250605).

In B cell lymphomas, exosomes from plasma samples can be easily isolated and characterized, and their content might be used as a predictor of response to therapy [173]. Moreover, HSP27, HSP70 and HSP110 exosomes can be easily detected in body fluids, and their content is associated with a bad prognosis in several solid tumors [85,174–176]. Therefore, their detection in plasma samples from patients with leukemia and lymphoma may also be used as biomarkers to predict tumoral HSP expression and to monitor responses to therapies.

10. Conclusions

In conclusion, HSPs appears to play multiple and crucial roles in every aspect of leukemia and lymphoma biology, from specific cell signalling to epigenetic regulations. Identification of specific functions related to the oncogenesis of these cells must be pursued to provide better targeted and personalized therapies. Identification of new and more

specific inhibitors will also be beneficial for the entire anti-cancer field of research as HSPs are hallmarks of cancer resistance to intra- and extracellular stresses.

Author Contributions: Writing, Review and Editing, V.C.-G., M.D., R.Q., F.G., C.G. and G.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by La Ligue Nationale contre le Cancer EL2020.LNCC/CaG (VCG, CG and GJ), La fondation ARC pour la recherche sur la cancer (RQ, GJ), Ligue Nationale contre le Cancer comité régional (R.Q., G.J.), the French National Research Agency (C.G.), Institut National du Cancer PLBIO22-093 (C.G.), Fondation Ruban Rose (C.G.), Regional Council Burgundy-Franche-Comté FEDER BG24709 (HoST-110) (C.G.), Des tulipes contre le cancer, Châlon sur Saône (F.G.).

Acknowledgments: C.G. team is labeled by La Ligue Nationale contre le Cancer. We thank all volunteers and patients from “La ligue Nationale contre le Cancer”, “la fondation ARC”, and “Des tulipes contre le cancer” for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- De Moraes Hungria, V.T.; Chiattonne, C.; Pavlovsky, M.; Abenoza, L.M.; Agreda, G.P.; Armenta, J.; Arrais, C.; Flores, O.A.; Barroso, F.; Basquiera, A.L.; et al. Epidemiology of hematologic malignancies in real-world settings: Findings from the hemato-oncology Latin america observational registry study. *J. Glob. Oncol.* **2019**, *2019*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bhullar, K.S.; Lagarón, N.O.; McGowan, E.M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B.P.; Rupasinghe, H.P.V. Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cameiro, B.A.; El-Deiry, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 395–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jiang, P.; Sinha, S.; Aldape, K.; Hannenhalli, S.; Sahinalp, C.; Ruppin, E. Big data in basic and translational cancer research. *Nat. Rev. Cancer* **2022**, *22*, 625–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thomas, X.; Campos, L.; Mounier, C.; Cornillon, J.; Flandrin, P.; Le, Q.H.; Piselli, S.; Guyotat, D. Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **2005**, *29*, 1049–1058. [[CrossRef](#)]
- Pocaly, M.; Lagarde, V.; Etienne, G.; Ribeil, J.A.; Claverol, S.; Bonneau, M.; Moreau-Gaudry, F.; Guyonnet-Duperat, V.; Hermine, O.; Melo, J.V.; et al. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **2007**, *21*, 93–101. [[CrossRef](#)]
- Frezzato, F.; Raggi, F.; Martini, V.; Severin, F.; Trimarco, V.; Visentin, A.; Scomazzon, E.; Accordi, B.; Bresolin, S.; Piazza, F.; et al. HSP70/HSF1 axis, regulated via a PI3K/AKT pathway, is a druggable target in chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 3089–3100. [[CrossRef](#)]
- Sun, Q.; Ye, Y.; Gui, A.; Sun, X.; Xie, S.; Zhan, Y.; Chen, R.; Yan, Y.; Gu, J.; Qiu, S.; et al. MORTALIN-Ca2+ axis drives innate rituximab resistance in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Lett.* **2022**, *537*, 215678. [[CrossRef](#)]
- Frezzato, F.; Visentin, A.; Severin, F.; Pizzo, S.; Ruggeri, E.; Mouawad, N.; Martinello, L.; Pagnin, E.; Trimarco, V.; Tonini, A.; et al. Targeting of HSP70/HSF1 axis abrogates in vitro ibrutinib-resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers* **2021**, *13*, 5453. [[CrossRef](#)]
- Yang, L.; Cao, L.; Yang, M.; Tang, D.; Kang, R.; Min, X.; Zhu, S.; Yu, Y. Hsp27: A novel therapeutic target for pediatric M4/M5 acute myeloid leukemia. *Oncol. Rep.* **2013**, *29*, 1459–1466. [[CrossRef](#)]
- Shevtsov, M.; Huile, G.; Multhoff, G. Membrane heat shock protein 70: A theranostic target for cancer therapy. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2018**, *373*, 20160526. [[CrossRef](#)]
- Steiner, K.; Graf, M.; Hecht, K.; Reif, S.; Rossbacher, L.; Pfister, K.; Kolb, H.J.; Schmetzer, H.M.; Multhoff, G. High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with a worse prognosis. *Leukemia* **2006**, *20*, 2076–2079. [[CrossRef](#)]
- Yeh, C.H.; Tseng, R.; Hannah, A.; Estrov, Z.; Estey, E.; Kantarjian, H.; Albitar, M. Clinical correlation of circulating heat shock protein 70 in acute leukemia. *Leuk. Res.* **2010**, *34*, 605–609. [[CrossRef](#)]
- Berthenet, K.; Boudesco, C.; Collura, A.; Svrcek, M.; Richaud, S.; Hammann, A.; Causse, S.; Yousfi, N.; Wanherdrick, K.; Duplomb, L.; et al. Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1170264. [[CrossRef](#)]
- Höpken, U.E.; Rehm, A. Targeting the Tumor Microenvironment of Leukemia and Lymphoma. *Trends Cancer* **2019**, *5*, 351–364. [[CrossRef](#)]
- Yufu, Y.; Nishimura, J.; Nawata, H. High constitutive expression of heat shock protein 90 α in human acute leukemia cells. *Leuk. Res.* **1992**, *16*, 597–605. [[CrossRef](#)]
- Trentin, L.; Frasson, M.; Donella-Deana, A.; Frezzato, F.; Pagano, M.A.; Tibaldi, E.; Gattazzo, C.; Zambello, R.; Semenzato, G.; Brunati, A.M. Geldanamycin-induced Lyn dissociation from aberrant Hsp90-stabilized cytosolic complex is an early event in apoptotic mechanisms in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2008**, *112*, 4665–4674. [[CrossRef](#)]

18. Hachaneftoglu, A.; Gonullu, E.; Mehtap, O.; Keski, H.; Yavuz, M.; Ercin, C. Effect of heat shock protein-90 (HSP90) and vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival in acute lymphoblastic leukemia: An immunohistochemical study. *Med. Oncol.* **2011**, *28*, 846–851. [[CrossRef](#)]
19. Milani, M.; Laranjeira, A.B.A.; De Vasconcellos, J.F.; Brandalise, S.R.; Nowill, A.E.; Yunes, J.A. Plasma Hsp90 Level as a Marker of Early Acute Lymphoblastic Leukemia Engraftment and Progression in Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129298.
20. Žáčková, M.; Moučková, D.; Lopotová, T.; Ondráčková, Z.; Klamová, H.; Moravcová, J. Hsp90—A potential prognostic marker in CML. *Blood Cells, Mol. Dis.* **2013**, *50*, 184–189. [[CrossRef](#)]
21. Guo, A.; Lu, P.; Lee, J.; Zhen, C.; Chiosis, G.; Wang, Y.L. HSP90 stabilizes B-cell receptor kinases in a multi-client interactome: PU-H71 induces CLL apoptosis in a cytoprotective microenvironment. *Oncogene* **2017**, *36*, 3441–3449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zappasodi, R.; Bongarzone, I.; Ghedini, G.C.; Castagnoli, L.; Cabras, A.D.; Messina, A.; Tortoreto, M.; Tripodo, C.; Magni, M.; Carlo-Stella, C.; et al. Serological identification of HSP105 as a novel non-Hodgkin lymphoma therapeutic target. *Blood* **2011**, *118*, 4421–4430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zappasodi, R.; Ruggiero, G.; Guarnotta, C.; Tortoreto, M.; Tringali, C.; Cavanè, A.; Cabras, A.D.; Castagnoli, L.; Venerando, B.; Zaffaroni, N.; et al. HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **2015**, *125*, 1768–1771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Boudesco, C.; Verhoeven, E.; Martin, L.; Chassagne-Clement, C.; Salmi, L.; Mhaidly, R.; Pangault, C.; Fest, T.; Ramla, S.; Jardin, F.; et al. HSP110 sustains chronic NF-κB signaling in activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma through MyD88 stabilization. *Blood* **2018**, *132*, 510–520. [[CrossRef](#)]
25. Boudesco, C.; Rattier, T.; Garrido, C.; Jego, G. Do not stress, just differentiate: Role of stress proteins in hematopoiesis. *Cell Death Dis.* **2015**, *6*. [[CrossRef](#)]
26. Syafruddin, S.E.; Ling, S.; Low, T.Y.; Aiman Mohtar, M. More Than Meets the Eye: Revisiting the Roles of Heat Shock Factor 4 in Health and Diseases. *Biomolecules* **2021**, *11*, 523. [[CrossRef](#)]
27. Gomez-Pastor, R.; Burchfiel, E.T.; Thiele, D.J. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 4. [[CrossRef](#)]
28. Morán Luengo, T.; Mayer, M.P.; Rüdiger, S.G.D. The Hsp70–Hsp90 Chaperone Cascade in Protein Folding. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 164–177. [[CrossRef](#)]
29. Lang, B.J.; Guerrero, M.E.; Prince, T.L.; Okusha, Y.; Bonorino, C.; Calderwood, S.K. The functions and regulation of heat shock proteins; key orchestrators of proteostasis and the heat shock response. *Arch. Toxicol.* **2021**, *95*, 1943–1970. [[CrossRef](#)]
30. Kruta, M.; Sunshine, M.J.; Chua, B.A.; Fu, Y.; Chawla, A.; Dillingham, C.H.; Hidalgo San Jose, L.; De Jong, B.; Zhou, F.; Signer, R.A.J. Hsf1 promotes hematopoietic stem cell fitness and proteostasis in response to ex vivo culture stress and aging. *Cell Stem Cell* **2021**, *28*, 1950–1965.e6. [[CrossRef](#)]
31. Dong, Q.; Xiu, Y.; Wang, Y.; Hodgson, C.; Borcherdig, N.; Jordan, C.; Buchanan, J.; Taylor, E.; Wagner, B.; Leidinger, M.; et al. HSF1 is a driver of leukemia stem cell self-renewal in acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 6107. [[CrossRef](#)]
32. Nishida, Y.; Zhao, R.; Heese, L.E.; Akiyama, H.; Patel, S.; Jaeger, A.M.; Jacamo, R.O.; Kojima, K.; Ma, M.C.J.; Ruvolo, V.R.; et al. Inhibition of translation initiation factor eIF4a inactivates heat shock factor 1 (HSF1) and exerts anti-leukemia activity in AML. *Leukemia* **2021**, *35*, 2469–2481. [[CrossRef](#)]
33. Cyran, A.M.; Zhitkovich, A. Heat Shock Proteins and HSF1 in Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 860320. [[CrossRef](#)]
34. Yang, Z.; Wan, W.; Zhang, P.; Wang, S.; Zhao, Z.; Xue, J.; Yao, M.; Zhao, Y.; Zheng, W.; Niu, B.; et al. Crosstalk between HSF1 and STAT3 mediated by IL-8 autocrine signaling maintains the cancer stem cell phenotype in liver cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *38*, 138–152. [[CrossRef](#)]
35. Qin, T.; Chen, K.; Li, J.; Qian, W.; Xiao, Y.; Wu, E.; Ma, J.; Chen, Z.; Wang, Z.; Ma, Q.; et al. Heat shock factor 1 inhibition sensitizes pancreatic cancer to gemcitabine via the suppression of cancer stem cell-like properties. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *148*, 112713. [[CrossRef](#)]
36. Kabiri Renani, M.; Yousefi, R.; Koohkan, F.; Heidari, M.; Asad, S.; Hosseinzadeh, S.; Nazaran, M.H. Knockdown of HSF1 sensitizes resistant prostate cancer cell line to chemotherapy. *Mod. Med. Lab. J.* **2022**, *5*, 47–55. [[CrossRef](#)]
37. Östling, P.; Björk, J.K.; Roos-Mattjus, P.; Mezger, V.; Sistonen, L. Heat Shock Factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 7077–7086. [[CrossRef](#)]
38. Smith, R.S.; Takagishi, S.R.; Amici, D.R.; Metz, K.; Gayatri, S.; Alasady, M.J.; Wu, Y.; Brockway, S.; Taiberg, S.L.; Khalatyan, N.; et al. HSF2 cooperates with HSF1 to drive a transcriptional program critical for the malignant state. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, 6526. [[CrossRef](#)]
39. Tokunaga, Y.; Otsuyama, K.-I.; Kakuta, S.; Hayashida, N. Heat Shock Transcription Factor 2 Is Significantly Involved in Neurodegenerative Diseases, Inflammatory Bowel Disease, Cancer, Male Infertility, and Fetal Alcohol Spectrum Disorder: The Novel Mechanisms of Several Severe Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13763. [[CrossRef](#)]
40. Wang, X.Y.; Subject, J.R. High molecular weight stress proteins: Identification, cloning and utilisation in cancer immunotherapy. *Int. J. Hyperth.* **2013**, *29*, 364–375. [[CrossRef](#)]
41. Liu, T.; Daniels, C.K.; Cao, S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *136*, 354–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Mattoo, R.U.H.; Sharma, S.K.; Priya, S.; Finka, A.; Goloubinoff, P. Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 21399–21411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Whitesell, L.; Lindquist, S.L. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 761–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wu, J.; Liu, T.; Rios, Z.; Mei, Q.; Lin, X.; Cao, S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 226–256. [[CrossRef](#)]
45. Wang, L.; Xu, X.; Jiang, Z.; You, Q. Modulation of protein fate decision by small molecules: Targeting molecular chaperone machinery. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10*, 1904–1925. [[CrossRef](#)]
46. Treweek, T.M.; Meehan, S.; Ecroyd, H.; Carver, J.A. Small heat-shock proteins: Important players in regulating cellular proteostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 429–451. [[CrossRef](#)]
47. Chelouche-Lev, D.; Kluger, H.M.; Berger, A.J.; Rimm, D.L.; Price, J.E. α B-crystallin as a marker of lymph node involvement in breast carcinoma. *Cancer* **2004**, *100*, 2543–2548. [[CrossRef](#)]
48. Ivanov, O.; Chen, F.; Wiley, E.L.; Keswani, A.; Diaz, L.K.; Memmel, H.C.; Rademaker, A.; Gradishar, W.J.; Morrow, M.; Khan, S.A.; et al. α B-crystallin is a novel predictor of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *111*, 411–417. [[CrossRef](#)]
49. Takashi, M.; Katsuno, S.; Sakata, T.; Ohshima, S.; Kato, K. Different concentrations of two small stress proteins, α B crystallin and HSP27 in human urological tumor tissues. *Urol. Res.* **1998**, *26*, 395–399. [[CrossRef](#)]
50. Liu, X.L.; Guo, K.P.; Ma, F.; Xie, G.Y.; He, Y.; Hu, C.H. Expression profile of heat shock proteins in tissues and cells of lung adenocarcinoma. *J. Cent. South Univ. Medical Sci.* **2007**, *32*, 660–664.
51. Tang, Q.; Liu, Y.F.; Zhu, X.J.; Li, Y.H.; Zhu, J.; Zhang, J.P.; Feng, Z.Q.; Guan, X.H. Expression and prognostic significance of the α B-crystallin gene in human hepatocellular carcinoma. *Hum. Pathol.* **2009**, *40*, 300–305. [[CrossRef](#)]
52. Profitós-Pelejà, N.; Santos, J.C.; Marin-Niebla, A.; Roué, G.; Ribeiro, M.L. Regulation of B-Cell Receptor Signaling and Its Therapeutic Relevance in Aggressive B-Cell Lymphomas. *Cancers* **2022**, *14*, 860. [[CrossRef](#)]
53. Löwenberg, M.; Verhaar, A.P.; Bilderbeek, J.; van Marle, J.; Buttgerit, F.; Peppelenbosch, M.P.; van Deventer, S.J.; Hommes, D.W. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 1023–1029. [[CrossRef](#)]
54. Nika, K.; Soldani, C.; Salek, M.; Paster, W.; Gray, A.; Etzensperger, R.; Fugger, L.; Polzella, P.; Cerundolo, V.; Dushek, O.; et al. Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* **2010**, *32*, 766–777. [[CrossRef](#)]
55. Serafin, V.; Lissandron, V.; Buldini, B.; Bresolin, S.; Paganin, M.; Grillo, F.; Andriano, N.; Palmi, C.; Cazzaniga, G.; Marmiroli, S.; et al. Phosphoproteomic analysis reveals hyperactivation of mTOR/STAT3 and LCK/Calcineurin axes in pediatric early T-cell precursor ALL. *Leukemia* **2017**, *31*, 1007–1011. [[CrossRef](#)]
56. Buffière, A.; Accogli, T.; Saint-Paul, L.; Lucchi, G.; Uzan, B.; Ballerini, P.; Bastie, J.N.; Delva, L.; Pflumio, F.; Quéré, R. Saracatinib impairs maintenance of human T-ALL by targeting the LCK tyrosine kinase in cells displaying high level of lipid rafts. *Leukemia* **2018**, *32*, 2062–2065. [[CrossRef](#)]
57. Serafin, V.; Capuzzo, G.; Milani, G.; Minuzzo, S.A.; Pinazza, M.; Bortolozzi, R.; Bresolin, S.; Porcù, E.; Frasson, C.; Indraccolo, S.; et al. Glucocorticoid resistance is reverted by LCK inhibition in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2017**, *130*, 2750–2761. [[CrossRef](#)]
58. Taipale, M.; Krykbaeva, I.; Koeva, M.; Kayatekin, C.; Westover, K.D.; Karras, G.I.; Lindquist, S. Quantitative Analysis of Hsp90-Client Interactions Reveals Principles of Substrate Recognition. *Cell* **2012**, *150*, 987–1001. [[CrossRef](#)]
59. Mshaik, R.; Simonet, J.; Georgievski, A.; Jamal, L.; Bechoua, S.; Ballerini, P.; Bellaye, P.S.; Mamlam, Z.; Pais de Barros, J.P.; Geissler, A.; et al. HSP90 inhibitor NVP-BEP800 affects stability of SRC kinases and growth of T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood Cancer J.* **2021**, *11*, 61. [[CrossRef](#)]
60. Harr, M.W.; Caimi, P.F.; McColl, K.S.; Zhong, F.; Patel, S.N.; Barr, P.M.; Distelhorst, C.W. Inhibition of Lck enhances glucocorticoid sensitivity and apoptosis in lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 1381–1391. [[CrossRef](#)]
61. Mahmud, H.; Mendez, M.; Mukhopadhyay, B.; Holter-Chakrabarty, J.; Ghosh, A.K. HSP90 overexpression potentiates the B-cell receptor and fibroblast growth factor receptor survival signals in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* **2020**, *11*, 2037. [[CrossRef](#)]
62. Jacobson, C.; Kopp, N.; Layer, J.V.; Redd, R.A.; Tschuri, S.; Haebe, S.; Van Bodegom, D.; Bird, L.; Christie, A.L.; Christodoulou, A.; et al. HSP90 inhibition overcomes ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Blood* **2016**, *128*, 2517–2526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Goldstein, R.L.; Yang, S.N.; Taldone, T.; Chang, B.; Gerecitano, J.; Elenitoba-Johnson, K.; Shaknovich, R.; Tam, W.; Leonard, J.P.; Chiosis, G.; et al. Pharmacoproteomics identifies combinatorial therapy targets for diffuse large B cell lymphoma. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 4559–4571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Chen, T.L.; Harrington, B.; Truxall, J.; Wasmuth, R.; Prouty, A.; Sloan, S.; Lehman, A.M.; Sampath, D.; Orlmans, E.; Baiocchi, R.A.; et al. Preclinical evaluation of the Hsp90 inhibitor SNX-5422 in ibrutinib resistant CLL. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wilson, W.H.; Young, R.M.; Schmitz, R.; Yang, Y.; Pittaluga, S.; Wright, G.; Lih, C.J.; Williams, P.M.; Shaffer, A.L.; Gerecitano, J.; et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 922–926. [[CrossRef](#)]

66. Phelan, J.D.; Young, R.M.; Webster, D.E.; Roulland, S.; Wright, G.W.; Kasbekar, M.; Shaffer, A.L.; Ceribelli, M.; Wang, J.Q.; Schmitz, R.; et al. A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma. *Nature* **2018**, *560*, 387–391. [[CrossRef](#)]
67. Gozzi, G.J.; Gonzalez, D.; Boudesco, C.; Dias, A.M.M.; Gotthard, G.; Uyanik, B.; Dondaine, L.; Marcion, G.; Hermetet, F.; Denis, C.; et al. Selecting the first chemical molecule inhibitor of HSP110 for colorectal cancer therapy. *Cell Death Differ.* **2019**, *27*, 117–129. [[CrossRef](#)]
68. Walter, R.; Pan, K.T.; Doebele, C.; Comoglio, F.; Tomska, K.; Bohnenberger, H.; Young, R.M.; Jacobs, L.; Keller, U.; Bönig, H.; et al. HSP90 promotes Burkitt lymphoma cell survival by maintaining tonic B-cell receptor signaling. *Blood* **2017**, *129*, 598–608. [[CrossRef](#)]
69. Segges, P.; Corrêa, S.; Du Rocher, B.; Vera-Lozada, G.; Krsticevic, F.; Arce, D.; Sternberg, C.; Abdelhay, E.; Hassan, R. Targeting Hodgkin and Reed–Sternberg Cells with an Inhibitor of Heat-Shock Protein 90: Molecular Pathways of Response and Potential Mechanisms of Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 836. [[CrossRef](#)]
70. Taniguchi, H.; Hasegawa, H.; Sasaki, D.; Ando, K.; Sawayama, Y.; Imanishi, D.; Taguchi, J.; Imaizumi, Y.; Hata, T.; Tsukasaki, K.; et al. Heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 exerts potent activity against adult T-cell leukemia-lymphoma cells. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 1601–1608. [[CrossRef](#)]
71. Hertlein, E.; Wagner, A.J.; Jones, J.; Lin, T.S.; Maddocks, K.J.; Towns, W.H.; Goettl, V.M.; Zhang, X.; Jarjoura, D.; Raymond, C.A.; et al. 17-DMAG targets the nuclear factor- κ B family of proteins to induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia: Clinical implications of HSP90 inhibition. *Blood* **2010**, *116*, 45–53. [[CrossRef](#)]
72. Chen, I.T.; Hsu, P.H.; Hsu, W.C.; Chen, N.J.; Tseng, P.H. Polyubiquitination of Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1 (TAK1) at Lysine 562 Residue Regulates TLR4-mediated JNK and p38 MAPK Activation. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12300. [[CrossRef](#)]
73. Guo, D.; Zhang, A.; Huang, J.; Suo, M.; Zhong, Y.; Liang, Y. Suppression of HSP70 inhibits the development of acute lymphoblastic leukemia via TAK1/Egr-1. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *119*, 109399. [[CrossRef](#)]
74. Desterke, C.; Bennaceur-Griscelli, A.; Turhan, A.G. EGR1 dysregulation defines an inflammatory and leukemic program in cell trajectory of human-aged hematopoietic stem cells (HSC). *Stem Cell Res. Ther.* **2021**, *12*, 419. [[CrossRef](#)]
75. Kulkarni, R. Early Growth Response Factor 1 in Aging Hematopoietic Stem Cells and Leukemia. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 925761. [[CrossRef](#)]
76. Sanda, T.; Tyner, J.W.; Gutierrez, A.; Ngo, V.N.; Glover, J.; Chang, B.H.; Yost, A.; Ma, W.; Fleischman, A.G.; Zhou, W.; et al. TYK2-STAT1-BCL2 pathway dependence in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 564–577. [[CrossRef](#)]
77. Wöss, K.; Simonović, N.; Strobl, B.; Macho-Maschler, S.; Müller, M. Tyk2: An upstream kinase of stats in cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1728. [[CrossRef](#)]
78. Akahane, K.; Sanda, T.; Mansour, M.R.; Radimerski, T.; Deangelo, D.J.; Weinstock, D.M.; Look, A.T. HSP90 inhibition leads to degradation of the TYK2 kinase and apoptotic cell death in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2016**, *30*, 219–228. [[CrossRef](#)]
79. Baxter, E.J.; Scott, L.M.; Campbell, P.J.; East, C.; Fourouclas, N.; Swanton, S.; Vassiliou, G.S.; Bench, A.J.; Boyd, E.M.; Curtin, N.; et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **2005**, *365*, 1054–1061. [[CrossRef](#)]
80. Brkic, S.; Stivala, S.; Santopolo, A.; Szybinski, J.; Jungius, S.; Passweg, J.R.; Tsakiris, D.; Dirnhofer, S.; Hutter, G.; Leonards, K.; et al. Dual targeting of JAK2 and ERK interferes with the myeloproliferative neoplasm clone and enhances therapeutic efficacy. *Leukemia* **2021**, *35*, 2875–2884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Fiskus, W.; Verstovsek, S.; Manshour, T.; Rao, R.; Balusu, R.; Venkannagari, S.; Nalabothula, N.R.; Ha, K.; Smith, J.E.; Hembruff, S.L.; et al. Heat shock protein 90 inhibitor is synergistic with JAK2 inhibitor and overcomes resistance to JAK2-TKI in human myeloproliferative neoplasm cells. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 7347–7358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Marubayashi, S.; Koppikar, P.; Taldone, T.; Abdel-Wahab, O.; West, N.; Bhagwat, N.; Caldas-Lopes, E.; Ross, K.N.; Gönen, M.; Gozman, A.; et al. HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 3578–3593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Hobbs, G.; Litvin, R.; Ahn, J.; Mckenney, A.S.; Mauro, M.J.; Tallman, M.S.; Berman, E.; Heaney, M.L.; Levine, R.L.; Rampal, R.K. AUY922, a Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitor, Demonstrates Activity in Patients with Myeloproliferative Neoplasms (MPNs). *Blood* **2015**, *126*, 4075. [[CrossRef](#)]
84. Weigert, O.; Lane, A.A.; Bird, L.; Kopp, N.; Chapuy, B.; van Bodegom, D.; Toms, A.V.; Marubayashi, S.; Christie, A.L.; McKeown, M.; et al. Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 259–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Sevin, M.; Kubovcakova, L.; Pernet, N.; Causse, S.; Vitte, F.; Villeval, J.L.; Lacout, C.; Cordonnier, M.; Rodrigues-Lima, F.; Chanteloup, G.; et al. HSP27 is a partner of JAK2-STAT5 and a potential therapeutic target in myelofibrosis. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1431. [[CrossRef](#)]
86. Schoof, N.; Von Bonin, F.; Trümper, L.; Kube, D. HSP90 is essential for Jak-STAT signaling in classical Hodgkin lymphoma cells. *Cell Commun. Signal.* **2009**, *7*, 17. [[CrossRef](#)]
87. Khong, T.; Spencer, A. Targeting HSP 90 induces apoptosis and inhibits critical survival and proliferation pathways in multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1909–1917. [[CrossRef](#)]
88. Richardson, P.G.; Mitsiades, C.S.; Laubach, J.P.; Lonial, S.; Chanan-Khan, A.A.; Anderson, K.C. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. *Br. J. Haematol.* **2011**, *152*, 367–379. [[CrossRef](#)]

89. Xu, W.; Berning, P.; Lenz, G. Targeting B-cell receptor and PI3K signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **2021**, *138*, 1110–1119. [[CrossRef](#)]
90. Shouse, G.; Danilova, O.V.; Danilov, A.V. Current status of phosphoinositide-3 kinase inhibitors in blood cancers. *Curr. Opin. Oncol.* **2022**, *34*, 540–545. [[CrossRef](#)]
91. Sato, S.; Fujita, N.; Tsuruo, T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10832–10837. [[CrossRef](#)]
92. Basso, A.D.; Solit, D.B.; Chiosis, G.; Giri, B.; Tschlis, P.; Rosen, N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39858–39866. [[CrossRef](#)]
93. Giulino-Roth, L.; Van Besien, H.J.; Dalton, T.; Totonchy, J.E.; Rodina, A.; Taldone, T.; Bolaender, A.; Erdjument-Bromage, H.; Sadek, J.; Chadburn, A.; et al. Inhibition of Hsp90 suppresses PI3K/AKT/mTOR signaling and has antitumor activity in Burkitt lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 1779–1790. [[CrossRef](#)]
94. Lazenby, M.; Hills, R.; Burnett, A.K.; Zabkiewicz, J. The HSP90 inhibitor ganetespib: A potential effective agent for Acute Myeloid Leukemia in combination with cytarabine. *Leuk. Res.* **2015**, *39*, 617–624. [[CrossRef](#)]
95. Chen, L.; Monti, S.; Juszczyński, P.; Daley, J.; Chen, W.; Witzig, T.E.; Habermann, T.M.; Kutok, J.L.; Shipp, M.A. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **2008**, *111*, 2230–2237. [[CrossRef](#)]
96. Havranek, O.; Xu, J.; Köhrer, S.; Wang, Z.; Becker, L.; Comer, J.M.; Henderson, J.; Ma, W.; Ma, J.M.C.; Westin, J.R.; et al. Tonic B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **2017**, *130*, 995–1006. [[CrossRef](#)]
97. Kaiser, M.; Kühnl, A.; Reins, J.; Fischer, S.; Ortiz-Tanchez, J.; Schlee, C.; Mochmann, L.H.; Heesch, S.; Benlasfer, O.; Hofmann, W.K.; et al. Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin-1 in acute leukemia. *Blood Cancer J.* **2011**, *1*, e28. [[CrossRef](#)]
98. Peng, Y.; Huang, Z.; Zhou, F.; Wang, T.; Mou, K.; Feng, W. Effect of HSP90AB1 and CC domain interaction on Bcr-Abl protein cytoplasm localization and function in chronic myeloid leukemia cells. *Cell Commun. Signal.* **2021**, *19*, 71. [[CrossRef](#)]
99. Ju, H.Q.; Wang, S.X.; Xiang, Y.F.; Liu, Z.; Liu, J.Y.; Chen, Z.P.; Zeng, F.L.; Xia, M.; Liu, Z.H.; Xing, G.W.; et al. BJ-B11, a novel Hsp90 inhibitor, induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia K562 cells through the mitochondria-dependent pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *666*, 26–34. [[CrossRef](#)]
100. Bhatia, S.; Diedrich, D.; Frieg, B.; Ahlert, H.; Stein, S.; Bopp, B.; Lang, F.; Zang, T.; Kröger, T.; Ernst, T.; et al. Targeting HSP90 dimerization via the C terminus is effective in imatinib-resistant CML and lacks the heat shock response. *Blood* **2018**, *132*, 307–320. [[CrossRef](#)]
101. Jinwal, U.K.; Trotter, J.H.; Abisambra, J.F.; Koren, J.; Lawson, L.Y.; Vestal, G.D.; O’Leary, J.C.; Johnson, A.G.; Jin, Y.; Jones, J.R.; et al. The Hsp90 kinase co-chaperone Cdc37 regulates tau stability and phosphorylation dynamics. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 16976–16983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Reikvam, H.; Hatfield, K.J.; Ersvaer, E.; Hovland, R.; Skavland, J.; Gjertsen, B.T.; Petersen, K.; Bruslerud, Ø. Expression profile of heat shock proteins in acute myeloid leukaemia patients reveals a distinct signature strongly associated with FLT3 mutation status—Consequences and potentials for pharmacological intervention. *Br. J. Haematol.* **2012**, *156*, 468–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Peiris, M.N.; Meyer, A.N.; Nelson, K.N.; Bisom-Rapp, E.W.; Donoghue, D.J. Oncogenic fusion protein BCR-FGFR1 requires the breakpoint cluster region-mediated oligomerization and chaperonin Hsp90 for activation. *Haematologica* **2020**, *105*, 1262–1273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Wendel, T.; Zhen, Y.; Suo, Z.; Bruheim, S.; Wiedlocha, A. The novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 shows synergistic anti-leukemic activity with cytarabine in vivo. *Exp. Cell Res.* **2016**, *340*, 220–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Wu, Z.; Zhuang, H.; Yu, Q.; Zhang, X.; Jiang, X.; Lu, X.; Xu, Y.; Yang, L.; Wu, B.; Ma, A.; et al. Homoharringtonine Combined with the Heat Shock Protein 90 Inhibitor IPI504 in the Treatment of FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia. *Transl. Oncol.* **2019**, *12*, 801–809. [[CrossRef](#)]
106. Katayama, K.; Noguchi, K.; Sugimoto, Y. Heat shock protein 90 inhibitors overcome the resistance to Fms-like tyrosine kinase 3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **2018**, *9*, 34240–34258. [[CrossRef](#)]
107. Roh, S.H.; Kasembeli, M.; Galaz-Montoya, J.G.; Trnka, M.; Lau, W.C.Y.; Burlingame, A.; Chiu, W.; Tweardy, D.J. Chaperonin TRiC/CCT modulates the folding and activity of leukemogenic fusion oncoprotein AML1-ETO. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 4732–4741. [[CrossRef](#)]
108. Cerchiatti, L.C.; Lopes, E.C.; Yang, S.N.; Hatzi, K.; Bunting, K.L.; Tsikitas, L.A.; Mallik, A.; Robles, A.I.; Walling, J.; Varticovski, L.; et al. A purine scaffold Hsp90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1369–1376. [[CrossRef](#)]
109. Kuai, Y.; Gong, X.; Ding, L.; Li, F.; Lei, L.; Gong, Y.; Liu, Q.; Tan, H.; Zhang, X.; Liu, D.; et al. Wilms’ tumor 1-associating protein plays an aggressive role in diffuse large B-cell lymphoma and forms a complex with BCL6 via Hsp90. *Cell Commun. Signal.* **2018**, *16*, 50. [[CrossRef](#)]
110. Lee, J.; Zhang, L.L.; Wu, W.; Guo, H.; Li, Y.; Sukhanova, M.; Venkataraman, G.; Zhang, H.; Alikhan, M.; Lu, P.; et al. Activation of MYC, a bona fide client of HSP90, contributes to intrinsic ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Blood Adv.* **2018**, *2*, 2039–2051. [[CrossRef](#)]
111. Poole, C.J.; Zheng, W.; Lee, H.; Young, D.; Lodh, A.; Chadli, A.; van Riggelen, J. Targeting the MYC oncogene in burkitt lymphoma through HSP90 inhibition. *Cancers* **2018**, *10*, 448. [[CrossRef](#)]
112. Liu, H.; Lu, Z.; Shi, X.; Liu, L.; Zhang, P.; Golemis, E.A.; Tu, Z. HSP90 inhibition downregulates DNA replication and repair genes via E2F1 repression. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 100996. [[CrossRef](#)]

113. Freisleben, F.; Modemann, F.; Muschhammer, J.; Stamm, H.; Brauneck, F.; Krispien, A.; Bokemeyer, C.; Kirschner, K.N.; Wellbrock, J.; Fiedler, W. Mebendazole mediates proteasomal degradation of GLI transcription factors in acute myeloid leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10670. [\[CrossRef\]](#)
114. Wang, W.F.; Yan, L.; Liu, Z.; Liu, L.X.; Lin, J.; Liu, Z.Y.; Chen, X.P.; Zhang, W.; Xu, Z.Z.; Shi, T.; et al. HSP70-Hrd1 axis precludes the oncopressor potential of N-terminal misfolded Blimp-1s in lymphoma cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 363. [\[CrossRef\]](#)
115. Frisan, E.; Vandekerckhove, J.; De Thonel, A.; Pierre-Eugène, C.; Sternberg, A.; Arlet, J.B.; Floquet, C.; Gyan, E.; Kosmider, O.; Dreyfus, F.; et al. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2012**, *119*, 1532–1542. [\[CrossRef\]](#)
116. Pekarsky, Y.; Palamarchuk, A.; Maximov, V.; Efanov, A.; Nazaryan, N.; Santanam, U.; Rassenti, L.; Kipps, T.; Croce, C.M. Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19643–19648. [\[CrossRef\]](#)
117. Paduano, F.; Gaudio, E.; Mensah, A.A.; Pinton, S.; Bertoni, F.; Trapasso, F. T-Cell Leukemia/Lymphoma 1 (TCL1): An oncogene regulating multiple signaling pathways. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 317. [\[CrossRef\]](#)
118. Gaudio, E.; Paduano, F.; Ngankou, A.; Lovat, F.; Fabbri, M.; Sun, H.L.; Gasparini, P.; Efanov, A.; Peng, Y.; Zanasi, N.; et al. Heat shock protein 70 regulates Tcl1 expression in leukemia and lymphomas. *Blood* **2013**, *121*, 351–359. [\[CrossRef\]](#)
119. Cheng, Y.; He, C.; Wang, M.; Ma, X.; Mo, F.; Yang, S.; Han, J.; Wei, X. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2019**, *4*, 62. [\[CrossRef\]](#)
120. Kempf, J.M.; Weser, S.; Bartoschek, M.D.; Metzeler, K.H.; Vick, B.; Herold, T.; Völse, K.; Mattes, R.; Scholz, M.; Wange, L.E.; et al. Loss-of-function mutations in the histone methyltransferase EZH2 promote chemotherapy resistance in AML. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 5838. [\[CrossRef\]](#)
121. Göllner, S.; Oellerich, T.; Agrawal-Singh, S.; Schenk, T.; Klein, H.U.; Rohde, C.; Pabst, C.; Sauer, T.; Lerdrup, M.; Tavor, S.; et al. Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 69–78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
122. Bali, P.; Pranpat, M.; Bradner, J.; Balasis, M.; Fiskus, W.; Guo, F.; Rocha, K.; Kumaraswamy, S.; Boyapalle, S.; Atadja, P.; et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: A novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26729–26734. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
123. Liu, P.; Xiao, J.; Wang, Y.; Song, X.; Huang, L.; Ren, Z.; Kitazato, K.; Wang, Y. Posttranslational modification and beyond: Interplay between histone deacetylase 6 and heat-shock protein 90. *Mol. Med.* **2021**, *27*, 110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Ding, H.; Peterson, K.L.; Correia, C.; Koh, B.; Schneider, P.A.; Nowakowski, G.S.; Kaufmann, S.H. Histone deacetylase inhibitors interrupt HSP90•RASGRP1 and HSP90•CRAF interactions to upregulate BIM and circumvent drug resistance in lymphoma cells. *Leukemia* **2017**, *31*, 1593–1602. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
125. Rao, R.; Fiskus, W.; Yang, Y.; Lee, P.; Joshi, R.; Fernandez, P.; Mandawat, A.; Atadja, P.; Bradner, J.E.; Bhalla, K. HDAC6 inhibition enhances 17-AAG mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood* **2008**, *112*, 1886–1893. [\[CrossRef\]](#)
126. Ojha, R.; Huang, H.L.; HuangFu, W.C.; Wu, Y.W.; Nepali, K.; Lai, M.J.; Su, C.J.; Sung, T.Y.; Chen, Y.L.; Pan, S.L.; et al. 1-Aroylindoline-hydroxamic acids as anticancer agents, inhibitors of HSP90 and HDAC. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 667–677. [\[CrossRef\]](#)
127. Culjkovic-Kraljic, B.; Fernando, T.M.; Marullo, R.; Calvo-Vidal, N.; Verma, A.; Yang, S.N.; Tabbò, F.; Gaudio, M.; Zahreddine, H.; Goldstein, R.L.; et al. Combinatorial targeting of nuclear export and translation of RNA inhibits aggressive B-cell lymphomas. *Blood* **2016**, *127*, 858–868. [\[CrossRef\]](#)
128. Isaacs, J.S. Hsp90 as a “Chaperone” of the Epigenome: Insights and Opportunities for Cancer Therapy. In *Advances in Cancer Research*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; Volume 129, pp. 107–140. ISBN 9780128022900.
129. Kirsch, B.J.; Chang, S.J.; Betenbaugh, M.J.; Le, A. Non-Hodgkin Lymphoma Metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2021**, *1311*, 103–116.
130. Calvo-Vidal, M.N.; Zamponi, N.; Krumsiek, J.; Stockslager, M.A.; Revuelta, M.V.; Phillip, J.M.; Marullo, R.; Tikhonova, E.; Kotlov, N.; Patel, J.; et al. Oncogenic HSP90 facilitates metabolic alterations in aggressive B-cell lymphomas. *Cancer Res.* **2021**, *81*, 5202. [\[CrossRef\]](#)
131. Pedley, A.M.; Boylan, J.P.; Chan, C.Y.; Kennedy, E.L.; Kyoung, M.; Benkovic, S.J. Purine biosynthetic enzymes assemble into liquid-like condensates dependent on the activity of chaperone protein HSP90. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 101845. [\[CrossRef\]](#)
132. Tai-Nagara, I.; Matsuoka, S.; Ariga, H.; Suda, T. Mortalin and DJ-1 coordinately regulate hematopoietic stem cell function through the control of oxidative stress. *Blood* **2014**, *123*, 41–50. [\[CrossRef\]](#)
133. Tsvetkov, P.; Detappe, A.; Cai, K.; Keys, H.R.; Brune, Z.; Ying, W.; Thiru, P.; Reidy, M.; Kugener, G.; Rossen, J.; et al. Mitochondrial metabolism promotes adaptation to proteotoxic stress. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 681–689. [\[CrossRef\]](#)
134. Ferguson, I.D.; Lin, Y.H.T.; Lam, C.; Shao, H.; Tharp, K.M.; Hale, M.; Kasap, C.; Mariano, M.C.; Kishishita, A.; Patiño Escobar, B.; et al. Allosteric HSP70 inhibitors perturb mitochondrial proteostasis and overcome proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cell Chem. Biol.* **2022**, *29*, 1288–1302.e7. [\[CrossRef\]](#)
135. Huang, L.; Wang, Y.; Bai, J.; Yang, Y.; Wang, F.; Feng, Y.; Zhang, R.; Li, F.; Zhang, P.; Lv, N.; et al. Blockade of HSP70 by VER-155008 synergistically enhances bortezomib-induced cytotoxicity in multiple myeloma. *Cell Stress Chaperones* **2020**, *25*, 357–367. [\[CrossRef\]](#)

136. Li, J.; Zhang, X.; Shen, H.; Guo, J.; Wang, X.; Liu, J. Bortezomib promotes apoptosis of multiple myeloma cells by regulating HSP27. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 2410–2418. [[CrossRef](#)]
137. Dubrez, L.; Causse, S.; Borges Bonan, N.; Dumétier, B.; Garrido, C. Heat-shock proteins: Chaperoning DNA repair. *Oncogene* **2020**, *39*, 516–529. [[CrossRef](#)]
138. Sottile, M.L.; Nadin, S.B. Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: An updated overview. *Cell Stress Chaperones* **2018**, *23*, 303–315. [[CrossRef](#)]
139. Chao, H.X.; Poovey, C.E.; Privette, A.A.; Grant, G.D.; Chao, H.Y.; Cook, J.G.; Purvis, J.E. Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. *Cell Syst.* **2017**, *5*, 445–459.e5. [[CrossRef](#)]
140. Che, Y.; Best, O.G.; Zhong, L.; Kaufman, K.L.; MacTier, S.; Raftery, M.; Graves, L.M.; Mulligan, S.P.; Christopherson, R.I. Hsp90 inhibitor SNX-7081 dysregulates proteins involved with DNA repair and replication and the cell cycle in human chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 1710–1722. [[CrossRef](#)]
141. Best, O.G.; Che, Y.; Singh, N.; Forsyth, C.; Christopherson, R.I.; Mulligan, S.P. The Hsp90 inhibitor SNX-7081 synergizes with and restores sensitivity to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells with lesions in the TP53 pathway: A potential treatment strategy for fludarabine refractory disease. *Leuk. Lymphoma* **2012**, *53*, 1367–1375. [[CrossRef](#)]
142. Kaufman, K.L.; Jenkins, Y.; Alomari, M.; Mirzaei, M.; Giles Best, O.; Pascovici, D.; Mactier, S.; Mulligan, S.P.; Haynes, P.A.; Christopherson, R.I. The Hsp90 inhibitor SNX-7081 is synergistic with fludarabine nucleoside via DNA damage and repair mechanisms in human, p53-negative chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **2015**, *6*, 40981–40997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Lai, T.H.; Mitchell, S.; Wu, P.J.; Orwick, S.; Liu, C.; Ravikrishnan, J.; Woyach, J.; Mims, A.; Plunkett, W.; Pudukkoti, V.K.; et al. HSP90 inhibition depletes DNA repair proteins to sensitize acute myelogenous leukemia to nucleoside analog chemotherapeutics. *Leuk. Lymphoma* **2019**, *60*, 2308–2311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Guo, Z.; Song, T.; Wang, Z.; Lin, D.; Cao, K.; Liu, P.; Feng, Y.; Zhang, X.; Wang, P.; Yin, F.; et al. The chaperone Hsp70 is a BH3 receptor activated by the pro-apoptotic Bim to stabilize anti-apoptotic clients. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 12900–12909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Song, T.; Guo, Y.; Xue, Z.; Guo, Z.; Wang, Z.; Lin, D.; Zhang, H.; Pan, H.; Zhang, X.; Yin, F.; et al. Small-molecule inhibitor targeting the Hsp70-Bim protein–protein interaction in CML cells overcomes BCR-ABL-independent TKI resistance. *Leukemia* **2021**, *35*, 2862–2874. [[CrossRef](#)]
146. Eyre, T.A.; Walter, H.S.; Iyengar, S.; Follows, G.; Cross, M.; Fox, C.P.; Hodson, A.; Coats, J.; Narat, S.; Morley, N.; et al. Efficacy of venetoclax monotherapy in patients with relapsed, refractory mantle cell lymphoma after Bruton tyrosine kinase inhibitor therapy. *Haematologica* **2019**, *104*, e68. [[CrossRef](#)]
147. Che, Y.; Wang, W.; Liu, Y.; Lee, H.-H.; Li, Y.; Chen, Z.; McIntosh, J.; Jiang, C.; Yao, Y.; Wang, M. HSP27 Promotes Mantle Cell Lymphoma Growth and Mediates Resistance to Venetoclax. *Blood* **2022**, *140*, 6405–6406. [[CrossRef](#)]
148. Beeharry, N.; Landrette, S.; Grotzke, J.; Gayle, S.; Hernandez, M.; Halene, S.; Young, P.R.; Miller, L.L.; Xu, T.; Rothberg, J.; et al. LAM-003, a Novel Oral Heat Shock Protein 90 Inhibitor for Treatment of Acute Myeloid Leukemia, Including Wild-Type and FMS-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3)-Mutant Disease. *Blood* **2019**, *134*, 2664. [[CrossRef](#)]
149. Lu, Z.; Wang, Z.; Tu, Z.; Liu, H. HSP90 Inhibitor Ganetespib Enhances the Sensitivity of Mantle Cell Lymphoma to Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 864194. [[CrossRef](#)]
150. Albakova, Z.; Mangasarova, Y.; Albakov, A.; Nikulina, E.; Kravchenko, S.; Sapozhnikov, A. Aberrant HSP90 Expression in Lymphocytes and HSP90 Response to Anti-PD-1 Therapy in Lymphoma Patients. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 893137. [[CrossRef](#)]
151. Schmidt, L.; Issa, I.I.; Haraldsdóttir, H.; Hald, J.L.; Schmitz, A.; Due, H.; Dybkær, K. Hsp90 inhibition sensitizes DLBCL cells to cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2022**, *89*, 431. [[CrossRef](#)]
152. Lancet, J.E.; Gojo, I.; Burton, M.; Quinn, M.; Tighe, S.M.; Kersey, K.; Zhong, Z.; Albitar, M.X.; Bhalla, K.; Hannah, A.L.; et al. 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* **2010**, *24*, 699–705. [[CrossRef](#)]
153. George, P.; Bali, P.; Cohen, P.; Tao, J.; Guo, F.; Sigua, C.; Vishvanath, A.; Fiskus, W.; Scuto, A.; Annavarapu, S.; et al. Cotreatment with 17-allylamino-demethoxygeldanamycin and FLT-3 kinase inhibitor PKC412 is highly effective against human acute myelogenous leukemia cells with mutant FLT-3. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3645–3652. [[CrossRef](#)]
154. George, P.; Bali, P.; Annavarapu, S.; Scuto, A.; Fiskus, W.; Guo, F.; Sigua, C.; Sondarva, G.; Moscinski, L.; Atadja, P.; et al. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood* **2005**, *105*, 1768–1776. [[CrossRef](#)]
155. Khajapeer, K.V.; Baskaran, R. Hsp90 Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk. Res. Treatment* **2015**, 2015. [[CrossRef](#)]
156. Qin, Y.; Liang, Y.; Jiang, G.; Peng, Y.; Feng, W. ACY-1215 suppresses the proliferation and induces apoptosis of chronic myeloid leukemia cells via the ROS/PTEEN/Akt pathway. *Cell Stress Chaperones* **2022**, *27*, 383–396. [[CrossRef](#)]
157. Liu, Z.; Liu, J.; Zhang, T.; Shi, M.; Chen, X.; Chen, Y.; Yu, J. Destabilization of ROR1 enhances activity of Ibrutinib against chronic lymphocytic leukemia in vivo. *Pharmacol. Res.* **2020**, *151*, 104512. [[CrossRef](#)]
158. Kourtis, N.; Lazaris, C.; Hockemeyer, K.; Baladrán, J.C.; Jimenez, A.R.; Mullenders, J.; Gong, Y.; Trimarchi, T.; Bhatt, K.; Hu, H.; et al. Oncogenic hijacking of the stress response machinery in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1157. [[CrossRef](#)]

159. Ikebe, E.; Shimosaki, S.; Hasegawa, H.; Iha, H.; Tsukamoto, Y.; Wang, Y.; Sasaki, D.; Imaizumi, Y.; Miyazaki, Y.; Yanagihara, K.; et al. TAS-116 (pimitepsib), a heat shock protein 90 inhibitor, shows efficacy in preclinical models of adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* **2022**, *113*, 684–696. [[CrossRef](#)]
160. Gvozdenov, Z.; Kolhe, J.; Freeman, B.C. The nuclear and DNA-associated molecular chaperone network. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**, *11*, a034009. [[CrossRef](#)]
161. Ren, X.; Li, T.; Zhang, W.; Yang, X. Targeting Heat-Shock Protein 90 in Cancer: An Update on Combination Therapy. *Cells* **2022**, *11*, 2556. [[CrossRef](#)]
162. Wang, Y.; Koay, Y.C.; McAlpine, S.R. How selective are Hsp90 inhibitors for cancer cells over normal cells? *ChemMedChem* **2017**, *12*, 353–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Birbo, B.; Madu, E.E.; Madu, C.O.; Jain, A.; Lu, Y. Role of hsp90 in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Mendillo, M.L.; Santagata, S.; Koeva, M.; Bell, G.W.; Hu, R.; Tamimi, R.M.; Fraenkel, E.; Ince, T.A.; Whitesell, L.; Lindquist, S. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell* **2012**, *150*, 549–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Jego, G.; Lanneau, D.; De Thonel, A.; Berthenet, K.; Hazoumé, A.; Droin, N.; Hamman, A.; Girodon, F.; Bellaye, P.S.; Wettstein, G.; et al. Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. *Leukemia* **2014**, *28*, 1676–1686. [[CrossRef](#)]
166. Jin, X.; Moskophidis, D.; Mivechi, N.F. Heat Shock Transcription Factor 1 Is a Key Determinant of HCC Development by Regulating Hepatic Steatosis and Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 91–103. [[CrossRef](#)]
167. Dong, B.; Jaeger, A.M.; Hughes, P.F.; Loiselle, D.R.; Spencer Hauck, J.; Fu, Y.; Haystead, T.A.; Huang, J.; Thiele, D.J. Targeting therapy-resistant prostate cancer via a direct inhibitor of the human heat shock transcription factor 1. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eabb5647. [[CrossRef](#)]
168. Jego, G.; Chiron, D.; Berthenet, K.; Pellat-Deceunynck, C. Modulation of normal and malignant plasma cells function by toll-like receptors. *Front. Biosci—Elite.* **2012**, *4*, 2289–2301. [[CrossRef](#)]
169. Chalmin, F.; Ladoire, S.; Mignot, G.; Vincent, J.; Bruchard, M.; Remy-Martin, J.P.; Boireau, W.; Rouleau, A.; Simon, B.; Lanneau, D.; 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*, 457–471. [[CrossRef](#)]
170. Gobbo, J.; Marcion, G.; Cordonnier, M.; Dias, A.M.M.M.; Pernet, N.; Hammann, A.; Richaud, S.; Mjahed, H.; Isambert, N.; Clause, V.; et al. Restoring Anticancer Immune Response by Targeting Tumor-Derived Exosomes With a HSP70 Peptide Aptamer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108*, djv330. [[CrossRef](#)]
171. Marcion, G.; Hermetet, F.; Neiers, F.; Uyanik, B.; Dondaine, L.; Dias, A.M.M.; Da Costa, L.; Moreau, M.; Bellaye, P.S.; Collin, B.; et al. Nanofitins targeting heat shock protein 110: An innovative immunotherapeutic modality in cancer. *Int. J. Cancer* **2021**, *148*, 3019–3031. [[CrossRef](#)]
172. Regimbeau, M.; Abrey, J.; Vautrot, V.; Causse, S.; Gobbo, J.; Garrido, C. Heat shock proteins and exosomes in cancer theranostics. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *86*, 46–57. [[CrossRef](#)]
173. Provencio, M.; Rodríguez, M.; Cantos, B.; Sabin, P.; Quero, C.; García-Arroyo, F.R.; Rueda, A.; Maximiano, C.; Rodríguez-Abreu, D.; Sánchez, A.; et al. mRNA in exosomes as a liquid biopsy in non-Hodgkin Lymphoma: A multicentric study by the Spanish lymphoma oncology group. *Oncotarget* **2017**, *8*, 50949–50957. [[CrossRef](#)]
174. Cordonnier, M.; Chanteloup, G.; Isambert, N.; Seigneuric, R.; Fumoleau, P.; Garrido, C.; Gobbo, J. Exosomes in cancer theranostic: Diamonds in the rough. *Cell Adhes. Migr.* **2017**, *11*, 151–163. [[CrossRef](#)]
175. Chanteloup, G.; Cordonnier, M.; Isambert, N.; Bertaut, A.; Hervieu, A.; Hennequin, A.; Luu, M.; Zanetta, S.; Coudert, B.; Bengrine, L.; et al. Monitoring HSP70 exosomes in cancer patients' follow up: A clinical prospective pilot study. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1766192. [[CrossRef](#)]
176. Cordonnier, M.; Nardin, C.; Chanteloup, G.; Derangere, V.; Algros, M.P.; Arnould, L.; Garrido, C.; Aubin, F.; Gobbo, J. Tracking the evolution of circulating exosomal-PD-L1 to monitor melanoma patients. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1710899. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Annexe 2 : Article en 5^{ème} auteur, portant sur la mutation E571K de XPO1 dans le PMBL

Article

XPO1^{E571K} Mutation Modifies Exportin 1 Localisation and Interactome in B-Cell Lymphoma

Hadjer Miloudi ¹, Élodie Bohers ^{1,2}, François Guillonnet ³ , Antoine Taly ^{4,5} , Vincent Cabaud Gibouin ^{6,7} , Pierre-Julien Viailly ^{1,2} , Gaëtan Jégo ^{6,7} , Luca Grumolato ⁸ , Fabrice Jardin ^{1,2} and Brigitte Sola ^{1,*} 

¹ INSERM U1245, Ucaen, Normandie University, F-14000 Caen, France; hadjer.miloudi@unicaen.fr (H.M.); elodie.bohers@chb.unicancer.fr (E.B.); pierre-julien.viailly@chb.unicancer.fr (P.-J.V.); fabrice.jardin@chb.unicancer.fr (F.J.)

² Centre de lutte contre le Cancer Henri Becquerel, F-76000 Rouen, France

³ Plateforme Protéomique 3P5, Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 Paris, France; francois.guillonnet@parisdescartes.fr

⁴ Laboratoire de Biochimie Théorique, CNRS UPR 9030, Université de Paris, F-75005 Paris, France; taly@ibpc.fr

⁵ Institut de Biologie Physico-Chimique, Fondation Edmond de Rothschild, PSL Research University, F-75005 Paris, France

⁶ INSERM, LNC UMR1231, F-21000 Dijon, France; vincent.cabaud-gibouin@u-bourgogne.fr (V.C.G.); gaetan.jego@u-bourgogne.fr (G.J.)

⁷ Team HSP-Pathies, University of Burgundy and Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

⁸ INSERM U1239, Unirouen, Normandie University, F-76130 Mont-Saint-Aignan, France; luca.grumolato@univ-rouen.fr

* Correspondence: brigitte.sola@unicaen.fr; Tel.: +33-2-3156-8210

Received: 11 September 2020; Accepted: 28 September 2020; Published: 30 September 2020



Simple Summary: Almost 25% of patients with either primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL) or classical Hodgkin lymphoma (cHL) possess a recurrent mutation of the *XPO1* gene encoding the major nuclear export protein. The aim of our study was to assess the molecular function of the mutant *XPO1* protein. Using several cell models (including CRISPR–Cas9 edited cells) and high throughput techniques, we determined that the export capacity of the mutant *XPO1* was not altered. However, mutant *XPO1* accumulated in the cytoplasm due to its binding to importin $\beta 1$ (or IPO1). The targeting of *XPO1* is largely efficient for fighting haemopathies. The inhibition of IPO1 could open new therapeutic perspectives for B-cell lymphomas.

Abstract: The *XPO1* gene encodes exportin 1 (*XPO1*) that controls the nuclear export of cargo proteins and RNAs. Almost 25% of primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL) and classical Hodgkin lymphoma (cHL) cases harboured a recurrent *XPO1* point mutation (NM_003400, chr2:g61718472C>T) resulting in the E571K substitution within the hydrophobic groove of the protein, the site of cargo binding. We investigated the impact of the *XPO1*^{E571K} mutation using PMBL/cHL cells having various *XPO1* statuses and CRISPR–Cas9-edited cells in which the E571K mutation was either introduced or knocked-out. We first confirmed that the mutation was present in both *XPO1* mRNA and protein. We observed that the mutation did not modify the export capacity but rather the subcellular localisation of *XPO1* itself. In particular, mutant *XPO1* bound to importin $\beta 1$ modified the nuclear export/import dynamics of relevant cargoes.

Keywords: B-cell lymphoma; *XPO1*/CRM1; nuclear export; CRISPR–Cas9; proteomics; nuclear import; importin $\beta 1$; indirect immunofluorescence; proximity ligation assay

1. Introduction

Primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL) is an aggressive B-cell lymphoma clinically and molecularly distinct from germinal centre B-cell-like (GCB) and activated B-cell-like (ABC) subtypes of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) [1,2]. PMBL cells are characterized by genomic abnormalities that are also found in the classical form of Hodgkin lymphoma (cHL) [3]. These observations underline the molecular relationships between these two haematological malignancies [2]. We previously described a recurrent mutation of the *XPO1* gene occurring with the same frequency in both PMBL and cHL (25%) [4,5]. This mutation appears as a genetic feature of these two types of lymphoma, since it is present at low frequency or absent in GCB or ABC lymphomas [6].

XPO1 (previously known as CRM1, chromosome region maintenance 1) is the major eukaryotic nuclear export protein. XPO1 mediates the translocation of several types of RNAs, ribonucleoprotein complexes and more than 200 cargoes, including tumour suppressors and regulatory proteins [7]. Overexpression, deregulation or dysfunction of XPO1 have been reported in various types of cancer [7]. In haematologic malignancies, quantitative (amplification of *XPO1* or translocation) and qualitative (*XPO1* mutation) abnormalities have been described. However, although XPO1 overexpression is observed in myeloid and lymphoid lineages, in both acute and chronic diseases, mutations have been described only for PMBL [4], cHL [5] and, with a lower frequency, in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) [8,9] or DLBCL [4]. All reported *XPO1* mutations lead to a substitution of glutamate 571, most frequently to lysine.

Using PMBL and cHL cell lines with various *XPO1* statuses and CRISPR–Cas9-edited cells, we investigated the effects of the *XPO1*^{E571K} mutation on XPO1 interactome. We first confirmed that the mutation was present at the mRNA and protein levels. Strikingly, comparing PMBL/cHL cell lines and edited clones in which we replaced one wild-type (wt) allele with a mutant one or deleted a mutant allele, we observed that the accumulation of XPO1 at the perinuclear rim correlated with the presence of the mutant protein. We analysed the interactomes of both wt and mutant proteins and found that most cargoes were similar. However, some XPO1 partners were specifically associated with the wt or mutant proteins, and among them, the karyopherin β 1 (also known as importin β 1, KPNB1 or IPO1) was specifically associated with the *XPO1*^{E571K} form. We further confirmed the XPO1/IPO1 interaction with the proximity-ligation assay (PLA) and by using importazole, an inhibitor of the IPO1 receptor. Our data uncovered one functional impact of the E571K mutation that could be involved in the B-cell lymphoma physiopathology.

2. Results

2.1. PMBL and cHL Parental and Edited Cell Lines Display Various *XPO1* Status

Karpas 1106-P (hereafter referred to as K1106), MedB1 and U2940 PMBL cell lines and UH-01 cell line have been previously described [4,5]. The quantification of the mutant vs. wt alleles in PMBL/cHL cells was performed by genomic (g)DNA and RNA pyrosequencing (Tables S1 and S2). The percentages of the mutant and wt *XPO1* forms were similar in MedB1 cells, indicating that the cell line is heterozygous for *XPO1*, whereas only the wt *XPO1* allele was present in K1106 and U2940 cells. UH-01 cells exhibited a duplication of the mutant allele and one wt *XPO1* allele (Table S1). *XPO1* status was next confirmed by reverse transcriptase multiplex ligation-dependant probe amplification (RT-MLPA). Our data and previously published data [5,10–12] were compiled in the Table S3.

We used the CRISPR–Cas9 technology to establish several edited PMBL and cHL cells (see Supplementary Protocol and Supplementary Results). We first optimised a CRISPR–barcoding technique that allowed us to introduce the E571K mutation in the U2940 cell line (*XPO1*^{wt}) and to follow the population of edited cells (Figure S1a–c). However, despite the fact that the percentage of cells experiencing homology-directed repair (HDR) was correct (\approx 42%, Figure S1d), the number of edited cells decreased during the time-course of culture (Figure S1e). To select and enrich U2940 cells

having integrated the *XPO1*^{E571K} mutation, we took advantage of the fact that *XPO1*^{C528S}-mutant T cells are resistant to selinexor, an inhibitor of XPO1 [13]. We designed a strategy for introducing in the same cell the two close C528S and E571K mutations using megamers and two sgRNAs (Figure 1a, Table S4).

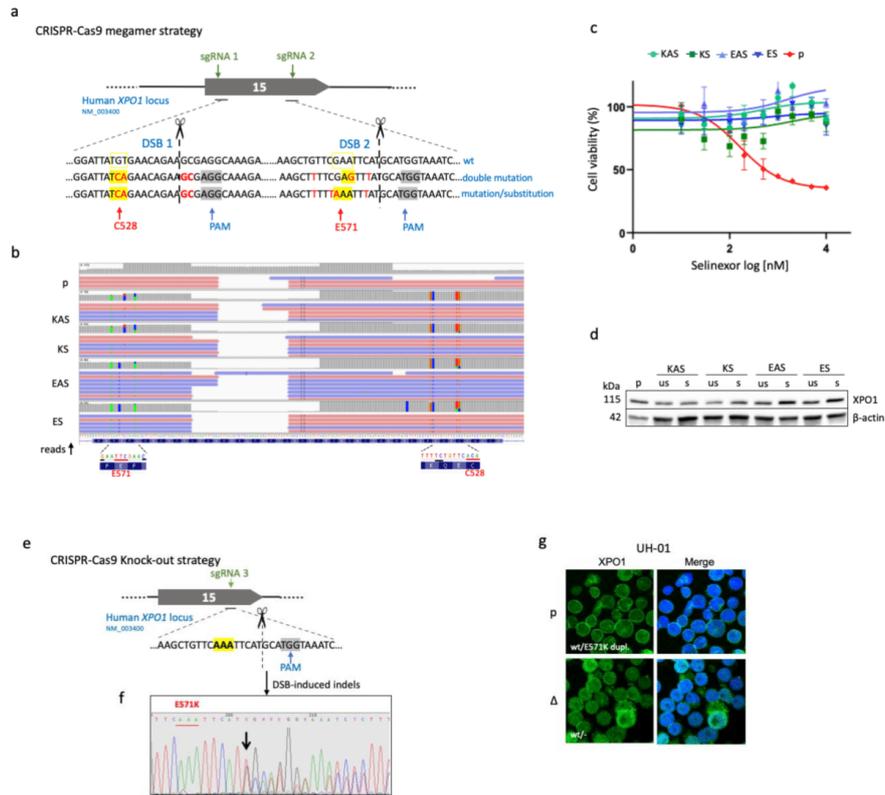


Figure 1. U2940-derived KAS and K clones expressed a wt and a C528S/E571K allele, UH-01Δ cells expressed only one wt allele. (a) For the CRISPR–Cas9 megamer strategy, we used two sgRNAs (in green) that respectively target the TGT and GAA codons (in yellow). We chose the PAMs (in grey) closest to the codons C528 and E571 to ensure a high HDR efficiency. After sgRNA 1, sgRNA 2 and PAM recognition, two double-strand breaks (DSBs) were generated by the Cas9 and cells undergoing HDR for megamer insertion between the DSBs. We used a 400 bp megamer that contained the C528S and E571K mutations and silent mutations serving as barcodes and preventing a second recognition of the modified target sites by the sgRNA (Tables S4 and S5). As a control we used a megamer containing the C528S mutation and the E571E substitution and silent mutations (Table S5). (b) The clones KAS (antisense orientation)/KS (sense orientation) and EAS (antisense orientation)/ES (sense orientation) generated by the CRISPR–Cas9 technique and the parental (p) cell line were analysed by NGS. The results are illustrated with an IGV (Integrative Genomics Viewer) view. The E571K and C528S XPO1 mutations (in red) are pointed out along the sequence with the silent mutations (in black) introduced. The numbers of reads are on the y-axis. The nucleotides are indicated on the x-axis. The sequence is reversed 3′–5′. The proportion of each nucleotide is represented as a coloured bar (A, in green; C, in blue; T, in red;

G, in orange). (c) Two weeks after the transfection, the four batches of KAS/KS and EAS/ES cells were cultured in the presence of selinexor (1 μ M) for selection. One week later, cells were assessed for selinexor sensitivity/resistance with an MTS test. Selinexor-selected cells and U2940 parental cells (in red) were treated for 48 h with various concentrations of selinexor (0.01–20 μ M) and cell viability was calculated. The experiment was performed once (due to a limited number of cells); each culture condition was done in triplicate. (d) XPO1 expression was analysed in selected (s) and unselected (us) cell batches along with the parental (p) U2940 cell line by western blotting (WB) with the indicated antibodies (Abs) (Table S7). An anti- β -actin Ab served as a control of charge and transfer. The anti-XPO1 Ab is directed against the C-terminal part of the XPO1 protein (residues 772–1071). (e) Schematic representation of the CRISPR–Cas9 knockout (KO) strategy set up for UH-01 cHL cells. We used the sgRNA 3 (Table S4, green arrow) that targets the E571K codon (in yellow) to delete the mutated E571K allele. The PAM site (in grey) was the same as the one chosen previously in (a). The E571K codon is highlighted in bold. (f) Three days after nucleofection, gDNA was sequenced by the Sanger method. The genomic sequence was modified by the insertion of nucleotides (arrowed) three bases upstream the PAM sequence allowing the generation of indels. (g) The expression of XPO1 was analysed by immunofluorescence (IF) in edited (Δ) and parental (p) cells with an anti-XPO1 Ab directed against the C-terminal part of the protein (residues 1025–1071) (Table S7). In turn, only the XPO1 protein encoded by the wt allele could be detected. Cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, in blue) and analysed by confocal microscopy (\times 180 magnification).

We designed single-strand oligonucleotides (ssODNs) bearing both C528S and E571K mutations (or C528S mutation and E571E substitution as a control) and silent mutations serving as barcodes and sense/antisense orientations for each construct (Table S5). Cells were transfected by nucleofection, and the resulting cells are referred to as KS and KAS and for the sense and antisense double mutants, respectively; ES and EAS for the corresponding controls. Cells were treated with selinexor. Two weeks later, the presence of mutations was verified by next-generation sequencing (NGS, Figure 1b). A sub-population of cells resistant to selinexor contained the two C528S/E571K mutations or the C528S/E571E mutation/substitution (Figure 1b,c) and expressed the XPO1 protein (Figure 1d). Edited KAS and KS cells were heterozygous for the C528S and E571K mutations, as determined by pyrosequencing, whereas as EAS and ES cells were homozygous for the C528S mutation (Table S6). We further used another CRISPR–Cas9 strategy to delete the mutant E571K allele in UH-01 cHL cells (Figure 1e). Insertions/deletions (indels) of the targeted region of the *XPO1* gene were confirmed by Sanger sequencing (Figure 1f). As estimated by the Surveyor assay, at least 28% of *XPO1* alleles experienced non-homologous end-joining (NHEJ, Figure S1f). The wild-type form of XPO1 was synthesised in UH-01-edited cells (referred to UH-01 Δ , Figure 1g). The *XPO1* gene was reported to be necessary for cell survival [14,15]. UH-01 Δ cells expressing only one wt *XPO1* allele were viable, although they grew slowly compared to the parental cells.

2.2. *XPO1*^{E571K} Mutation is Present at the mRNA and Protein Levels

To test whether the mutant gene is expressed in MedB1 cells (*XPO1*^{wt/E571K}), we used RT-PCR and amplified the relevant region in PMBL cells with the CM untransformed B-cell line as a control (Figure S2a). XPO1-PCR amplified fragments were next sequenced by the Sanger method. The nucleotide G (arrowed) was replaced by both an G and an A only in MedB1 cells (Figure 2a). This change corresponded to the chr2:g61719472C>T mutation described previously [4].

Whole-cell proteins were purified from PMBL and CM cells and analysed by WB. The level of XPO1 protein was similar in the PMBL cells and higher than in the control non tumoral CM cells (Figure 2b). We next optimized an immunoprecipitation (IP) protocol (Figure S2b) and XPO1 complexes were separated by SDS-PAGE. Subsequently, the most efficient IP conditions were used for trypsin digestion and mass spectrometry (MS) analysis on four biological replicates. Figure 2c shows tryptic digestion patterns for each cell line obtained out of the digested IP eluates after nano liquid chromatography–MS (see also Figures S3–S5). The black arrows point out position 571 for each covered cell line. A peptide

spanning residues 568–589 showed up (as seen in the top and bottom panels) while a shorter peptide spanning residues 572–589 showed up (as seen in the middle panel) indicating that, indeed, the E571K mutation created a new tryptic cleavage site three amino acids farther than the one already present at the existing lysine 568 (N-term side of the new lysine 571). We thus concluded that the XPO1-mutated protein is expressed in MedB1 cells with the same detectable amount as the wt protein in the two other cell lines.

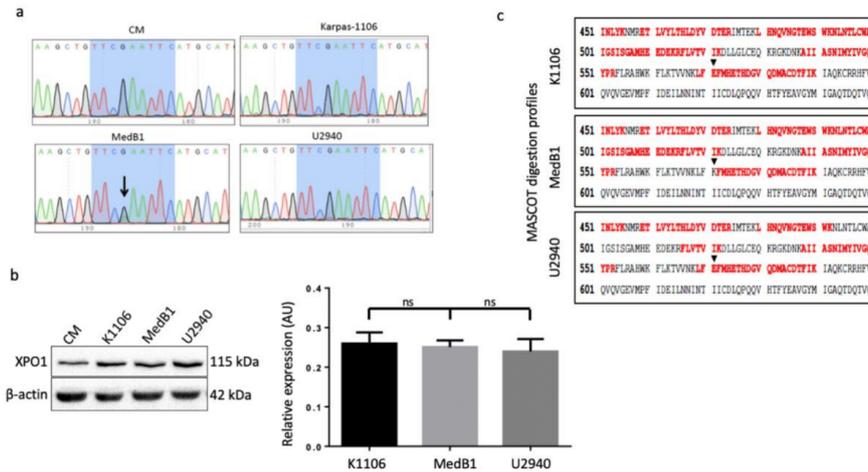
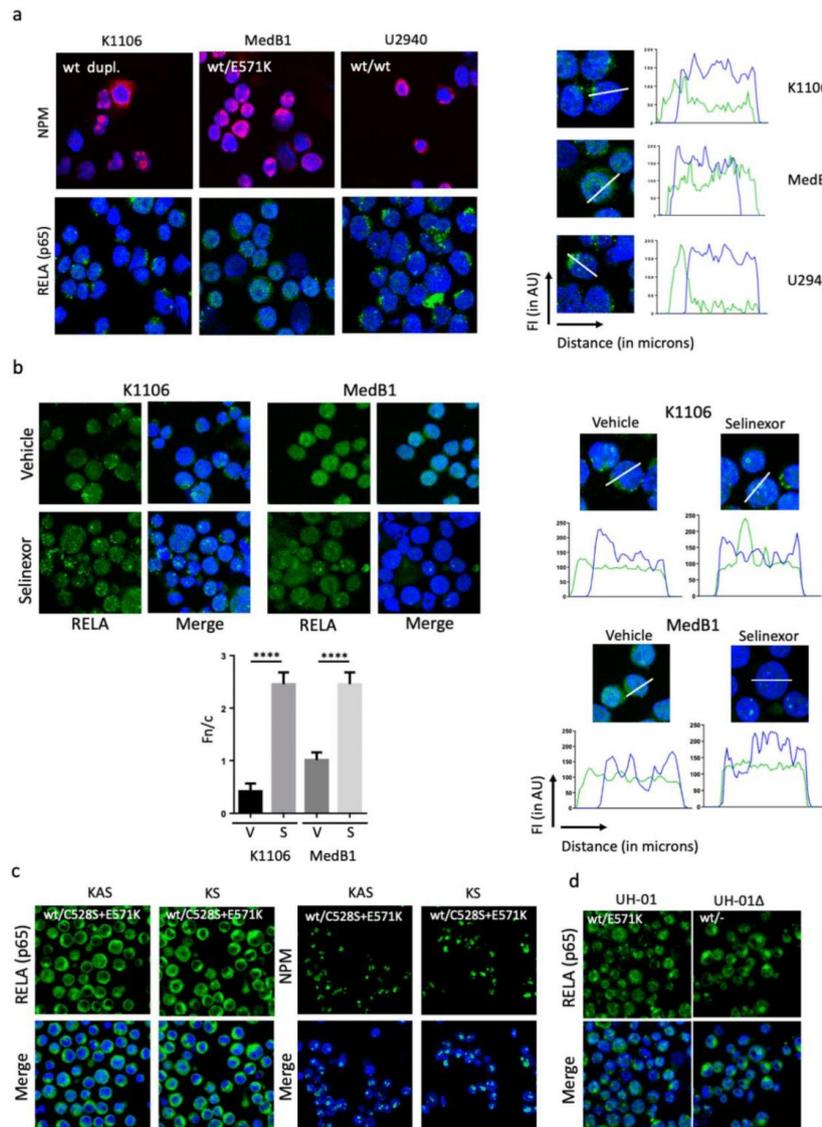


Figure 2. XPO1^{E571K} mutation is present in the mRNA and protein of MedB1 cells. (a) Total RNAs were purified from PMBL and CM cells. The relevant region of the XPO1 gene was amplified by RT-PCR with the primers presented in the Table S8. XPO1-PCR fragments were sequenced using the Sanger method. The resulting profiles are shown. The mutation present in MedB1 cells is arrowed. (b) Whole-cell proteins were purified from cultured cells, separated on SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose sheets. Blots were cut in strips and incubated with an anti-XPO1 Ab. An anti-β-actin Ab was used as a control of loading and transfer (Table S7). The experiment was done three times and the level of XPO1 protein expression was estimated by densitometry. ns, not significant with the *t*-test. (c) Whole-cell protein extracts were obtained from the three PMBL cell lines. XPO1 was immunoprecipitated with an anti-XPO1 Ab (70% of total proteins were immunoprecipitated using 0.15 μg of Ab as evaluated in Figure S2b), processed and submitted to mass spectrometry (MS). MS-sequenced peptides from XPO1 found by Mascot database matches are shown in red over the theoretical sequence in black. Black triangles indicate position 571 of the three sequences from the three cell lines. The Mascot minimum scored over 25 when the minimum Mascot score was 16 for *p* < 0.05. Relevant mass spectra annotations are available in Figures S3–S5.

2.3. Nuclear Export Function of XPO1 is Maintained in MedB1 Cells

To verify whether the XPO1^{E571K} protein is fully functional, we analysed the localisations of two XPO1 cargoes known to be relevant for lymphoma pathology: nucleophosmin (NPM) and RELA [16,17]. Immunostaining and indirect IF revealed that NPM was strictly nuclear, whereas RELA was both nuclear and cytoplasmic whatever the XPO1 status (Figure 3a). Two main XPO1 partners are necessary for nuclear export, RanBP1 and RanBP2 [18]. Both are expressed in the three cell lines (Figure S2c) excluding a major default of the nuclear export apparatus. We next analysed the effects of selinexor on RELA localisation in K1106 and MedB1 cells. We observed a nuclear accumulation of RELA in selinexor-treated cells (Figure 3b) indicating that XPO1 was inhibited, and in turn, functional in both cell lines. The subcellular localisation of RELA and its nuclear accumulation in selinexor-treated K1106 and MedB1 cells was confirmed by image processing with the ImageJ software and the calculation

of the Fn/c index. We further confirmed that RELA and NPM localisations were similar in U2940 (XPO1^{wt}) and U2940-derived KAS and KS edited clones having a XPO1^{wt/C526S/E571K} gene (Figure 3c). Moreover, RELA distribution was similar in UH-01 parental and edited (Δ) cells (Figure 3d). Our data indicated that the localisation of XPO1 cargoes was not impacted by the insertion or the deletion of the mutant allele. The E571K mutation has no major effect on the nuclear export conducted by XPO1.



Alexa Fluor 633-conjugated anti-mouse IgG or a goat Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG as a secondary Ab. Slides were counterstained with DAPI and analysed by confocal microscopy ($\times 180$ magnification). For the RELA staining, images were processed with the ImageJ software and the fluorescence intensity of each fluorophore was plotted along a line crossing one representative cell (white line). Data were exported to generate the curves of fluorescence intensity (FI, in arbitrary units on the y-axis) as a function of the distance (left to right, in pixels on the x-axis). Regarding NPM staining, the experiment was done three times for MedB1 and U2940 cells and twice for K1106 cells. Regarding RELA staining, the experiment was done four times for the three cell lines. (b) K1106 and MedB1 cells were treated with $1 \mu\text{M}$ selinexor for 24 h then harvested. Cells were analysed by IF for RELA expression and localisation by confocal microscopy ($\times 180$ magnification) as described in (a). Images were processed with the ImageJ software and exported. The curves of FI as a function of the distance were drawn as previously described. The nuclear accumulation of RELA in selinexor-treated (S) vs. vehicle-treated (V) K1106 and MedB1 cells was quantified according to Kuusisto et al. [19], as described in Section 4.3. The Fn/c was calculated from six independent fields covering at least 100 cells. The experiment was done three times. Presented data are means \pm SD. (c) U2940-derived KAS/KS clones were analysed by IF for RELA and NPM localisation as described in (a). (d) UH-01 parental and edited (Δ) cells were analysed by IF for RELA localisation as described in (a). Slides were analysed by confocal microscopy ($\times 180$ magnification). The experiments were done once due to the limited number of cells. ****, $p < 0.001$ with the *t*-test.

2.4. Wild-Type and Mutant XPO1 Proteins Localised in Different Compartments in PMBL Cells

We next analysed the subcellular distribution of XPO1 by IF. XPO1 was both nuclear and cytoplasmic in U2940 cells (XPO1^{wt}) and K1106 cells (XPO1^{dupl.}), whereas XPO1 accumulated at the nuclear membrane in MedB1 cells (XPO1^{wt/E571K}) (Figure 4a). This was confirmed when images were processed with the ImageJ software and the calculation of the Fn/c index. To confirm that the E571K mutation modified XPO1 distribution, we transiently transfected the human HEK-293 cells with expression plasmids coding for wt, E571G (a mutation found in CLL [9]) and E571K XPO1-coupled to the mCherry fluorophore. XPO1^{wt} was both nuclear and cytoplasmic like the XPO1^{E571G} mutant, whereas XPO1^{E571K} mutant was mainly cytoplasmic (Figure 4b). The preferential cytosolic localisation of XPO1^{E571K} was confirmed with WB of cytoplasmic/nuclear differential protein extracts of transfected HEK-293 cells (Figure 4b). We further analysed the subcellular XPO1 localisation in U2940-derived KAS and KS clones in which one wt allele was replaced by a mutant E571K allele. In the clones, XPO1 tended to accumulate at the nuclear envelope (Figure 4c). Finally, we used parental (p) and edited (Δ) UH-01 cells. Compared to UH-01 parental cells, XPO1 was more diffuse and nuclear in UH-01 Δ cells (Figure 4d). The processing of U2940 and UH-01 images with the ImageJ software and the calculation of the Fc/n index confirmed the XPO1 cytoplasmic accumulation in cells having the E571K mutant allele (MedB1, KAS/KS, UH-01, Figure 4a,c,d). These data indicated that the E571K mutation may alter XPO1 localisation.

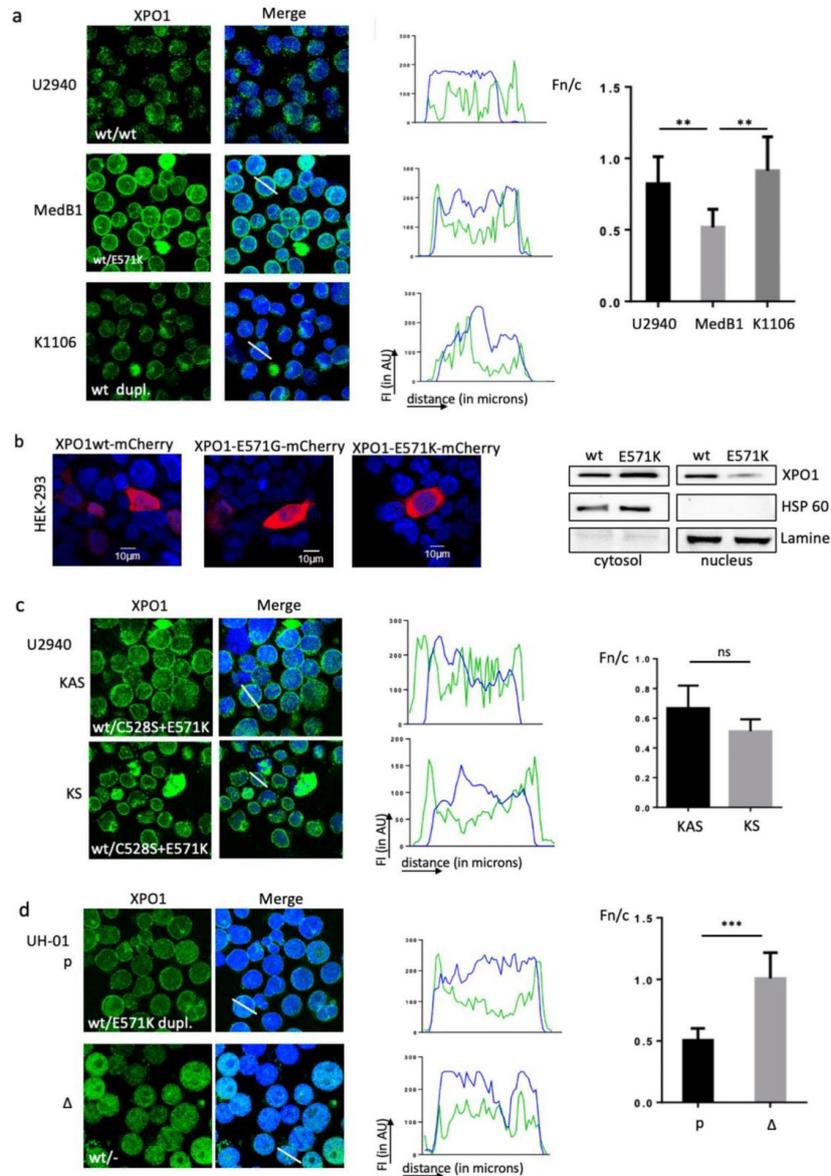


Figure 4. XPO1 accumulates at the perinuclear rim in XPO1^{E571K}-expressing cells. (a) PMBL cells were analysed by IF to determine the localisation of XPO1. We used an anti-XPO1 Ab (Table S7) and a goat Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG as the secondary Ab. Slides were counterstained with DAPI and analysed by confocal microscopy (×180 magnification). Images were processed with the ImageJ

software and data were exported to generate the curves of FI in AU as a function of the distance in pixels. The Fn/c was calculated from six independent fields covering at least 100 cells. The experiment was done five times. Presented data are means \pm SD. (b) HEK-293 cells were transfected with plasmids expressing XPO1-mCherry fusion proteins. Cells were harvested 24 h after transfection and analysed for red fluorescence with confocal microscopy. The experiments were repeated four times. Cytosolic and nuclear extracts were prepared from HEK-293 cells transfected with the XPO1-mCherry-wt (wt) or XPO1-E571K-mCherry (E571K) plasmids 48 h after transfection. Proteins were separated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. They were incubated with an anti-XPO1 Ab (Table S7). HSP60 and lamin A were used as specific markers for confirming the good cytoplasmic/nuclear separation and loading controls. (c) Selinexor-selected KAS and KS clones expressing the two C528S and E571K mutations were assessed for XPO1 localisation and images were processed as in (a). The experiment was done three times. Data are means \pm SD. (d) Parental and UH-01 Δ cells were assessed for XPO1 localisation and images were processed as described in (a) and the calculation of the Fn/c index. Due to the limited number of UH-01 Δ cells, the experiment was done once. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant.

2.5. Mutant and Wild-Type XPO1 Possess Similar Interactomes

Using a proteomic approach, we analysed the XPO1^{wt} and XPO1^{E571K} interactomes in PMBL cells with the aim of observing either a different pattern of cargoes or specific cargoes. Following the previously described optimized IP protocol (Figure S2b), XPO1 complexes were separated and subsequently used for trypsin digestion and MS analysis on four biological replicates from the three PMBL cell lines. As a control, we set up four replicates in which immunoglobulins (Ig) of the same isotype replaced the anti-XPO1 Ab. The MS proteomics data (.Raw, .mgf and mascot .dat files) have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [20] partner repository with the dataset identifier PXD016916 (<http://www.proteomexchange.org/>) obtained with the U2940 cells were difficult to analyse because of an increased number of non-specific interactions, so we focused on the interactomes of K1106 and MedB1 cells that differ by the presence of one mutant allele (Figure S6a). By considering only the differentially expressed proteins (anti-XPO1 vs. Ig, $p < 0.05$), we found 20 specific XPO1-interacting proteins in K1106 cells, 13 in MedB1 cells, whereas 13 were common to both cell lines, including XPO1 (Figure S6b). We classified XPO1-interacting proteins using the STRING database tools (Figure S6c) and found the same GO terms: biological process (BP), molecular function (MF) and cellular component (CC), and the same INTERPRO and SMART protein domains, confirming that both interactomes are similar in the two cell lines. Despite the XPO1 duplication in K1106 and the XPO1 mutation in MedB1, the major role of XPO1 as a nuclear export protein is maintained (Table 1). Moreover, proteins previously described as XPO1 cargoes either by affinity capture or co-fractionation and MS [21–23] were sorted (Figure S6b). Other proteins not described as putative cargoes but belonging to a family of previously described cargoes (e.g., DDX41 vs. DDX1 or DDX5) were also characterized (Figure S6b). Thus, proteomics data validated our strategy and technical procedure.

Table 1. Enrichment for XPO1 interactors identified in K1106 and MedB1 cells with STRING database.

K1106			
GO Term	Biological Process	Count in Gene Set	False Discovery Rate
GO:0046907	Intracellular protein transport	7/836	8.40×10^{-4}
GO Term	Molecular Function	Count in Gene Set	False Discovery Rate
GO:0003924	GTPase activity	8/283	7.42×10^{-7}
GO Term	Cellular Component	Count in Gene Set	False Discovery Rate
GO:0031090	Organelle membrane	20/2828	1.66×10^{-7}
INTERPRO Prot. domains			
IPR001806	Small GTPase superfamily	7/171	6.80×10^{-7}
SMART Prot. domains			
SM00175	Rab subfamily of GTPases	5/62	1.58×10^{-6}
MedB1			
GO Term	Biological Process	Count in Gene Set	False Discovery Rate
GO:0046907	Intracellular protein transport	10/1390	2.20×10^{-3}
GO Term	Molecular Function	Count in Gene Set	False Discovery Rate
GO:0003924	GTPase activity	4/283	3.60×10^{-7}
GO Term	Cellular Component	Count in Gene Set	False Discovery Rate
GO:0031090	Organelle membrane	16/2828	2.84×10^{-6}
INTERPRO Prot. domains			
IPR001806	Small GTPase superfamily	3/163	4.10×10^{-3}
SMART Prot. domains			
SM00175	Rab subfamily of GTPases	3/62	1.10×10^{-3}

The 33 proteins associated with XPO1 in K1106 cells and the 26 proteins associated with XPO1 in MedB1 cells, revealed by IP/MS, were analysed with the STRING v10.5 database (string-db.org/cgi/). Within the network of protein/protein interaction (PPI, Figure S6c), functional connections among the set of proteins were enriched and reported in the table with their GO pathway terms, the number of genes in their pathways and the false discovery rates calculated by Fisher's exact tests followed by corrections of multiple testing.

2.6. XPO1^{E571K} Protein Binds the Karyopherin β 1 at the Outer Nuclear Membrane

Two studies reported previously that the XPO1 mutation alters NES recognition and favours the export of cargoes with negatively charged C-terminal NES sequences [24,25]. Moreover, Taylor and co-workers described an enrichment of cytoplasmic vs. nuclear proteins in pre-B NALM6 cells bearing a mutant E571K allele [25]. We compared our data and those previously reported and found nine proteins common to NALM6^{wt/E571K} and MedB1 (Figure S7). Although these proteins are potentially interesting and relevant for PMBL and cHL pathologies (Supplementary results, Section 2.2), we focused on karyopherin β 1 (KPNB1), also known as importin 1 (or IPO1). The import of proteins containing a nuclear localisation signal (NLS) requires a heterodimer of importin α and β subunits. Importin α binds the cargoes in the cytoplasm and IPO1 docks the complexes at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex (NPC). In the presence RanGTP, the complex moves into the NPC and the importin subunits dissociate. RanBP2 (or NUP358) is the major nucleoporin component of the cytoplasmic filaments of the NPC and interacts with the FG-rich domains of IPO1 [26]. We used this property to analyse by IF the colocalisation of IPO1 and RanBP2. As observed in Figure 5a, in all analysed cells, the red fluorescent signal (RanBP2) and the green fluorescent signal (IPO1) peaked together, and the intensity of the signals is high outside the nucleus confirming the cytoplasmic localisation of IPO1. Analysing XPO1 and IPO1, we found that both proteins colocalised at the cytoplasmic face of the nuclear envelope. The calculated Manders' overlap coefficients were 0.834 ± 0.049 , 0.830 ± 0.053 and 0.850 ± 0.088 for MedB1, UH-01 and U2940 cells, respectively, confirming the colocalisation of XPO1 and IPO1 (Figure 5a).

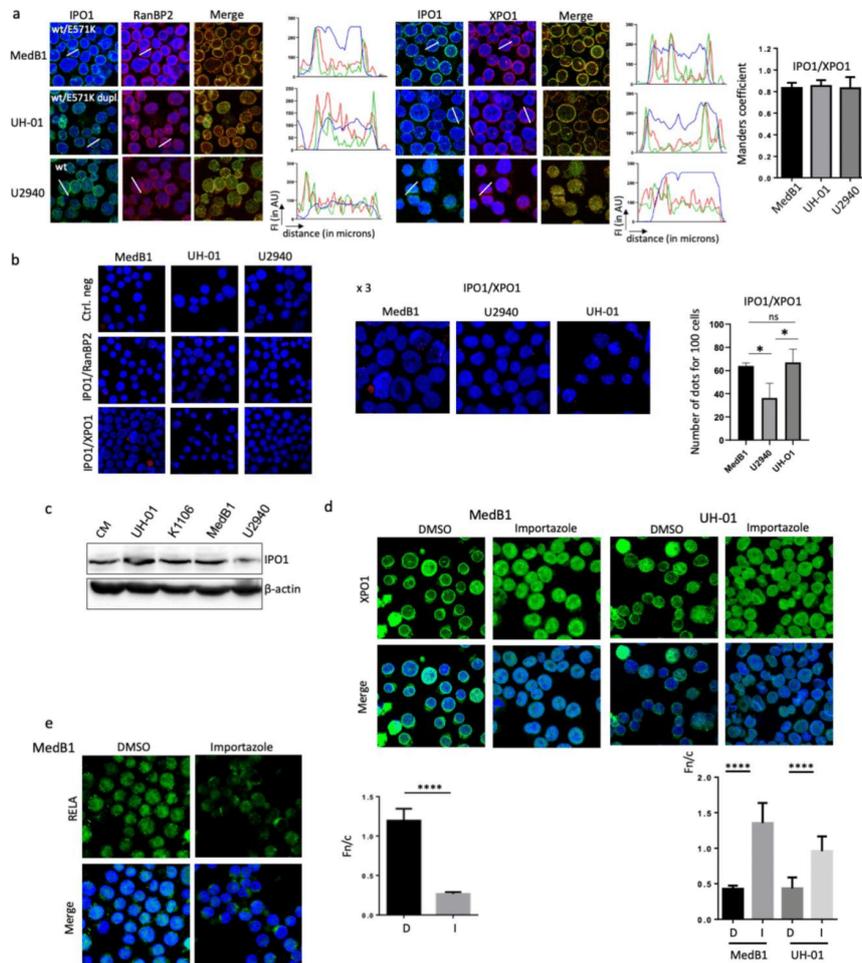


Figure 5. XPO1 and IPO1 are colocalised and bound in the PMBL and cHL cell lines and an importazole-treatment allows XPO1 to relocate to the nucleus. (a) MedB1, UH-01 and U2940 cells were analysed by IF to determine the colocalisation of XPO1 and RanBP2 (as a control) or IPO1. We used anti-XPO1, anti-RanBP2 and anti-IPO1 as primary Abs (Table S7) and goat Alexa Fluor 488- or 633-conjugated anti-rabbit IgG as secondary Ab. Slides were counterstained with DAPI and analysed with the ImageJ software as described previously. The colocalisation of XPO1 and IPO1 was confirmed with the Manders overlap coefficient from stained cells on three independent images for each staining condition (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Means \pm SD are indicated on the histograms. At least 30 cells per field and three fields per cell line were analysed. (b) The Duolink PLA technology was used on the same cell lines to investigate XPO1/IPO1 interactions with IPO1/RanBP2 interactions as a positive control. Slides were incubated with the primary Abs (Table S7), except for the negative control, and

with the secondary Abs conjugated with the PLUS and MINUS probes. The ligation and amplification steps were next performed and the slides were counterstained with DAPI and observed with a confocal microscope ($\times 180$ magnification). Enlargements ($\times 3$) of positive slides are shown. Red dots were counted on at least 70 cells on each slide. For each experiment, two slides were set up, and three independent experiments were performed (Table S9). The means \pm SD of red dot counts for 100 cells of all experiments are presented in the histogram. (c) Whole cell extracts were prepared from the indicated cell lines. Proteins were separated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were then incubated with an anti-IPO1 Ab (Table S7). An anti- β -actin Ab was used for loading and transfer controls. (d,e) MedB1 and UH-01 cells were treated with vehicle (0.01% DMSO, D) or 4 μ M importazole (I) for 24 h. Cells were then harvested and analysed by IF to determine the localisation of XPO1 (d) and RELA (e). We used an anti-XPO1 or an anti-RELA as the primary Ab (Table S7) and a goat Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG as the secondary Ab. Slides were counterstained with DAPI (merge) and analysed by confocal microscopy ($\times 180$ magnification). The Fr/c was calculated from six independent fields covering at least 100 cells for importazole (I) or vehicle (D)-treated MedB1 and UH-01 cells. The experiment was done twice. Presented data are means \pm SD. ****, $p < 0.0001$ with the *t*-test.

The direct binding of IPO1 and XPO1 was further confirmed by the proximity-ligation assay (PLA). In the negative control, no red dot was detected, whereas in the positive control red dots were observed (Figure 5b). Our results are in good agreement with the known respective roles of IPO1 and RanBP2 and their interactions [27]. Red dot blots, each one corresponding to one XPO1/IPO1 interaction, were also observed in the three PMBL/cHL cell lines tested, independently of XPO1 status (Figure 5b). However, according to IF data, dots were mostly nuclear in U2940 cells and cytoplasmic in MedB1 and UH-01 cells. We counted the number of dots for 100 observed cells from the three cell lines. We found that the number of dots (i.e., XPO1/IPO1 interactions) was statistically higher in the two cell lines having the E571K mutation compared to U2940 cells having only wild-type XPO1 alleles (Figure 5b).

With the levels of XPO1 and IPO1 being similar in all cell lines (Figure 5c), we hypothesised that the increased number of dots between the two proteins could be due to stronger interactions between the two partners. We finally treated PMBL/cHL cells with importazole, a small molecule inhibitor of the nuclear transport receptor that blocks IPO1-mediated nuclear import without disrupting XPO1-mediated nuclear export [28]. We then analysed by IF the sub-cellular localisation of XPO1 in cytoplasmic/nuclear extracts obtained from MedB1 and UH-01-treated cells and -untreated cells (Figure 5d). Importazole-treatment dissociates the XPO1/IPO1 complexes, allowing XPO1 to relocate into the nucleus. These data confirmed that mutant XPO1 localisation is dependent on IPO1. Finally, we analysed RELA, known to possess a classical nuclear localisation signal (NLS) and to be a cargo of KPNA/IPO1 [29,30]. Due to the constitutive activation of the NF- κ B signalling pathway in MedB1 cells, a common feature of PMBL [31], RELA localised into the nucleus in MedB1 cells (Figure 5e). Upon importazole-treatment, RELA accumulated in the cytoplasm confirming the inhibition of the nuclear import and its functionality.

3. Discussion

The present work focused on the understanding of the functional impact of the “hot-spot” XPO1^{E571K} mutation in B-cell lymphoma. Although XPO1 amplification was observed in both solid and haematological malignancies, the XPO1^{E571K} mutation seems lineage-specific and arises almost exclusively in B cells [4,5,9,25]. We first verified that the E571K mutation was present in the XPO1 protein. We next found that the mutant XPO1 protein displayed an altered cellular localisation in PMBL/cHL cell lines and their CRISPR–Cas9-edited counterparts. Indeed, using several CRISPR–Cas9 strategies, we introduced the E571K mutation in the U2940 cell line (XPO1^{wt}) and deleted the mutant allele in the UH-01 cell line (XPO1^{wt/E571K}). In KAS and KS cells derived from U2940 cells, XPO1 that shuttled between the nucleus and the cytoplasm in the parental cells accumulated at the nucleocytoplasmic

membrane, whereas in UH-01Δ cells with no mutant allele, XPO1 was freed from the nuclear rim and became nuclear. The analysis of XPO1 interactome with a proteomic approach of cells having or not the XPO1 mutation revealed a network of similar proteins, confirming that the nuclear export was not intensively modified, in agreement with in vitro and in vivo reported data [24,25]. However, we found some proteins uniquely present in XPO1^{E571K}-bearing cells. The preferential binding of mutant XPO1 with the importin β1 or IPO1 reported here may explain its abnormal localisation.

The nuclear export and import of cargoes through the nuclear pore complex are mediated by carrier proteins known as export and import receptors of the karyopherin-β family [32,33]. Importins carry a wide range of cargoes, including those having classical nuclear localisation signals (NLSs), into the nucleus, whereas exportins carry cargoes containing nuclear export signals (NESs) to the cytoplasm. This receptor-mediated transport is orchestrated by RanGTP, which dissociates cargoes from importins, but conversely is required for cargo binding to exportins [32,33]. Within the nucleus, XPO1 recognises the nuclear export signal of cargoes; this interaction is then stabilised by RanGTP. Due to a Ran-GTP/Ran-GDP gradient dependent on the localisation of RCC1 (regulator of chromosome condensation 1, the Ran guanine exchange factor) and RanGAP (the Ran activating protein) in the nucleus and in the cytoplasm, respectively, XPO1-cargo-RanGTP complexes go through the NPC. This process is facilitated by their binding to nucleoporins (Nups), including Nup98 at the nucleoplasmic side and Nup214-Nup88 at the cytoplasmic side [34]. In the cytoplasm, XPO1-cargo-RanGTP complexes encounter RanBP1 and RanBP2 (or Nup358) which facilitate the hydrolysis of RanGTP and the cargo release [34]. The accumulation of mutant XPO1 at the nucleoplasmic side could be due to a default of cargo release imposed by a stronger affinity of XPO1 for one (or more) protein of the export complex when it dissociates. Human XPO1 is a ring-shaped protein composed of 21 HEAT repeats, formed by two helices α and β, separated by a loop. The hydrophobic pocket of XPO1 at the surface of the protein, recognising the NES, is formed by H11 and H12 [35,36]. The H1-6 HEAT repeats and a loop on H9 of XPO1 contribute to the binding of RanGTP [37]. Therefore, the E571K mutation present on H12 cannot modify directly the affinity of XPO1 for RanGTP, but could do so allosterically. We did not find any mislocalisation of RanBP1 in PMBL cells including MedB1 (Figure S2c). Finally, using the available crystal structures of XPO1 and IPO1, each in complex with partner proteins, we attempted to construct models of ternary complexes (Figure S8). The model, obtained by superimposition of RanBP2 from the two structures, shows that XPO1 and IPO1 use the same interface, which rules out the hypothesis that the interaction can occur in this manner (Figure S8). The last possibility is a direct binding between XPO1 and IPO1 that could be altered by the presence of the E571K mutation.

The description of XPO1 recurrent mutations in a large percentage of PMBL and cHL patients suggests that XPO1^{E571K} conveys oncogenic functions. This is also highly sustained by the observation that mutations persist in patients without any selection pressure. Taylor and colleagues reported that the E571K mutant form of XPO1 is a driver of B-cell transformation [25]. When expressed in a pre-B cell line, the heterozygous mutation induces in vivo and in vitro the proliferation of transfected cells. By contrast, XPO1^{E571K} inhibits HEK-293 cell growth and causes mitotic defects [38]. When analysing the proliferation properties of KS and KAS clones in which we introduced the double C528S and E571K mutations, we found no differences compared with the parental U2940 cells (Figure S9). A direct role of XPO1^{E571K} in the control of proliferation is still an open question. Alternatively, the oncogenic properties of the mutant XPO1^{E571K} protein could rely on alterations of cargoes binding. Although the E571K mutation could increase the XPO1 affinity for NES sequences bearing negatively charged residues, as reported in vitro [24], there is no experimental evidence that XPO1^{wt} and XPO1^{E571K} interactomes are different ([25] and our present data). Moreover, most NESs similarly bind XPO1^{wt} and XPO1^{E571K} proteins, and the presence of charged residues within the NES cannot predict any differences for binding [38]. Our data suggest another mechanism. The binding of XPO1^{E571K} to IPO1 modifies its subcellular localisation, and in turn, the shuttling of some cargoes, potentially including oncoproteins and tumour suppressors. Further studies are necessary to investigate the dynamics of export and import complexes in relation to the E571K mutation.

There is a growing interest in targeting XPO1 in cancer treatment, and various SINEs have been developed, including Selinexor, and are still under development [7,39]. Selinexor exhibits a great therapeutic efficacy either alone or in combination therapies and is currently being assayed in numerous clinical trials ([//clinicaltrials.gov/](https://clinicaltrials.gov/)). However, IPO1 could also be considered a relevant therapeutic target [40]. IPO1 also appears important for B-cell and plasma cell diseases. Indeed, upregulation of the protein contributes to promote cell proliferation and tumour microenvironment-mediated resistance [41]. IPO1 mediates NF- κ B transduction in the nucleus of MM cells and controls proliferation and apoptosis [42]. XPO1 inhibition blocks the nuclear export and allows tumour suppressors proteins to relocate into the nucleus and to recover their cell functions. We report here that IPO1 inhibition allowed the nuclear relocation of XPO1 for cells expressing the mutant protein, opening up new therapeutic perspectives.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture and Transfection

The PMBL cell lines K1106, U2940 and MedB1 and the cHL UH-01 cell line have been described previously [4,5]. UH-01 (ACC-626) and U2940 (ACC-634) cells were purchased from DSMZ (Leibniz, Germany). MedB1 and K1106 cell lines, a generous gift of Karen Leroy, were authenticated by STR profiling (DSMZ). The untransformed CM cell line used as a control is a mature B-cell line immortalized by the Epstein–Barr virus.

Cell lines were cultured in RPMI 1640 or IMDM medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10–20% foetal calf serum (FCS, PAA laboratories, Pasching, Austria), 2 mM L-glutamine and antibiotics (Lonza), under a humid atmosphere at 37 °C. Cells were regularly checked for mycoplasma contamination; moreover, each batch of cells was maintained in culture less than three months. The human HEK-293 cell line was maintained in DMEM medium (Lonza) supplemented with 10% FCS, L-glutamine and antibiotics.

U2940 and UH-01 cells transfections were performed by nucleofection (4D-Nucleofector, Lonza, Basel, Switzerland). We used the Cell Line Optimisation 4D-Nucleofector X kit and the pmaxGFP vector as positive control. The NucleoCounter NC-3000 (ChemoMetec, Allerød, Denmark) was used to determine viability and transfection efficiency. We selected the best conditions regarding viability and transfection efficiency and used the SF solution and the DS-150 and DN-100 programs for U2940 and UH-01 cells, respectively. HEK-293 cells were transfected by the phosphate calcium method, as described in [43].

4.2. Cell Viability Assay

Cells were seeded in 96-well plates in complete medium (2×10^5 cells per well) and treated for 48 h with vehicle (0.01% dimethylsulfoxide, DMSO) or various concentrations of selinexor (KPT-330, 0.01–20 μ M, Selleckchem, Houston, TX, USA). Cell viability was quantified using an MTS assay (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions and as previously described [44]. The index of cytotoxicity (IC_{50}) was calculated with the Prism v8.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

4.3. Indirect Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Cells were cytospun on superfrost glass slides, fixed in 4% paraformaldehyde, and permeabilized in 0.5% Triton-X100. The slides were then stained with primary antibodies (Abs), and with Alexa Fluor 488- (in green) or 633- (in red) conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG as secondary Abs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and counterstained with DAPI (in blue, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The primary Abs used in this study are presented in Table S7. The slides were observed with a confocal microscope (Fluoview FV100, Olympus, Rungis, France). The fluorescence intensity (in arbitrary units, AU) of each fluorophore was estimated with the ImageJ software (available from

<https://imagej.nih.gov/ij/>) as described previously [44]. Quantification of nuclear and cytoplasmic distribution of cargo proteins was performed as described by Kuusisto et al. [19]. Briefly, using ImageJ software, three mean fluorescence intensities—Fc for cytoplasmic fluorescence, Fn for nuclear fluorescence and Fb for background fluorescence—were determined by drawing a region of interest (ROI) of 30 arbitrary units in each compartment of each analysed cell. The ratio of nuclear to cytoplasmic fluorescence F_n/c was determined according to the following formula: $F_n/c = (F_n - F_b) / (F_c - F_b)$. The mean fluorescence intensity (MFI) of each experimental condition was used to draw the histograms with the Prism software (v6.0, GraphPad).

4.4. Proximity Ligation Assay

The proximity ligation (PLA) assay was used to confirm protein interactions. We used the Duolink In Situ Red Starter Kit (DUO92101, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), according to [44], using primary Abs (Table S7) and as secondary Abs the PLUS and MINUS probes. As a positive control we used an anti-RanBP2 Ab, RanBP2 being a well-known partner of XPO1 [18]. As a negative control, no primary Ab was added in the reaction mixture. The slides were observed with a confocal microscope (Fluoview FV 100, Olympus).

4.5. Western Blotting

Whole-cell protein extracts were prepared from exponentially growing cells. Cells were lysed with a lysis buffer containing 1% NP40, 10% glycerol, 0.05 M Tris pH7.5, 0.15 M NaCl and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Insoluble material was discarded and soluble proteins were recovered and quantified. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared with the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagent kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The methods used for SDS-PAGE and WB have been described previously [45]. The antibodies used are described in Table S7. Levels of detected protein were quantified using the ChemiDoc XR+ and the ImageLab software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.6. Immunoprecipitation, Mass Spectrometry and Protein Characterisation

The optimisation of IP conditions is described in Figure S2b. Briefly, U2940 cells were lysed in a buffer containing 25 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5 % NP40 and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (250 μ L for 10^7 cells). IP of XPO1 was performed with 15 μ L of Dynabeads Protein A and 0.15 μ g of anti-XPO1 Ab (PLA0109, Sigma-Aldrich) per mg of total protein extract. XPO1 was eluted in a buffer containing 50 mM Tris (pH8.5), 2% SDS, 20 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine and 50 mM chloroacetamide, heated for 5 min at 95 °C and trypsin-digested overnight using S-trap micro spin columns according to the manufacturer's instructions (www.protifi.com). Eluted peptides were dried in a vacuum centrifuge (SpeedVac, Eppendorf, Montesson, France) and solubilised with 10 μ L of a 10% acetonitrile (ACN), 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in milliQ-H₂O solution.

Nano-liquid chromatography and MS analyses were performed on a 2 h run per replicate as previously described [46]. The mass spectrometry experimental data were compared with theoretical data using Mascot v2.5.1 (Matrix science) on a Homo sapiens (23,076 sequences) SwissProt protein database (October 2018) and an in-house database containing the E571K sequence variant of XPO1. The enzyme specificity type was trypsin's (C-term side of K or R), and up to 1 missed cleavage was permitted. The precursor mass tolerance was set to 4 ppm and the fragment mass tolerance to 20 mmu. Carbamidomethylation of cysteins was set as constant modification and oxidation of methionines was set as variable modification. The best mass spectra annotations of three relevant peptides are available as Figures S3–S5.

4.7. CRISPR–Cas9 Editing

Depending of our objective: insertion of the E571K mutation (or the corresponding E571E as a control) in U2940 cells, insertion of the two C528S/E571K mutations in U2940 cells, or the KO of E571K in UH-01 cells, we set up various CRISPR–Cas9 strategies (Figure S1a, Figure 1a–e). sgRNA target sequences (Table S3) were designed using the CRISPR design tool hosted by the MIT ([//crispr.mit.edu](http://crispr.mit.edu)) to minimize potential off-target effects. The sequences of the ssODNs (Integrated DNA Technologies or IDT, Coralville, IA) containing functional and silent mutations used as genetic barcodes (Table S4) were chosen according to Guernet et al. [47]. Two types of ssODNs were used: either ultramers (DNA sequences of less than 200 bp) or megamers (DNA sequences of about 400 bp). For editing lymphoma cells, CRISPR–Cas9 experiments were performed with the Alt-R CRISPR–Cas9 system based on the use of a recombinant Cas9 (Alt-R S.p. Cas9 Nuclease 3NLS, #1074181, IDT). Transfections were performed with 0.4 µg of ribonucleoprotein (RNP) and 50 µM ssODN templates (Table S4) assembled in vitro as recommended by the manufacturer. Briefly, 200 µM sgRNAs (IDT) were incubated at 95 °C for 10 min. The RNP complex was formed by mixing sgRNAs with Alt-R™ S.p Cas9 Nuclease 3NLS at a final concentration of 5 µM. One microliter of 100 µM Alt-R Cas9 Electroporation Enhancer (IDT) was added to ensure optimal delivery of the Cas9 complex. Transfections were performed using nucleofection. Cells were then cultured and amplified for analysis. Barcodes detection was then performed by qPCR using specific primers (Table S10). We also used the Surveyor Mutation Detection kit to detect *XPO1* mutations and/or deletions as recommended by the supplier (IDT), and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique to assess HDR efficiency. We amplified by PCR the region containing the sequence 5'-GCT GTT CGA ATT CAT GCA TGG TAA AT-3' containing one *EcoRI* restriction site (in bold) using specific primers (Table S8). The PCR products were subjected to *EcoRI* digestion and the fragments were run on agarose gel. Digested and undigested fragment were quantified using the ChemiDoc XR+ and ImageLab software (Bio-Rad, Hercules, CA). For *XPO*^{E571K} deletion, we used the same conditions; however, no megamer was added to the transfection mix with the aim of triggering only NHEJ. The control experiments and technical improvements are described in detail in the Supplementary Information.

4.8. DNA and RNA Extraction, RT-PCR and Sanger Sequencing

Genomic (g)DNA was purified from cultured PMBL cell lines with the NucleoSpin Tissue kit according to the supplier's instructions (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Total RNA was extracted from the same cultured cells using Trizol reagent (Invitrogen). The purity of nucleic acids was checked with the NanoDrop One (Thermo Scientific, Waltham, MA).

cDNAs were generated from purified RNA using random primers and the GoScript reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI). PCRs were then realised with the Platinum *Taq* DNA Polymerase kit (Invitrogen) and the primers described in Table S8. PCR fragments were gel-purified (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) and directly sequenced by the Sanger method in both directions using the same primers.

4.9. DNA and RNA Pyrosequencing

Reverse transcription was performed on 500 ng of total RNA using MMLV-reverse transcriptase according to manufacturer's instructions (Invitrogen). PCR amplification was performed on 5 µL of cDNA or 100 ng of DNA, using 45 µL of a PCR mix containing 25 µL Red'y-Star Mix (Eurogentec, Liege, Belgium), 1 µL *XPO1_F* primer (RNA or DNA, 10 µM), 1 µL 5'-biotinylated *XPO1_R_biot* primer (10 µM) and 18 µL water, as follows: 6 min at 94 °C; 35 cycles (30 sec at 94 °C, 30 sec at 60 °C, 30 sec at 72 °C); 4 min at 72 °C; and cooling at 10 °C. Then, 20 µL of PCR products were analysed on a PyroMark Q24 platform (Qiagen, Venlo, The Netherlands) using sequencing primers with a dispensation order predefined with PyroMark Q24 software (v2.0.7) and following standard procedures. The sequences of primers are listed in Table S2.

4.10. Next-Generation Sequencing

NGS experiments were performed using Ion Torrent Personal Machine (PGM) and variant analysis was performed using an in-house generated bioinformatics pipeline as previously described [48]. The gene panel used for the sequencing covers the exon 15 of *XPO1*, which contains the codons for E571 and C528 residues.

4.11. Statistical Analyses

The Student's *t*-test was used to determine the significance of differences between two experimental groups. Data were analysed in two-tailed tests, with $p < 0.05$ (*) considered to be significant.

5. Conclusions

XPO1 overexpression is commonly observed in solid cancers and haematological malignancies, leading to the aberrant localisations of tumour suppressors and cell cycle regulators, and to enhanced expressions of oncogenes associated with poor prognoses [7,39]. Interestingly, Ran, an *XPO1*/*IPO1* partner, necessary for proper nucleocytoplasmic export and import, is also overexpressed and associated with a poor prognosis in solid cancers [49,50]. How the mislocalisation of *XPO1* in B cells has a bearing on how the E571K mutation participates into the oncogenic process is still an open question. However, our data confirmed that aberrant nuclear export machinery could be regarded as a hallmark of oncogenesis.

Supplementary Materials: The supplementary file is available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/10/2829/s1>. Figure S1: Optimisation of the CRISPR-barcoding strategy, Figure S2: Optimisation of the immunoprecipitation conditions and immunofluorescence images, Figures S3–S5: MS/MS annotated spectra from K1106, MedB1 and U2940 cells, respectively, Figure S6: Proteomic analysis of *XPO1* interactome in PMBL cells, Figure S7: Comparison of *XPO1* interactomes in K1106, MedB1 and NALM6 *XPO1*^{wt/mt}, Figure S8: Hypothetical 3D-model of *IPO1*/*XPO1*/*RanBP2* complex, Figure S9: Proliferation curves of U2940 cells, and KS/KAS and EAS/ES derivatives, Table S1: Relative quantification of mutant and wild-type (wt) *XPO1* alleles by pyrosequencing, Table S2: Sequences of the primers used for DNA and RNA pyrosequencing, Table S3: *XPO1* status in the PMBL and cHL cell lines used in the study, Table S4: Sequences of sgRNA used in the CRISPR-Cas9 studies, Table S5: Sequences of ssODNs used in the CRISPR-Cas9 barcoding strategies, Table S6: Selinexor treatment allows the recovery of U2940 cells having the the two C528S/E571K mutations, Table S7: Primary antibodies used in the study, Table S8: Sequences of the primers used for RT-PCR and Sanger sequencing, Table S9: Proximity-ligation assay results, Table S10: Sequences of the primers used for PCR in CRISPR-Cas9 assays.

Author Contributions: Conceptualisation, H.M., F.J. and B.S.; formal analysis, H.M., É.B., A.T., P.-J.V. and B.S.; funding acquisition, A.T. and B.S.; investigation, H.M., É.B., F.G., A.T., V.C.G. and F.J.; methodology, H.M., É.B., F.G., V.C.G., G.J. and L.G.; project administration, B.S.; supervision, F.J. and B.S.; validation, É.B., F.G., V.C.G., G.J. and L.G.; writing—original draft, H.M. and B.S.; writing—review and editing, É.B., F.G., A.T., V.C.G., G.J., L.G. and F.J.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Ligue contre le Cancer—Comité de l'Orne and the Groupement des Entrepreneurs Français en Lutte contre le Cancer to B.S. and by the Initiative d'Excellence (cluster of excellence LABEX Dynamo, ANR-11-LABX-0011) to A.T. H.M. received scholarships from the Ligue contre le Cancer—Comité de Seine Maritime, the Conseil régional de Normandie, the Société Française d'Hématologie and the Centre de lutte contre le Cancer Henri Becquerel.

Acknowledgments: The authors thank Anne Barbaras (INSERM, Université de Caen Normandie, France) for her help with cell culture; Alexis Guernet and David Alexandre (INSERM, Université de Rouen, France) for their help with the CRISPR-Cas9 technique; Gaël Roué (Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Barcelona, Spain) for the gift of CM cell line and the critical reading of the manuscript; Fabrice Gouilleux (CNRS, Université de Tours, France) for the critical reading of the manuscript; Karen Leroy (CHU Cochin, Paris, France) for the gift of PMBL cell lines; and Patrick Mayeux and Alfred Amedan (Plateforme Protéomique 3P5, Université de Paris, Paris, France) for helpful discussion with proteomic data, the Structure Fédérative ICORE (Université de Caen Normandie) for the microscopy technical platform.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Rosenwald, A.; Wright, G.; Leroy, K.; Yu, X.; Gaulard, P.; Gascoyne, R.D.; Chan, W.C.; Zhao, T.; Haioun, C.; Greiner, T.C.; et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 851–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Savage, K.J.; Monti, S.; Kutok, J.L.; Cattoretti, G.; Neuberg, D.; De Leval, L.; Kurtin, P.; Dal Cin, P.; Ladd, C.; Feuerhake, F.; et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B493 cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **2003**, *102*, 3871–3879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Steidl, C.; Gascoyne, R.D. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* **2011**, *118*, 2659–2669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jardin, F.; Pujals, A.; Pelletier, L.; Bohers, E.; Camus, V.; Mareschal, S.; Dubois, S.; Sola, B.; Ochmann, M.; Lemonnier, F.; et al. Recurrent mutations of the exportin 1 gene (XPO1) and their impact on selective inhibitor of nuclear export compounds sensitivity in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Am. J. Hematol.* **2016**, *91*, 923–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Camus, V.; Stamatoullas, A.; Mareschal, S.; Viailly, P.J.; Sarafan-Vasseur, N.; Bohers, E.; Dubois, S.; Picquenot, J.M.; Ruminy, P.; Maingonnat, C.; et al. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica* **2016**, *101*, 1094–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dubois, S.; Viailly, P.J.; Mareschal, S.; Bohers, E.; Bertrand, P.; Ruminy, P.; Maingonnat, C.; Jais, J.P.; Peyrouze, P.; Figeac, M.; et al. Next-generation sequencing in diffuse large B-cell lymphoma highlights molecular divergence and therapeutic opportunities: A LYSA study. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 2919–2928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Camus, V.; Miloudi, H.; Taly, A.; Sola, B.; Jardin, F. XPO1 in B cell hematological malignancies: From recurrent somatic mutations to targeted therapy. *J. Hematol. Oncol.* **2017**, *10*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Puente, X.S.; Pinyol, M.; Quesada, V.; Conde, L.; Ordóñez, G.R.; Villamor, N.; Escaramis, G.; Jares, P.; Beà, S.; González-Díaz, M.; et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **2012**, *475*, 101–105. [[CrossRef](#)]
- Cosson, A.; Chapiro, E.; Bougacha, N.; Lambert, J.; Herbi, L.; Cung, H.A.; Algrin, C.; Keren, B.; Damm, F.; Gabillaud, C.; et al. Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of the central role of XPO1. *Leukemia* **2017**, *31*, 1625–1629. [[CrossRef](#)]
- Dai, H.; Ehrentraut, S.; Nagel, S.; Eberth, S.; Pommerenke, C.; Dirks, W.G.; Geffers, R.; Kalavalapalli, S.; Kaufmann, M.; Meyer, C.; et al. Genomic landscape of primary mediastinal B-cell lymphoma cell lines. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139663. [[CrossRef](#)]
- Quentmeier, H.; Pommerenke, C.; Dirks, W.G.; Eberth, S.; Koepfel, M.; MacLeod, E.A.F.; Nagel, S.; Steube, K.; Uphoff, C.C.; Drexler, H.G. The LL-100 panel: 100 cell lines for blood cancer studies. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liu, Y.; Abdul Razak, F.R.; Terpstra, M.; Chan, F.C.; Saber, A.; Nijland, M.; van Imhoff, G.; Visser, L.; Gascoyne, R.; Steidl, C.; et al. The mutational landscape of Hodgkin lymphoma cell lines determined by whole-exome sequencing. *Leukemia* **2014**, *28*, 2248–2251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Neggens, J.E.; Vercruyse, T.; Jacquemyn, M.; Vanstreels, E.; Baloglu, E.; Shacham, S.; Crochiere, M.; Landesman, Y.; Daelemans, D. Identifying drug-target selectivity of small-molecule CRM1/XPO1 inhibitors by CRISPR/Cas9 genome editing. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 107–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, T.; Birsoy, K.; Hughes, N.W.; Krupczak, K.M.; Post, Y.; Wei, J.J.; Lander, E.S.; Sabatini, D.M. Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science* **2015**, *350*, 1096–1101. [[CrossRef](#)]
- Blomen, V.A.; Májek, P.; Jae, L.T.; Bigenzahn, J.W.; Nieuwenhuis, J.; Staring, J.; Sacco, R.; van Diemen, F.R.; Olk, N.; Stukalov, A.; et al. Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science* **2015**, *350*, 1092–1096. [[CrossRef](#)]
- Werner, M.T.; Zhao, C.; Zhang, Q.; Wasik, M.A. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase: The ultimate oncogene and therapeutic target. *Blood* **2017**, *129*, 823–831. [[CrossRef](#)]

17. Zhang, M.; Xu-Monette, Z.Y.; Li, L.; Manyam, G.C.; Visco, C.; Tzankov, A.; Wang, J.; Montes-Moreno, S.; Dybkaer, K.; Chiu, A.; et al. RelA NF- κ B subunit activation as a therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma. *Aging* **2016**, *8*, 3321–3340. [[CrossRef](#)]
18. Ritterhoff, T.; Das, H.; Hofhaus, G.; Schröder, R.R.; Flotho, A.; Melchior, F. The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 SUMO E3 ligase is a disassembly machine for Crm1-dependent nuclear export complexes. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11482. [[CrossRef](#)]
19. Kuusisto, H.V.; Wagstaff, K.M.; Alvisi, G.; Roth, D.M.; Jans, D.A. Global enhancement of nuclear localization-dependent nuclear transport in transformed cells. *FASEB J.* **2012**, *26*, 1181–1193. [[CrossRef](#)]
20. Perez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.; Hewapathirana, S.; Kundu, D.J.; Inuganti, A.; Griss, J.; Mayer, G.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D442–D450. [[CrossRef](#)]
21. Kurl, K.; Karaca, S.; Dehne, H.J.; Samwer, M.; Ting Pan, K.; Lenz, C.; Urlaub, H.; Görlich, D. A deep proteomics perspective on CRM1-mediated nuclear export and nucleocytoplasmic partitioning. *eLife* **2015**, *4*, e11466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wan, C.; Borgeson, B.; Phanse, S.; Tu, F.; Drew, K.; Clark, G.; Xiong, X.; Kagan, O.; Kwan, J.; Berzginov, A.; et al. Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes. *Nature* **2015**, *525*, 339–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hein, M.Y.; Hubner, N.C.; Poser, I.; Cox, J.; Nagaraj, N.; Toyoda, Y.; Gak, I.A.; Weisswange, I.; Mansfeld, J.; Buchholz, F.; et al. Human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell* **2015**, *163*, 712–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Garcia-Santisteban, I.; Arregi, I.; Alonso-Mariño, M.; Urbaneja, M.A.; Garcia-Vallejo, J.J.; Bañuelos, S.; Rodríguez, J.A. A cellular reporter to evaluate CRM1 nuclear export activity: Functional analysis of the cancer-related mutant E571K. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 4685–4699. [[CrossRef](#)]
25. Taylor, J.; Sendino, M.; Gorelick, A.N.; Pastore, A.; Chang, M.T.; Penson, A.V.; Gavrilu, E.I.; Stewart, C.; Melnik, E.M.; Herrejon Chavez, F.; et al. Altered nuclear export signal recognition as a driver of oncogenesis. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 1452–1467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Christie, M.; Chang, C.W.; Róna, G.; Smith, K.M.; Stewart, A.G.; Takeda, A.A.; Fontes, M.R.; Stewart, M.; Vértesy, B.G.; Forwood, J.K.; et al. Structural biology and regulation of protein import into the nucleus. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 2060–2090. [[CrossRef](#)]
27. Hamada, M.; Haeger, A.; Jeganathan, K.B.; van Ree, J.H.; Malureanu, L.; Wälde, S.; Joseph, J.; Kehlenbach, R.H.; van Deursen, J.M. Ran-dependent docking of importin-beta to RanBP2/Nup358 filaments is essential for protein import and cell viability. *J. Cell Biol.* **2011**, *194*, 597–612. [[CrossRef](#)]
28. Soderholm, J.F.; Bird, S.L.; Kalab, P.; Sampathkumar, Y.; Hasegawa, K.; Uehara-Bingen, M.; Weis, K.; Heald, R. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- β . *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 700–708. [[CrossRef](#)]
29. Stark, L.A.; Dunlop, M.G. Nucleolar sequestration of RelA (p65) regulates NF- κ B-driven transcription and apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 5985–6004. [[CrossRef](#)]
30. Liang, P.; Zhan, H.; Wang, G.; Li, S.; Cong, S.; Luo, Y.; Zhang, B. KPNB1, XPO7 and IPO8 mediate the translocation of NF- κ B/p65 into the nucleus. *Traffic* **2013**, *14*, 1132–1143.
31. Staudt, L.M. Oncogenic activation of NF- κ B. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a000109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Matsuura, Y.; Stewart, M. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* **2004**, *432*, 872–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lee, S.J.; Matsuura, Y.; Liu, S.M.; Stewart, M. Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* **2005**, *435*, 693–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Fung, H.Y.; Chook, Y.M. Atomic basis of CRM1-cargo recognition, release and inhibition. *Semin. Cancer Biol.* **2014**, *27*, 52–61. [[CrossRef](#)]
35. Dong, X.; Biswas, A.; Süel, K.E.; Jackson, L.K.; Martinez, R.; Gu, H.; Chook, Y.M. Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature* **2009**, *458*, 1136–1141. [[CrossRef](#)]
36. Monecke, T.; Güttler, T.; Neumann, P.; Dickmanns, A.; Görlich, D.; Ficner, R. Crystal structure of the nuclear export receptor CRM1 in complex with Snurportin1 and RanGTP. *Science* **2009**, *324*, 1087–1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Port, S.A.; Monecke, T.; Dickmanns, A.; Spillner, C.; Hofele, R.; Urlaub, H.; Ficner, R.; Kehlenbach, R.H. Structural and functional characterization of CRM1-Nup214 interactions reveals multiple FG-binding sites involved in nuclear export. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 690–702. [[CrossRef](#)]
38. Baumhardt, J.M.; Walker, J.S.; Lee, Y.; Shakya, B.; Brautigam, C.A.; Lapalombella, R.; Grishin, N.; Chook, Y.M. Recognition of nuclear export signals by CRM1 carrying the oncogenic E571K mutation. *Mol. Biol. Cell* **2020**. [[CrossRef](#)]
39. Azizian, N.G.; Li, Y. XPO1-dependent nuclear export as a target for cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *16*, 61. [[CrossRef](#)]
40. Nachmias, B.; Schimmer, A.D. Targeting nuclear import and export in hematological malignancies. *Leukemia* **2020**. [[CrossRef](#)]
41. He, S.; Miao, X.; Wu, Y.; Zhu, X.; Miao, X.; Yin, H.; He, Y.; Li, C.; Liu, Y.; Lu, X.; et al. Upregulation of nuclear transporter, Kpn β 1, contributes to accelerated cell proliferation- and cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) in diffuse large B-cell lymphoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2016**, *142*, 561–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Yan, W.; Li, R.; He, J.; Du, J.; Hou, J. Importin β 1 mediates nuclear factor- κ B signal transduction into the nuclei of myeloma cells and affects their proliferation and apoptosis. *Cell Signal.* **2015**, *27*, 851–859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ritz, O.; Guiter, C.; Castellano, F.; Dorsch, K.; Melzner, J.; Jais, J.P. Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Blood* **2009**, *114*, 1236–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Miloudi, H.; Leroy, K.; Jardin, F.; Sola, B. STAT6 is a cargo of exportin 1: Biological relevance in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Cell Signal.* **2018**, *46*, 76–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Body, S.; Esteve-Arenys, A.; Miloudi, H.; Recasens-Zorzo, C.; Tchakarska, G.; Moros, A.; Bustany, S.; Vidal-Crespo, A.; Rodriguez, V.; Lavigne, R.; et al. Cytoplasmic cyclin D1 controls the migration and invasiveness of mantle lymphoma cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Demarta Gatsi, C.; Rivkin, A.; Di Bartolo, V.; Peronet, R.; Ding, S.; Commere, P.H.; Guillonnet, F.; Bellalou, J.; Br  l  , S.; Abou Karam, P.; et al. Histamine releasing factor and elongation factor 1 alpha secreted via malaria parasites extracellular vesicles promote immune evasion by inhibiting specific T cell responses. *Cell Microbiol.* **2019**, *21*, e13021. [[CrossRef](#)]
47. Guernet, A.; Mungamuri, S.K.; Cartier, D.; Sachidanandam, R.; Jayaprakash, A.; Adriouch, S.; Vezaian, M.; Charbonnier, F.; Rohkin, G.; Coutant, S.; et al. CRISPR-Barcoding for intratumor genetic heterogeneity modeling and functional analysis of oncogenic driver mutations. *Mol. Cell.* **2016**, *63*, 526–538. [[CrossRef](#)]
48. Maitre, E.; Bertrand, P.; Maingonnat, C.; Viailly, P.J.; Wiber, M.; Naguib, D.; Sala  n, V.; Cornet, E.; Damaj, G.; Sola, B.; et al. New generation sequencing of targeted genes in the classical and the variant form of hairy cell leukemia highlights mutations in epigenetic regulation genes. *Oncotarget* **2018**, *9*, 28866–28876. [[CrossRef](#)]
49. Yuen, H.F.; Chan, K.K.; Grills, C.; Murray, J.T.; Platt-Higgins, A.; Eldin, O.S.; O’Byrne, K.; Janne, P.; Fennell, D.A.; Johnston, P.G.; et al. Ran is a potential therapeutic target for cancer cells with molecular changes associated with activation of the PI3K/Akt/mTORC1 and Ras/MEK/ERK pathways. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 380–391. [[CrossRef](#)]
50. Yuen, H.F.; Chan, K.K.; Platt-Higgins, A.; Dakir, E.H.; Matchett, K.B.; Haggag, Y.A.; Jithesh, P.V.; Habib, T.; Faheem, A.; Dean, F.A.; et al. Ran GTPase promotes cancer progression via Met receptor-mediated downstream signaling. *Oncotarget* **2016**, *7*, 75854–75864. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



   2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 3 : Poster présenté au congrès de l'Association Européenne d'Hématologie (Vienne, Autriche 2022)

HSP110 favors BCR signaling through SYK phosphorylation in Diffuse large B cell lymphoma

V. CABAUD GIBOUIN¹, C. BOUDESCO¹, M. DURAND¹, F. HERMETET¹, C. GARRIDO¹, G. JEGO¹ / ¹University of Burgundy, UMR1231 Lipid, Nutrition, Cancer, HSPathies Team, Dijon, France



INTRODUCTION

Heat-shock proteins (HSPs) are molecular chaperones highly expressed in hematological malignancies. They promote proliferation, escape of the immune system, surveillance and resistance to chemotherapies. Our team and others identified HSP110 as a pro-survival factor in Diffuse large B cell lymphomas (DLBCL). Specifically, HSP110 sustains aberrant NFκB signaling in activated B cell DLBCL (ABC-DLBCL) through MYD88 stabilization [Boudesco et al. Blood 2018 Aug 21;32(5):1510-1520]. These findings highlighted HSP110 as a new potential therapeutic target in DLBCL. However, the role of HSP110 in the global signaling pathway of DLBCL has not been studied yet. In addition, the impact of HSP110 inhibition in xenograft models has been restricted by the absence of specific inhibitors.

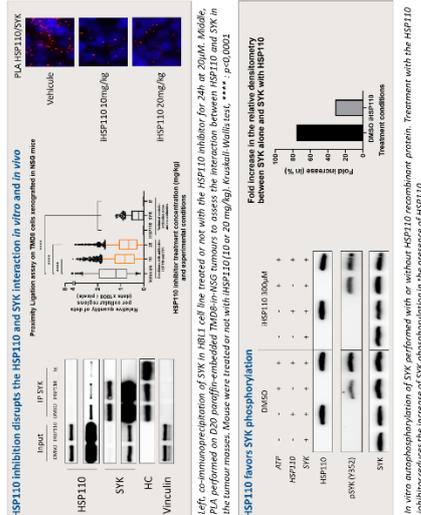
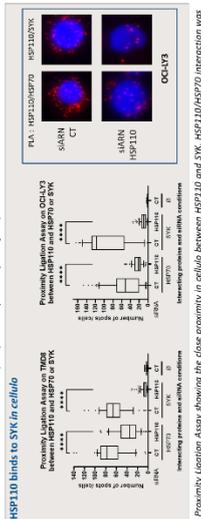
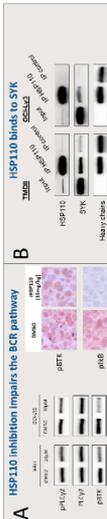
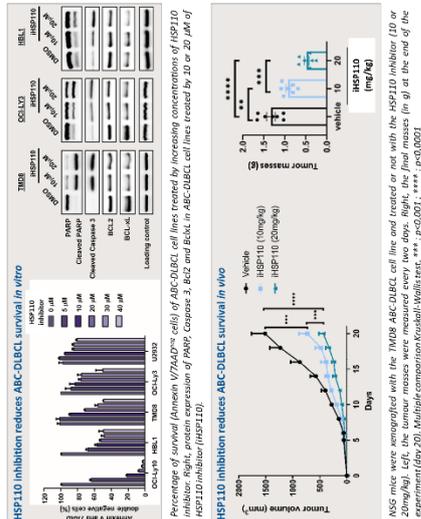
OBJECTIVE(S)

We have recently identified two foldamers by their capacity to specifically disrupt HSP110 functions in colorectal cancer models (WO/2020/030589 and Cell Death Differ. 2020 Jan;27(1):117-129). These first HSP110 inhibitors gave us the opportunity to gain more insight in the signaling pathways controlled by HSP110 in DLBCL. We first wanted to determine the effects of HSP110 inhibitors on DLBCL cell line survival *in vitro* and *in vivo*. Then, we investigated the impact on cell signaling pathways in order to identify new client proteins of HSP110 in those pathways.

METHOD(S)

- Cell survival analysis was assessed by annexin V and 7AAD flow cytometry staining after 96 hours of treatment with HSP110 inhibitor.
- Protein expression was determined by western blot analysis at different time points of incubation with HSP110 inhibitor and by immunohistochemistry on paraffin-embedded tissues from *in vivo* experiments described further.
- Protein interactions were identified by co-immunoprecipitations (coIP) and proximity ligation assay (PLA). For the coIP, cells were seeded at 0.5x10⁶ cells per mL of medium and collected 24h later. 2µg of antibodies were used to immunoprecipitate. For the PLA, cells were seeded at 0.5x10⁶ cells per mL and electroporated with siRNA 24 hours later. They were collected 48 hours later, fixed in 4% PFA, permeabilized with cold methanol and saturated in 3% BSA in TBSTween for one hour. Then, antibodies were incubated overnight, followed by the standard PLA protocol (DuoLink[®], MERCK).
- In vitro* phosphorylation assays were performed with SYK recombinant protein (200ng, MERCK) with or without the presence of ATP (100µM, CST) and HSP110 recombinant protein (10ng, Origene). The reaction was done in a kinase buffer (KST) during 10 minutes at 30°C. The reaction was stopped using Laemmli buffer with SDS and DTT, then analyzed by western blot.
- NSG mice were injected subcutaneously with TMD8 human ABC-DLBCL cells (1.5x10⁶ in 200 µL culture medium) at D0. Mice were randomized based on the tumor volume at D5 and treated i.p. with HSP110 inhibitor (HSP110i) at 10 or 20 mg/kg/inj (Q2Dx8) or with vehicle at the same frequency.

RESULT(S)



CONCLUSION(S)

In conclusion, we identified HSP110 as a regulator of BCR signaling through SYK phosphorylation in DLBCL. This finding highlights HSP110 as a major potential therapeutic target in DLBCL, but also suggest a broader role in lymphoid responses and regulation.

REFERENCES

- Boudesco C, HSP110 sustains chronic NF-κB signaling in activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma through MYD88 stabilization. Blood. 2018 Aug 21;32(5):1510-1520. doi: 10.1182/blood-2017-12-19796. Epub 2018 Jun 5. PMID: 29871863.
- Gozi G. Selecting the first chemical molecule inhibitor of HSP110 for colorectal cancer therapy. Cell Death Differ. 2015 May 8. PMID: 3108676. PMCID: PMC726034.
- Compounds targeting the HSP110 protein for cancer treatment. WO/2020/030589. Inventors : Garrido C., Jego G., Gonzalez D., Voshin-Chiet AS.

CONTACT INFORMATIONS

CABAUD GIBOUIN Vincent - vincent.cabaudgibouin@gmail.com
 JEGO Gaetan : gaetan.jego@u-bourgogne.fr



Titre : Caractérisation fonctionnelle des premiers inhibiteurs de HSP110

Mots clés : Protéine de choc thermique, Lymphome B diffus à grandes cellules, Thérapie ciblée

Résumé : Les protéines de choc thermique sont des chaperons moléculaires fortement exprimés dans les hémopathies malignes. Mon laboratoire de thèse a montré que la protéine de choc thermique HSP110 est une nouvelle cible thérapeutique de première importance dans le cancer colorectal et dans les lymphomes non-Hodgkiniens. Une stratégie de criblage d'une chimiothèque a permis l'identification de deux molécules capables d'inhiber spécifiquement l'activité chaperonne de HSP110. Mon objectif de thèse a été de caractériser et de valider fonctionnellement ces molécules nouvellement identifiées dans les lymphomes B diffus à grandes cellules.

J'ai montré qu'une de ces molécules limite l'interaction de HSP110 avec la protéine de signalisation SYK, kinase essentielle de la voie de signalisation du BCR. Cet inhibiteur réduit la croissance des cellules de lymphomes *in vitro* et *in vivo*. Elle réduit aussi l'activation de la voie NF- κ B, voie essentielle de survie. J'ai enfin montré que l'inhibition de cette voie par notre inhibiteur, en combinaison avec des inhibiteurs de la voie PI3K, bloque complètement la croissance tumorale *in vivo*.

Title: Functional characterization of the first HSP110 inhibitors

Keywords: Heat shock protein, Activated B cell diffuse large B cell lymphoma, Targeted therapy

Abstract : Heat shock proteins are molecular chaperones highly expressed in haematological malignancies. My laboratory has shown that the heat shock protein HSP110 is a new and important therapeutic target in colorectal cancer and in non-Hodgkin's lymphoma. As there were no existing inhibitors of HSP110, a screening strategy of a chemical library was carried out and allowed the identification of two molecules capable of specifically inhibiting the chaperone activity of HSP110. My thesis objective was to characterise and functionally validate these newly identified molecules in diffuse large cell B lymphomas.

I have shown that one of these molecules limits the interaction of HSP110 with the SYK signalling protein, an essential kinase in the BCR signalling pathway in activated diffuse B-cell lymphoma. These molecules reduce the growth of these lymphoma cells *in vitro* and *in vivo*. They reduce the activation of the NF- κ B pathway, an essential survival pathway. Finally, I have shown that inhibition of this pathway by our inhibitor, in combination with inhibitors of the PI3K pathway, completely blocks tumour growth *in vivo*.