

**Rôle des protéines de choc thermique dans les néoplasies
myéloprolifératives : implication de HSP27 dans la
myélofibrose**

Margaux Sevin

► **To cite this version:**

Margaux Sevin. Rôle des protéines de choc thermique dans les néoplasies myéloprolifératives : implication de HSP27 dans la myélofibrose. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCI009 . tel-02094518

HAL Id: tel-02094518

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02094518>

Submitted on 9 Apr 2019

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.

UBFC

UNIVERSITÉ
BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ



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

PREPAREE A U.F.R DES SCIENCES DE SANTE

Ecole doctorale n° 554

Ecole Doctorale Environnements-Santé-E2S

Doctorat de biochimie et biologie moléculaire

Par

Mme SEVIN Margaux

ROLE DES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE DANS LES NEOPLASIES MYELOPROLIFERATIVES :
Implication de HSP27 dans la myélofibrose

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 19 décembre 2017

Composition du Jury :

Mr BASTIE Jean-Noël	PUPH, Hôpital Universitaire François-Mitterrand, Dijon	Président
Mr MOSSUZ Pascal	PUPH, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble	Rapporteur
Mr SOLARY Éric	PUPH, Institut Gustave Roussy, Villejuif	Rapporteur
Mme PLO Isabelle	CR1, Institut Gustave Roussy, Villejuif	Examineur
Mr GIRODON François	PUPH, Hôpital Universitaire François-Mitterrand, Dijon	Directeur de thèse
Mme de THONEL Aurélie	CR1, INSERM UMR1231, Dijon	Co-encadrant de thèse
Mme GARRIDO Carmen	DR1, INSERM UMR1231, Dijon	Invité



ÉCOLE DOCTORALE
Environnements - Santé
Bourgogne | Franche-Comté

Titre : ROLE DES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE DANS LES NEOPLASIES MYELOPROLIFERATIVES : Implication de HSP27 dans la myélofibrose

Mots clés : Myélofibrose, protéines de choc thermique, HSP27, thérapie

La myélofibrose (MF) est la plus agressive des néoplasies myéloprolifératives (NMP). Elle porte à elle seule le plus mauvais pronostic pour les patients puisqu'elle s'accompagne d'une fibrose de la moelle osseuse évoluant vers une insuffisance médullaire. Les inhibiteurs de la kinase JAK2 ont apporté de nouveaux espoirs pour le traitement des NPM mais leurs effets ont été essentiellement bénéfiques sur les symptômes et non sur la fibrose elle-même ni sur le cours de la maladie. Plus récemment, la protéine de choc thermique 90 (HSP90) - connue pour stabiliser JAK2 - est apparue comme une cible thérapeutique prometteuse pour les NMP. Cependant, les inhibiteurs de la HSP90 ont montré une toxicité importante accompagnée d'une expression compensatoire des HSPs inductibles (i.e HSP70, HSP27), connues pour favoriser l'émergence de phénomène de résistance. Par ailleurs, des études ont montré que HSP27 était fortement exprimée chez les patients présentant une fibrose pulmonaire idiopathique ou rénale montrant l'importance de HSP27 dans les processus fibrotiques. Sur la base de l'ensemble de ces données, nous avons évalué d'une part l'efficacité chez l'animal d'un oligonucléotide inhibiteur spécifique de HSP27 appelé OGX-427 (en essai clinique dans plusieurs cancers). D'autre part, nous avons déterminé le niveau d'expression intra- et extracellulaire de HSP27 chez des patients atteints de MF. L'effet de l'OGX-427 a été évalué dans deux modèles murins de myélofibrose, laquelle est induite soit par la sécrétion excessive de thrombopoïétine (TPO^{high}) soit par la mutation JAKV617F. Nous avons mis en évidence dans les souris traitées par l'OGX-427, une réduction de la taille de la rate, de la prolifération mégacaryocytaire et de l'hématopoïèse extramédullaire par rapport aux souris contrôles, révélant ainsi un effet bénéfique de l'inhibition de HSP27 sur la progression de la maladie. De toutes récentes observations complémentaires à ce travail ont également montré une diminution de la fibrose réticulinique dans la moelle osseuse de souris JAKV617F. Au niveau moléculaire, nous démontrons que l'effet prolifératif induit par la voie de signalisation exacerbée - JAK2/STAT5 - est régulé par HSP27 via des interactions directes. Pour finir, nous avons détecté une augmentation de l'expression de HSP27 aussi bien dans les progéniteurs circulants CD34+ que dans le sérum des patients atteints de NMP avec MF. Ce travail révèle pour la première fois le rôle intra et extracellulaire de HSP27 dans la physiopathologie de la MF et le bénéfique thérapeutique potentiel de l'utilisation des inhibiteurs de HSP27 dans cette maladie.

Title: ROLE OF HEAT SHOCK PROTEIN IN MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS: Involvement of HSP27 in myelofibrosis

Keywords: Myelofibrosis, heat shock protein, HSP27, therapy

Myelofibrosis (MF) is the most aggressive myeloproliferative neoplasms (MPN) with the highest degree of morbidity and mortality, including progressive bone marrow fibrosis resulting into bone marrow failure. JAK2 kinase inhibitors have been successfully used for a few years in MPN and more particularly for MF treatment. Nevertheless, their beneficial effects are mainly restricted on symptoms and not on the course of the disease. Recently, heat shock protein 90 (HSP90) - known to stabilize JAK2 - has been reported as a promising therapeutic target in MPN. However HSP90 inhibitors show toxicity and induce the expression of stress-inducible proteins such as HSP70 and, most likely HSP27 as previously shown in other cancers. In addition, we and others have shown that HSP27, was strongly expressed in patients with idiopathic pulmonary or kidney tubulointerstitial fibrosis, underlying a relevant role of HSP27 in fibrotic processes. Taking into account both the beneficial effects of HSP inhibitors in leukemia and in MPN, and the possible implication of HSP27 in fibrosis, we have evaluated here the status of HSP27 in MF patient's samples and assess the effectiveness of an HSP27 oligonucleotide inhibitor called OGX-427 in murine models. We report here the effect of OGX-427 in two murine models of thrombopoietin- and JAKV617F-induced myelofibrosis. OGX-427 limited the progression of the disease associated with a reduction of spleen weight and of megakaryocytic expansion. And more recently, our additional results show a decrease of reticulin fibrosis in JAK2V617F's bone marrow. We show that HSP27 regulates JAK2/STAT5 proliferative effect through direct interactions, and we report an increase expression of HSP27 both in CD34+ circulating progenitors and in the serum of patients with NMP with fibrosis. Taking altogether, this work supports that extra and intracellular HSP27 plays a key role of in the pathophysiology in MF and highlight the potential therapeutic benefit of HSP27 inhibitors in this disorder.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail malgré leurs nombreuses obligations professionnelles : Je remercie le **Professeur Pascal Mossuz** et le **Professeur Éric Solary** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et le **Professeur Jean-Nöel Bastie** ainsi que le **Docteur Isabelle Plo** pour avoir accepté d'être examinateurs.

Je tiens particulièrement à remercier le **Docteur Carmen Garrido** de m'avoir accueillie dans son équipe durant ces 7 années et de m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreuses thématiques. Merci de m'avoir toujours soutenue et de m'avoir fait découvrir le monde des protéines de choc thermique qui me passionne tant. Merci de m'avoir aiguillée dans mes projets et de m'avoir grandement aidée pour la rédaction de mes articles.

Je remercie également le **Professeur François Girodon** de m'avoir fait confiance et d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci d'avoir pris le temps de diriger cette thèse et de m'avoir impliquée dans vos projets sur les néoplasies myéloprolifératives. Merci de m'avoir permise de présenter mes travaux à des congrès internationaux.

Un grand merci au **Docteur Aurélie de Thonel** pour sa grande implication et son soutien sans faille. Merci pour tout ce que tu m'as appris sur les plans scientifiques et techniques. J'ai beaucoup appris à tes côtés. J'espère pouvoir continuer à collaborer avec toi dans le futur.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes avec qui nous avons collaboré dans le cadre de ce projet.

Aussi, je remercie l'ensemble du personnel de la **plateforme de cytométrie**, du **centre de zootechnie** et de **Cellimap**.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble du personnel du **centre hospitalier universitaire de Dijon** que j'ai été amené à côtoyer et plus particulièrement le service des cultures du plateau technique de biologie sans qui ce projet n'aurait pas pu avancer aussi rapidement.

Je remercie l'association **Laurette Fugain**, la **Fondation ARC** et la **Ligue contre le cancer** pour avoir financé mes travaux.

Je remercie chaleureusement tous les membres de **l'Unité UMR1231** et plus particulièrement ceux de **l'équipe Garrido** passés et actuels, avec qui j'ai partagé d'excellents moments.

Je remercie également **mes amis Bourguignons et Parisiens**, qui ont été présents dans les bons et les moins bons moments. Merci à ceux qui ont compris que la thèse était très chronophage.

Mes derniers remerciements iront à **ma famille**. Je suis très reconnaissante envers mes parents et mon beau-père qui m'ont toujours soutenue et aiguillée. Je remercie mes grands-parents pour leur soutien moral et leur bienveillance. Je remercie chaleureusement Olivier, Agnès et ma filleule Alexandra, avec qui j'ai passé d'excellents moments familiaux à Dijon. Et pour finir, je te remercie toi Thomas, le plus incroyable des marchands d'Art de Saint-Ouen.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	4
LISTE DES ANNEXES	8
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	11
AVANT-PROPOS.....	13
ETAT DE L'ART	14
I. La myélofibrose.....	15
I.1. Les néoplasies myéloprolifératives	15
I.1.1. Les néoplasies myéloprolifératives.....	15
I.1.2. Aspects cliniques des néoplasies myéloprolifératives.....	15
a. La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), <i>BCR-ABL1</i> « + »	15
b. Les néoplasies myéloprolifératives classiques, <i>BCR-ABL1</i> -	16
I.1.3. Critères de diagnostics	20
I.2. Physiopathologie de la myélofibrose	22
I.2.1. Altérations génétiques et physiopathologie moléculaire de la MF	23
a. La signalisation JAK-STAT	23
b. Mutations du récepteur à la thrombopoïétine (MPL).....	29
c. Mutations de la calréticuline (<i>CALR</i>)	30
d. Autres mutations associées à la MF	32
I.2.2. Pathogénèse de la myélofibrose	34
a. La niche médullaire contribue à la pathogénèse.....	34
b. L'hématopoïèse extramédullaire.....	40
c. L'inflammation chronique, l'œuf ou la poule	41
I.3. Les modèles murins de MF primitives et secondaires	43

I.3.1.	Les modèles TPO ^{High}	43
a.	Généralités.....	44
b.	Les modèles TPO ^{high} par infection rétrovirale.....	44
I.3.2.	Les modèles <i>JAK2V617F</i>	45
a.	Généralités.....	46
b.	Les modèles transgéniques <i>JAK2V617F</i>	46
I.3.3.	Les modèles <i>CALR</i>	48
I.4.	Les thérapies actuelles pour la MF	49
I.4.1.	Les inhibiteurs des kinases JAKs	50
a.	Le Ruxolitinib	50
b.	Les autres inhibiteurs de JAKs.....	51
I.4.2.	Approches alternatives	52
a.	La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques	52
b.	La combinaison de traitements	53
II.	Les protéines de choc thermique (HSP), nouvelles cibles thérapeutiques dans les néoplasies myéloprolifératives.....	55
II.1.	Généralités sur les HSP.....	55
II.1.1.	La réponse cellulaire au stress.....	55
II.1.2.	Classification des HSPs	57
II.1.3.	HSP90	59
a.	Structure de HSP90	59
b.	Fonctions intracellulaire et extracellulaire de HSP90.....	60
c.	Inhibiteurs de HSP90.....	62
II.1.4.	HSP70	64
a.	Structure de HSP70	64
b.	Fonctions intracellulaires et extracellulaires de HSP70.....	64
c.	Inhibiteurs de HSP70.....	66
II.1.5.	HSP27	67
a.	Structure multi-phosphorylable et oligomérique.....	67
b.	Fonctions et rôles intra et extracellulaire	69
c.	Inhibiteurs de HSP27	71

II.2. Protéines de choc thermique, cibles thérapeutiques pour les néoplasies myéloprolifératives <i>BCR-ABL</i> négatives ?	73
II.2.1. HSP90	73
II.2.2. HSP70	75
III. Mise en relation des données de la littérature et genèse du projet de recherche sur HSP27 76	
 PROJET DE RECHERCHE	 78
 METHODOLOGIE	 79
 IMPACT DE HSP27 DANS LA MYELOFIBROSE : UN NOUVEAU PARTENAIRE POUR JAK2 ET STAT5	 80
I. Matériels et Méthodes.....	81
II. Résultats	94
II.1. Le traitement avec un inhibiteur de HSP27 impacte la progression de la myélofibrose dans le modèle murin TPO ^{high}	94
II.1.1. HSP27 est surexprimée dans le sérum des souris TPO ^{high}	94
II.1.2. La progression de la myélofibrose a été limitée par la déplétion de HSP27.....	95
II.1.3. L'OGX-427 ne présente pas de toxicité aux doses utilisées	96
II.1.4. L'OGX-427 : effets significatifs sur la rate et la moelle osseuse	96
II.1.5. L'OGX427 semble favoriser la survie des animaux TPO ^{high}	101
II.2. Le modèle murin <i>JAK2V617F</i> confirme l'implication de HSP27 dans la physiopathologie de la myélofibrose.....	101
II.3. L'OGX-427 n'induit pas d'effet compensatoire <i>in vivo</i>	103
II.4. HSP27 réduit la prolifération des cellules leucémiques <i>JAK2V617F</i> et interagit directement avec JAK2 et STAT5	105
II.4.1. Effet antiprolifératif de l'inhibition de HSP27 dans les cellules leucémiques mutantes pour <i>JAK2V617F</i>	105
II.4.2. Effet antiprolifératif d'un shRNA-HSP27 par infection rétrovirale sur la lignée HEL92.1.7 et de progéniteurs de patients <i>JAK2V617F</i>	107
II.4.3. La déplétion de HSP27 module la voie JAK2/STAT5/cMYC dans les lignées leucémiques <i>JAK2V617F</i>	109
II.5. L'expression de HSP27 est augmentée dans les cellules de patients atteints de MF	115
II.5.1. HSP27 est surexprimée dans les cellules souches circulantes de patients MF.....	115

II.5.2. HSP27 et HSP90 sont augmentées dans le sérum de patients atteints de MF.....	116
II.5.3. HSP27 est fortement exprimée sur les coupes histologiques des biopsies osseuses de patients avec myélofibrose	117
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES.....	119
CONCLUSIONS	132
SCHEMA RECAPITULATIF	133
BIBLIOGRAPHIE.....	134
ANNEXE	163

Liste des annexes

- **Annexe 1** : Tableau des inhibiteurs de HSP90
- **Annexe 2** : Article 1; Impact of HSP27 in myelofibrosis: a new partner of JAK2/STAT5.
- **Annexe 3** : Article 2; HSP90 and HSP70: Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms.
- **Annexe 4** : Données supplémentaires
- **Annexe 5** : Liste des publications et participations aux congrès

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Les néoplasies myéloprolifératives	20
Figure 2 : Représentation schématique de la voie de signalisation JAK-STAT	25
Figure 3 : Activation physiologique des récepteurs homodimériques aux cytokines via la voie JAK2 .	28
Figure 4 : Rôle des récepteurs aux cytokines dans la signalisation JAK2V617F	29
Figure 5 : Rôle des récepteurs aux cytokines dans la signalisation CALR	32
Figure 6 : Schématique représentation de l'environnement médullaire	35
Figure 7 : Hématopoïèse et engagement mégacaryocytaire	37
Figure 8 : Pathogénèse de la myélofibrose	40
Figure 9 : Schéma représentatif des possibilités thérapeutiques dans la MF	54
Figure 10 : Schématique représentation de la réponse au stress par HSF1 chez les vertébrées.	56
Figure 11 : Schéma de la structure de HSP90 monomérique et dimérique	60
Figure 12 : Le cycle chaperon de HSP90.....	61
Figure 13 : Structure et modèle schématique du cycle chaperon de HSP70	65
Figure 14 : Structure et organisation de HSP27 humaine	68
Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'inhibition de HSP90 et JAK2 dans les cellules JAK2 dépendantes	75
Figure 16 : HSP27 est surexprimée dans le sérum des souris TPO ^{high}	94
Figure 17 : Stratégie <i>in vivo</i> de l'inhibition de HSP27 par l'OGX-427 dans le modèle TPO ^{high}	95
Figure 18 : L'OGX-427 n'induit pas de modification des paramètres sanguins chez les souris TPO ^{high}	96
Figure 19 : L'OGX-427 diminue significativement le poids et la taille de la rate chez les souris TPO ^{high}	97
Figure 20 : L'OGX-427 diminue l'hématopoïèse extramédullaire dans la rate des souris TPO ^{high}	98
Figure 21 : L'OGX-427 limite l'hypoplasie érythrocytaire dans la moelle osseuse des souris TPO ^{high} ..	99
Figure 22 : L'OGX-427 diminue l'hyperplasie mégacaryocytaire dans la moelle osseuse des souris TPO ^{high}	100
Figure 23 : Le traitement à l'OGX semble stabiliser la mortalité des souris TPO ^{high}	101
Figure 24 : Stratégie <i>in vivo</i> de l'inhibition de HSP27 par l'OGX-427 dans le modèle JAK2V617F	102
Figure 25 : L'OGX-427 normalise le taux plaquettaire et diminue le poids de la rate de souris JAK2V617F	103
Figure 26 : L'OGX-427 n'induit pas d'expression compensatoire de HSP70 ni de HSP90.....	104
Figure 27 : La prolifération des cellules leucémiques JAK2V617F est affectée par la déplétion de HSP27	106

Figure 28 : La déplétion de HSP27 n'induit pas de mort cellulaire dans les cellules leucémiques.....	107
Figure 29 : Le shRNA-HSP27 diminue significativement la prolifération cellulaire des cellules HEL92.1.7.....	108
Figure 30 : Le shRNA-HSP27 diminue significativement la prolifération cellulaire des cellules de patients <i>JAK2V617F</i> et affecte la clonogénicité	108
Figure 31 : HSP27 régule la phosphorylation de STAT5 et l'expression de C-Myc dans les cellules <i>JAK2V617F</i>	110
Figure 32 : Validation de la spécificité du capteur HSP27.....	111
Figure 33 : HSP27 interagit directement avec JAK2 et les isoformes alpha et beta de STAT5	112
Figure 34 : HSP27 interagit avec JAK2 et STAT5.....	113
Figure 35 : HSP27 permet la stabilité du complexe JAK2/STAT5	114
Figure 36 : HSP27 est surexprimée dans les cellules CD34+ ; CD45faible des patients MF.....	115
Figure 37 : HSP27 est surexprimée chez les patients atteints de PMF	116
Figure 38 : HSP27 et HSP90 sont fortement exprimées dans les sérums de patients MF comparativement aux donneurs sains	117
Figure 39 : Les patients MF ont une forte expression de HSP27 dans la moelle osseuse	118
Figure 40 : L'OGX-427 modifie le pourcentage de cellules souches et progénitrices dans la rate à 22 semaines post greffe	124
Figure 41 : L'OGX-427 diminue la fibrose réticulinique dans la moelle des souris <i>JAK2V617F</i>	127
Figure 42 : HSP27 est une cible thérapeutique dans la MF	133
Tableau 1 : Critères diagnostiques OMS 2016 pour la polyglobulie de Vaquez (PV).....	21
Tableau 2 : Critères diagnostiques OMS 2016 pour la thrombocytémie essentielle (TE)	21
Tableau 3 : Critères diagnostiques OMS 2016 pour les myélofibroses (MF).....	22
Tableau 4 : Autres mutations somatiques dans la MF.....	33
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents modèles murins <i>JAK2V617F</i>	48
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des thérapies émergentes dans les traitements de la MF.....	53
Tableau 7 : Nomenclature de la famille de HSP90 (HSPC) chez l'homme	57
Tableau 8 : Nomenclature de la famille de HSP70 (HSPA) et HSP110 (HSPH) chez l'homme.	58
Tableau 9 : Nomenclature des petites HSPs chez l'homme.....	59

Liste des abréviations

ABD	ATP binding domain	KI	knock in
AIF	apoptosis inducing factor	KO	knock out
ASXL1	additional sex comb-like1	LAM	leucémie aigüe myéloïde
CALR	calréticuline	LMC	leucémie myéloïde chronique
CBL	Casitas B-lineage lymphoma	LNK	lymphocyte adapter protein
CFU-MK	colony forming unit megakaryocyte	LT-CSH	cellule souche hématopoïétique (long term)
CMN	cellules mononuclées	MAPK	mitogen activated protein kinase
CPE	cellules progénitrices endothéliales	MDSC	myeloid-derived suppressor cells
CSC	cellules souches circulantes	MEC	matrice extracellulaire
CSH	cellule souche hématopoïétique	MEP	megakaryocytes-erythroid progenitor
CSM	cellules souches mésenchymateuses	MF	myélofibrose
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12	MFP	myélofibrose primitive
DMV	densité des microvaisseaux médullaire	MK	mégacaryocyte
DNMT3A	DNA (cytosine-5) methyltransferase 3A	MPL	myeloproliferative leukemia protein ou thrombopoïétine
eHSP90	extracellulaire HSP90	MPN-BP	blast-phase myeloproliferative neoplasms
EPO	érythropoïétine	NF-κB	NF-Kappa-beta
EPOR	récepteur à l'érythropoïétine	NMP	néoplasies myéloprolifératives
ERK	extracellular signal-regulated kinases	NT	non transfecté
FGF	fibroblast growth factor	OMS	Organisation mondiale de la santé
FOG-1	friend of GATA-1	OPG	ostéoprotégérine
G-CSFR	granulocytes-colony stimulating factor receptor	p38MAPK	mitogen-activated protein kinase p38
HDAC	histones désacétylases	PBD	peptide binding domain
HeBSS	Hepes Buffered Saline solution	PDGF	platelets derived growth factor
HEM	hématopoïèse extramédullaire	PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
HSE	heat shock element	PIAS	protein inhibitors of STATs
HSF	heat shock factor	PV	polyglobulie de Vaquez
HSP	heat shock protein	RANKL	receptor activator of nuclear factor kappaB ligand
IDH	isocitrate déshydrogénase	RE	réticulum endoplasmique
IL	interleukine	ROS	reactive oxygen species
JAK2	Janus kinase 2		

SDF-1	stromal cell-derived factor 1	TE	thrombocytémie essentielle
siRNA	ARN interférant	TET2	tet méthylcytosine dioxygénase 2
SOCS	suppressors of cytokine signaling	TGF	transforming growth factor
STAT	signal transduceur and activateur of transcription	TLR	toll-like receptor
ST-CSH	cellule souche hématopoïétique (short term)	TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
STIP1	stress-induced phosphoprotein	TPOR	récepteur à la thrombopoïétine
SVF	sérum de veau foetal	TYK2	tyrosine kinase 2
		VEGF	vascular endothelial growth factor

Avant-propos

La myélofibrose est la plus grave des néoplasies myéloprolifératives classiques dont font partie la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle. Elle est caractérisée par une physiopathologie complexe et porte à elle seule le plus mauvais pronostic pour les patients.

Ce travail de thèse débutera par un état de l'art sur les néoplasies myéloprolifératives pour rapidement se focaliser sur la myélofibrose, sa physiopathologie et les voies de signalisation associées. De nombreuses études sur la myélofibrose ont conduit au développement de différents modèles murins qui seront évoqués et ont également permis l'émergence de nouvelles molécules, actuellement en clinique ou en essais cliniques, pour le traitement de cette pathologie. Nous présenterons les inhibiteurs de protéines de choc thermique ou HSPs qui sont considérés comme un nouvel espoir thérapeutique pour la myélofibrose. Cette famille de chaperons est composée de différents membres dont HSP27, HSP70 et HSP90 qui sont bien connus pour leur implication dans de nombreux cancers. Nous présenterons la structure et les fonctions intracellulaires et extracellulaires ainsi que les différentes stratégies d'inhibition, de ces trois HSPs. L'implication de HSP90 et HSP70 dans les néoplasies myéloprolifératives sera ensuite exposée, ainsi que les travaux et données de la littérature nous ayant permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle HSP27 pourrait être un nouvel acteur dans la myélofibrose et constituer une cible thérapeutique pertinente.

La méthodologie du travail expérimental de thèse sera présentée avant de développer la partie matériel et méthode. Une seconde partie sera consacrée aux résultats obtenus, lesquels mettent en évidence et ce, pour la première fois, le rôle de HSP27 dans le développement de la myélofibrose. Ce travail sera ensuite discuté et les perspectives énoncées.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un article actuellement soumis dans la revue Nature Communications, lequel est présenté en annexe.

ETAT DE L'ART

I. LA MYELOFIBROSE

I.1. Les néoplasies myéloprolifératives

Le concept des syndromes myéloprolifératifs a été introduit pour la première fois en 1951, par l'hématologue américain William Dameshek [1]. Il décrit dans son éditorial, des états caractérisés par une prolifération excessive de précurseurs de la moelle osseuse et une production excessive des cellules sanguines matures.

Ce fut en 2008 que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) introduisit le terme de « néoplasie » afin de catégoriser les néoplasies myéloïdes et plus particulièrement les néoplasies myéloprolifératives (NMP) [2].

I.1.1. Les néoplasies myéloprolifératives

Les NMP sont définies comme des hémopathies malignes hétérogènes, de faible incidence, résultant de la transformation d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) myéloïde par un événement moléculaire, lequel procure un avantage prolifératif au clone [3]. Les NMP sont classées en 9 sous-types par l'OMS.

Dans ce travail, seuls les 4 principaux sous-types seront traités, lesquels étant classés en fonction du chromosome Philadelphie (Ph +) et/ou du gène de fusion *BCR-ABL1*. On distingue (1) la leucémie myéloïde chronique (LMC) qui est « Ph + », (2) la polyglobulie de Vaquez (PV) « Ph - », (3) la thrombocytémie essentielle (TE) « Ph - » et (4) la myélofibrose primitive (MFP) « Ph - ».

I.1.2. Aspects cliniques des néoplasies myéloprolifératives

a. La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), *BCR-ABL1* « + »

La leucémie myéloïde chronique (LMC, *BCR-ABL1+*) est un NMP prenant son origine dans les CSH pluripotentes [4]. Elle se traduit par une dérégulation de la prolifération des lignées myéloïdes et plus particulièrement de la lignée granulocytaire sans blocage de maturation [5].

La découverte de la LMC est souvent fortuite puisque dans 50% des cas aucun symptôme n'est détecté. Contrairement aux autres NMP, la LMC est constamment associée avec une anomalie

cytogénétique unique. Celle-ci résulte de la translocation chromosomale réciproque des bras long des chromosomes 9 et 22 [6]. La conséquence moléculaire de cette translocation (9 ;22) est un gène de fusion *BCR-ABL1* constitutivement activé avec une activité oncogénique tyrosine kinase [7]. L'expression de la protéine BCR-ABL1 induit de façon constitutive des voies de signalisation conduisant à la prolifération anormale de cellules de la moelle osseuse et aux manifestations cliniques et morphologiques qui la caractérisent [4].

Chez les patients non traités, une progression en trois phases était observée : une phase initiale chronique suivie par une phase d'accélération et une phase blastique [4]. Néanmoins, depuis l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase de type Imatinib®, l'immense majorité des patients reste en phase chronique. Biologiquement, l'hémogramme est anormal avec une anémie modérée, une hyperleucocytose franche, une polynucléose neutrophile avec myélémie (passage dans le sang de cellules immatures de la lignée granulocytaire) et un excès de polynucléaires basophiles.

b. Les néoplasies myéloprolifératives classiques, *BCR-ABL1*-

Les NMP dites « classiques » aussi appelées *BCR-ABL1* négatives sont les pathologies myéloprolifératives les plus fréquentes.

Elles sont caractérisées par une production excessive de cellules sanguines différenciées et fonctionnelles [8]. Les NMP classiques sont classées en trois entités : la PV, la TE et la MFP. Les complications comprennent des thromboses, des hémorragies ou des transformations blastiques de très mauvais pronostic [9].

Les NMP sont classées dans les cancers rares du fait de leur faible incidence, elles toucheraient 6 personnes sur 100 000 par an [10]. En 2014, une méta-analyse épidémiologique regroupant de nombreuses publications européennes a évalué l'incidence des différents NMP en Europe. Les incidences de la PV et la TE varient respectivement entre 0,4-2,8 et 0,38-1,7 nouveaux cas pour 100 000 personnes par an. La MF est à la fois la plus grave des NMP avec une médiane de survie de 2-5 ans [11] et la plus rare des NMP avec une incidence qui varie entre 0,1 et 1 nouveau cas pour 100 000 personnes par an [11].

i. La polyglobulie de Vaquez (PV)

La polyglobulie de Vaquez fut décrite pour la première fois en 1892 par Louis Henry Vaquez [12]. Elle est souvent diagnostiquée autour de 60 ans et est définie par l'expansion clonale de la lignée érythroïde ayant pour conséquence une production anormalement élevée d'érythrocytes normaux.

Pour 40 % des patients, l'érythrocytose est accompagnée d'une leucocytose et une thrombocytose. Au diagnostic, les patients présentent une anomalie de l'hémogramme (augmentation de l'hématocrite > 49 % chez l'homme et > 48% chez la femme). L'examen clinique montre une splénomégalie modérée (30% des cas)[13], qui est parfois associée à une hépatomégalie. Biologiquement, la polyglobulie se traduit par (1) un taux élevé de l'hémoglobine, de l'hématocrite ou de la masse des globules rouge (2) une hypercellularité médullaire, une prolifération anormale des trois lignées médullaires (érythroïde, granulocytaire et mégacaryocytaire) et la présence de mégacaryocytes (MK) matures de différentes tailles dans la moelle et (3) une mutation de la tyrosine kinase JAK2 (*JAK2V617F* sur l'exon 14 ou plus rarement de l'exon 12). Le taux sérique d'érythropoïétine (EPO) est fréquemment en dessous de la normale [13].

ii. La thrombocythémie essentielle (TE)

La thrombocythémie essentielle fut décrite pour la première fois par Emil Epstein et Alfred Goedel en 1934 [12]. Elle survient le plus souvent après 60 ans et affecte plus les femmes que les hommes. Cependant, un deuxième pic de fréquence vers 30 ans est observé majoritairement chez la femme. Elle touche principalement la lignée mégacaryocytaire et se traduit par une thrombocytose à l'hémogramme, définie par un taux plaquettaire élevé (> $450.10^9/L$).

Le diagnostic est souvent délicat puisqu'il n'existe aucun marqueur spécifique, il consiste donc en un diagnostic d'exclusion d'avec les autres NMP et d'écarter les thrombocytoses réactives [13]. Dans 2/3 des cas, la découverte est fortuite et révèle une anomalie de l'hémogramme. Pour 1/3 des cas les signes cliniques sont dominés par des accidents thrombotiques et hémorragiques. Environ 20 % des patients présentent une splénomégalie modérée [13].

Biologiquement, la TE se traduit par (1) une augmentation du nombre de plaquettes, (2) une hyperplasie mégacaryocytaire médullaire de MK matures ou présentant des noyaux hyperlobés, (3) une mutation (*JAK2*, *CALR* ou du récepteur à la thrombopoïétine *MPL* (*Myeloproliferative leukemia virus*)) [13].

iii. Les myélofibroses primitives (MFP) et secondaires (MF post PV/TE)

La myélofibrose primitive a initialement été décrite et caractérisée par Gustave Hueck en 1879 [12]. Elle est la plus rare des 3 NMP et touche plutôt les hommes que la femme. De manière générale, la MF est dite primitive si elle apparaît « spontanément » ; secondaire si elle fait suite à l'évolution d'une PV ou d'une TE. Elle est traduite par l'expansion clonale de cellules souches hématopoïétiques et l'augmentation du nombre de progéniteurs myéloïdes (CD34⁺) dans le sang périphérique.

Les cellules issues du clone malin (CD34⁺, MK et les monocytes) vont induire une hyperproduction de cytokines pro-angiogéniques, pro-inflammatoires et pro-fibrotiques ainsi que des composants de la matrice extracellulaire. Il en résulte une fibrose médullaire et une hématopoïèse extramédullaire (HEM) dans la rate. A l'examen clinique, 80 à 90% des patients présentent une splénomégalie considérable [13]. Biologiquement, deux stades sont maintenant décrits pour la MFP, un stade pré-fibrotique (pré-MFP) et un stade fibrotique manifeste (MFP déclarée) [13]. Ils se distinguent par l'examen de la biopsie ostéo-médullaire. Dans le premier cas, on observe une hyperplasie mégacaryocytaire sans fibrose réticulinique de la moelle osseuse accompagnée d'une augmentation de la prolifération de la lignée granulocytaire et de la diminution de l'érythropoïèse. Dans le second, on observe une prolifération des MK accompagnée d'une fibrose soit réticulinique soit collagénique de grade 2 ou 3. Les deux grades partagent des critères communs qui sont : (1) l'absence de critères faisant penser à une autre NMP, (2) la présence d'une mutation (*JAK2*, *CALR* ou *MPL*) ou d'un marqueur clonal ou l'absence de myélofibrose réactionnelle [13]. D'autres critères sont aussi retrouvés chez les patients comme l'anémie, la leucocytose, le taux élevé de LDH (lactate déshydrogénase) et la présence d'une érythromyélie exclusivement retrouvée dans le stade MFP déclarée.

Il est important de noter que certains patients TE et MFP sont dits triples négatifs, c'est-à-dire qu'ils ne possèdent aucune des mutations classiques (*JAK2*, *CALR* ou *MPL*). Dans ces

circonstances, il est possible de mettre en évidence d'autres mutations plus atypiques, en particulier de MPL ou LNK (*lymphocyte adapter protein*). De plus, la recherche d'autres mutations par exemple sur les gènes *TET2* (*tet methylcytosine dioxygenase 2*), *ASXL1* (*additional sex comb-like1*), *DNMT3A* (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A*) ou *IDH* (*isocitrate dehydrogenase*), ainsi que sur des facteurs d'épissages, non recherchés en routine, peuvent être utilisés pour affirmer la clonalité de la maladie [13], [14].

Les patients PV et TE peuvent dans certains cas progresser vers une myélofibrose secondaire (post-PV et post-TE MF) [15]. Dix ans après le diagnostic de la PV, approximativement 6% des patients déclarent une MF post-PV[16]. En revanche, le pourcentage de patients TE qui progresse vers une myélofibrose est plus faible, soit 1% des cas après 10 ans et <10% des cas après 15 ans post-diagnostic [17]. Il semblerait que les MF secondaires (post PV/TE) partagent de nombreuses caractéristiques avec la MF primitive mais on peut relever des différences morphologiques (cellulaire, type de mégacaryocytes ou hémogramme) et également cytogénétiques [17] [18].

iv. Evolution des néoplasies myéloprolifératives

De façon générale, l'évolution des NMP peut être compliquée par des événements thrombo-hémorragiques ou des transformations blastiques en leucémie aigüe myéloblastique (LAM) post-NMP ou « *blast-phase myeloproliferative neoplasms (MPN-BP)* » [19].

Cliniquement, on convient d'une évolution blastique dès lors que l'on retrouve dans le sang périphérique ou la moelle osseuse du patient NMP, 20% ou plus de cellules blastiques. Le pourcentage d'évolution en MPN-BP va varier en fonction du type de néoplasies. Habituellement, la transformation blastique est plus importante chez les patients atteints de MFP, avec une incidence de 10 à 20% pour les dix premières années de la maladie [20][21]. Chez les patients PV et TE, l'incidence à 10 ans est quant à elle plus faible avec réciproquement une incidence de 2,3% [22] et moins de 1% [23]. Il est intéressant de noter que les patients PV et TE peuvent progresser directement vers une LAM sans passer par une phase fibrotique [19].

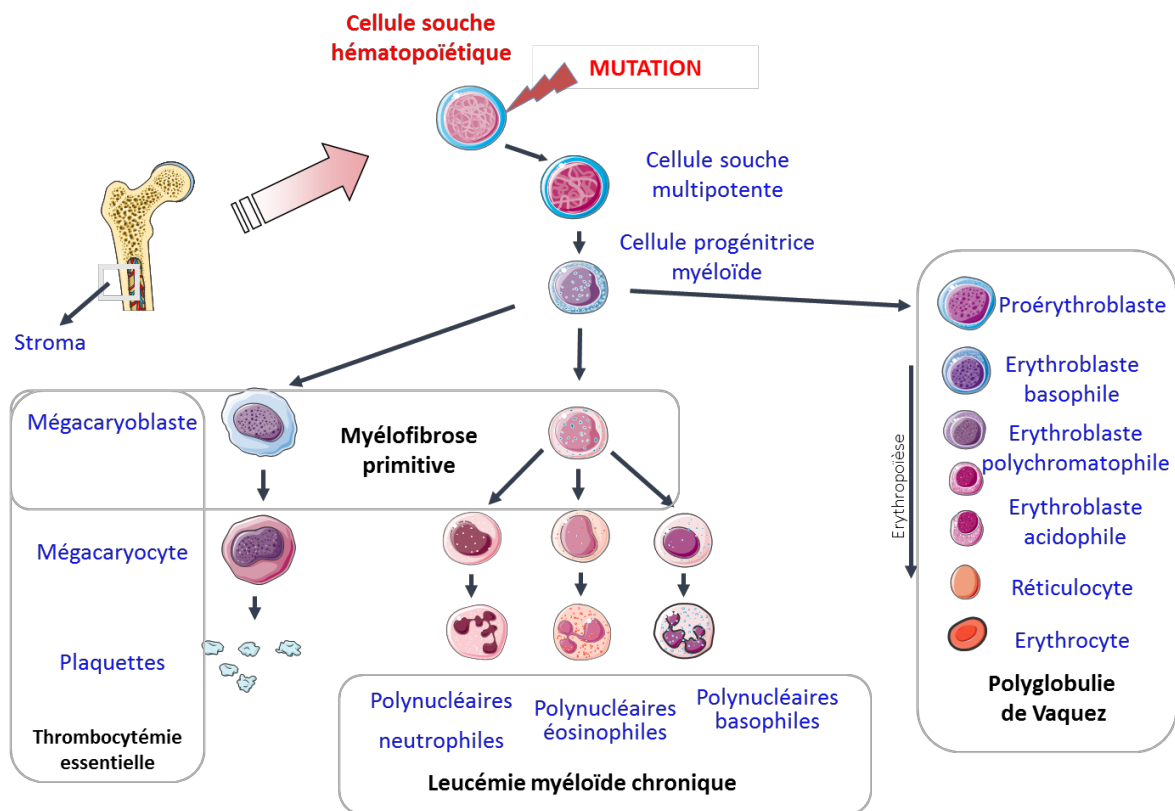


Figure 1 : Les néoplasies myéloprolifératives

Hormis la myéloblastose, toutes les NMP sont associées à une myéloprolifération pure, conduisant à une augmentation de la production de cellules sanguines matures qui prédomine sur une autre lignée. Pour la thrombocytémie essentielle : la lignée mégacaryocytaire est touchée; pour la leucémie myéloïde chronique : la lignée granulocytaire est touchée et pour la polyglobulie de Vaquez la lignée érythrocytaire est touchée. Concernant la MF, les lignées mégacaryocytaires et granuleuses sont touchées.

I.1.3. Critères de diagnostics

En 2016, l'OMS a révisé sa classification de 2008 concernant les NMP (**Tableau 1-3**), dans le but d'intégrer les informations récentes concernant les avancées en génétique, l'immunophénotypage, la morphologie et le pronostic pour les patients. Les plus grands changements concernent les NMP classiques non *BCR-ABL1* tel que l'amélioration de la normalisation des caractéristiques morphologiques, une définition plus précise des données cliniques (mise en place de deux stades distincts pour la MF) et l'intégration des nouvelles données moléculaires (identification des mutations *MPL* et *CALR*) [24]. Parallèlement à l'OMS en 2008, le groupe de Recherche Internationale sur la Myéloblastose et le Traitement adressa ses directives concernant les MF post PV/TE [25].

2016 WHO diagnostic criteria for PV

(Diagnosis of PV requires meeting either all 3 major criteria, or the first 2 major criteria and the minor criterion)

Major criteria

Criterion 1 (clinical)

Hb, or	>16.5 g/dL in men, >16.0 g/dL in women
Hematocrit, or	>49% in men, >48% in women
Red cell mass	Increased 25% above mean normal predicted value

Criterion 2 (morphologic)

BM morphology*	Hypercellularity for age with trilineage growth (panmyelosis), including prominent erythroid, granulocytic, and megakaryocytic proliferation with pleomorphic, mature MKs (differences in size)
----------------	---

Criterion 3 (genetic)

JAK2V617F, or	Presence
JAK2 exon 12 mutation	Presence

Minor criterion

Serum Epo level	Subnormal
-----------------	-----------

Tableau 1 : Critères diagnostiques OMS 2016 pour la polyglobulie de Vaquez (PV)

Le diagnostic de PV nécessite soit l'ensemble des 3 critères majeurs, soit les deux premiers et le critère mineur. Le critère 2 (BOM) n'est pas indispensable en cas d'érythrocytose absolue [Hb > 18.5 g/dL (ou Hte > 55.5 %) chez l'homme ou > 16.5 g/dL (Hte > 49.5%) chez la femme si le critère majeur 3 et le critère mineur sont tous deux présents.

D'après l'article de Passamonti et col, 2016

2016 WHO diagnostic criteria for ET

(Diagnosis of ET requires meeting all 4 major criteria, or the first 3 major criteria and the minor criterion)

Major criteria

Criterion 1 (clinical)

Platelet count	>450 × 10 ⁹ /L
----------------	---------------------------

Criterion 2 (morphologic)

BM morphology	Proliferation mainly of the MK lineage with increased numbers of enlarged, mature MKs with hyperlobulated nuclei. No significant increase or left-shift in neutrophil granulopoiesis or erythropoiesis, and very rarely minor (grade 1) increase in reticulin fibers
---------------	--

Criterion 3 (clinical)

WHO criteria for BCR-ABL1 + CML, PV, PMF, MDS, or other myeloid neoplasms	Not meeting
---	-------------

Criterion 4 (genetic)

JAK2, CALR, or MPL mutation	Presence
-----------------------------	----------

Minor criterion

Clonal marker, or	Presence
Reactive thrombocytosis	Absence

Tableau 2 : Critères diagnostiques OMS 2016 pour la thrombocytémie essentielle (TE)

Le diagnostic de TE nécessite soit l'ensemble des 4 critères majeurs, soit les trois premiers et le critère mineur.

D'après l'article de Passamonti et col, 2016

2016 WHO diagnostic criteria for prefibrotic/early PMF

(Diagnosis of pre-PMF requires meeting all 3 major criteria, and at least 1 minor criterion)

Major criteria

Criterion 1 (morphologic)

BM morphology

Megakaryocytic proliferation and atypia, without reticulin fibrosis > grade 1, accompanied by increased age-adjusted BM cellularity, granulocytic proliferation, and often decreased erythropoiesis

Criterion 2 (clinical)

WHO criteria for BCR-ABL1 + CML, PV, ET, MDS, or other myeloid neoplasms

Not meeting

Criterion 3 (genetic)

JAK2, CALR or MPL mutation, or

Presence

Clonal marker,† or

Presence

Reactive BM reticulin fibrosis‡

Absence

Minor criteria

Anemia not attributed to a comorbid condition

Presence

Leukocyte count

 $\geq 11 \times 10^9/L$

Spleen size

Palpable

Serum LDH

Increased to above upper normal limit of institutional reference range

2016 WHO diagnostic criteria for PMF

(Diagnosis of overt PMF requires meeting all 3 major criteria, and at least 1 minor criterion)

Major criteria

Criterion 1 (morphologic)

BM morphology

Presence of megakaryocytic proliferation and atypia, accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis grades 2 or 3

Criterion 2 (morphologic)

WHO criteria for ET, PV, BCR-ABL1 + CML, MDS, or other myeloid neoplasms

Not meeting

Criterion 3 (genetic)

JAK2, CALR, or MPL mutation, or

Presence

Clonal marker,† or

Presence

Reactive BM reticulin fibrosis‡

Absence

Minor criteria

Anemia not attributed to a comorbid condition

Presence

Leukocyte count

 $\geq 11 \times 10^9/L$

Spleen size

Palpable

Serum LDH

Increased to above upper normal limit of institutional reference range

Leukoerythroblastosis

Presence

Tableau 3 : Critères diagnostiques OMS 2016 pour les myélofibroses (MF)

Le diagnostic de pré-MF ou MF établit nécessite l'ensemble des 3 critères majeurs, et au moins l'un des critères mineurs.

D'après l'article de Passamonti et col, 2016

I.2. Physiopathologie de la myélofibrose

La MF est non seulement la plus grave des NMP, compte tenu de son mauvais pronostic (médiane de survie de 5 ans tous stades confondus), mais aussi la plus complexe, de par son étiologie mal connue. La découverte d'altérations génétiques et le décryptage de voies de signalisation dérégulées, ont permis une avancée majeure dans la compréhension de la physiopathologie de la MF. De plus, grâce aux différents modèles murins développés, une source d'informations non négligeables a pu être générée et a permis de mieux comprendre les mécanismes responsables de la MF et de mieux appréhender l'efficacité des thérapies.

I.2.1. Altérations génétiques et physiopathologie moléculaire de la MF

Depuis 2005, de nombreuses mutations somatiques ont été identifiées pour être à l'origine du clone malin. Trois mutations, dites mutations « *drivers* », sont utilisées comme critères de diagnostic pour la MF et représentent à elles seules 85 % des patients atteints de MF primitives : la mutation du gène de la protéine Janus kinase 2 (*JAK2*), la mutation du gène du récepteur à la thrombopoïétine (*MPL*) et la mutation du gène de la calréticuline (*CALR*) [26]–[30]. Il semblerait que certaines mutations aient une valeur pronostique [31].

a. La signalisation JAK-STAT

i. Les Janus kinases (JAKs) et les facteurs de transcriptions STATs

Chez les mammifères, la famille des Janus tyrosines kinases (JAKs) est composée de quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et la Tyrosine kinase 2 (TYK2) [32]. JAK1, JAK2 et Tyk2 sont exprimés de manière ubiquitaire alors que JAK3 est restreint au système hématologique [32].

L'emblème de la famille des JAKs est l'existence de deux domaines kinases en tandem. En effet, les JAKs sont composées de 4 grands domaines dont (1) un domaine FERM (band 4.1, *e*zrin, *r*adixin, *m*oesin) en amino-terminale qui permet l'interaction avec les récepteurs membranaires et qui promeut la fonction kinase, (2) un domaine pseudo-SH2 (*S*rc *h*omology 2) aussi impliqué dans l'interaction avec le récepteur, (3) un domaine pseudo-kinase régulant l'activité catalytique du domaine kinase ou JH2 et (4) un domaine kinase qui contient le résidu tyrosine nécessaire à son activité catalytique en partie carboxy-terminale ou JH1 [33] (**Figure 2**).

Les JAKs sont des tyrosines kinases de haut poids moléculaires (120-140 kDa) s'associant à des récepteurs aux cytokines de type I comme par exemple les récepteurs homodimériques (EPO, TPO, G-CSF (*G*ranulocytes-*c*olony *s*timulating *f*actor)) et de type II comme par exemple les récepteurs aux interférons. Ces derniers sont dépourvus d'activité enzymatique, ce qui permet une transduction rapide du signal de la membrane vers le noyau [34]. Les récepteurs de type I et II sont activés par la fixation du ligand spécifique à leur domaine extracellulaire. Cette reconnaissance induit l'oligomérisation/dimérisation du récepteur et entraîne l'apposition de la protéine JAK au domaine cytosolique du récepteur. Il s'en suit une cross-phosphorylation permettant l'initiation de la signalisation [34].

La principale voie de signalisation des JAKs est la voie des STATs (*signal transduceur and activateur of transcription*). Cette voie joue un rôle essentiel dans la prolifération myéloïde, la survie, la différenciation et la réponse immunitaire. D'autres voies peuvent aussi être induites par les JAKs tels que la voie des MAPK (*mitogen activated protein kinase*), la voie PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) et celle d'AKT [35]

En ce qui concerne les facteurs de transcription STATs, le génome humain code pour 7 protéines (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6) qui sont les médiateurs d'environ 30 récepteurs aux cytokines [36]. Les gènes sont regroupés en 3 clusters et tous les membres de la famille partagent 7 domaines protéiques conservés [37].

Structurellement les STATs sont composées (1) d'un domaine amino-terminal impliqué dans l'interaction protéine-protéine, (2) un domaine *coiled-coil* aussi impliqué dans les interactions protéine-protéine et contenant un signal de localisation nucléaire, (3) un domaine de liaison à l'ADN interagissant directement avec l'ADN et contenant des signaux d'imports et d'exports nucléaire, (4) un domaine *linker* nécessaire à la conformation tridimensionnelle qui promeut l'activité transcriptionnelle, (5) un domaine SH2 essentielle à la dimérisation et aux interactions avec les récepteurs, (6) un domaine de transactivation contenant les tyrosines phosphorylables et (7) un domaine carboxy-terminal contenant des serines phosphorylables [33] (**Figure 2**).

Physiologiquement, les STATs sont à l'état latent et non phosphorylées dans le cytoplasme. Faisant suite à la fixation d'une cytokine au récepteur, elles sont activées par phosphorylation sur des résidus tyrosine par les kinases de la famille JAK. Le mécanisme de recrutement des STATs n'a pas encore été totalement élucidé mais on pourra relever que les STATs interagissent avec des protéines adaptatrices comme STIP1 (*Stress-induced phosphoprotein 1*) ou RACK1 par exemple, facilitant ainsi le recrutement au récepteur et l'amorçage de la voie de signalisation [38], [39].

Une fois activées, les STATs vont migrer dans le noyau où elles vont interagir avec une région régulatrice de l'ADN ou DRE (*DNA regulatory element*), qui se situe souvent à distance des gènes qu'elles régulent. De façon générale, on regroupe les régions distales en trois catégories : les régions amplificatrices (*enhancers*), les régions épigénétiques et les loci-non codants (micro-ARN ou ARN non codants) [33]. Les gènes ciblent sont nombreux et vont dépendre de la signalisation en amont. On notera que dans la signalisation myéloïde, les STAT3 et STAT5

régulent en outre, des gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire par exemple.

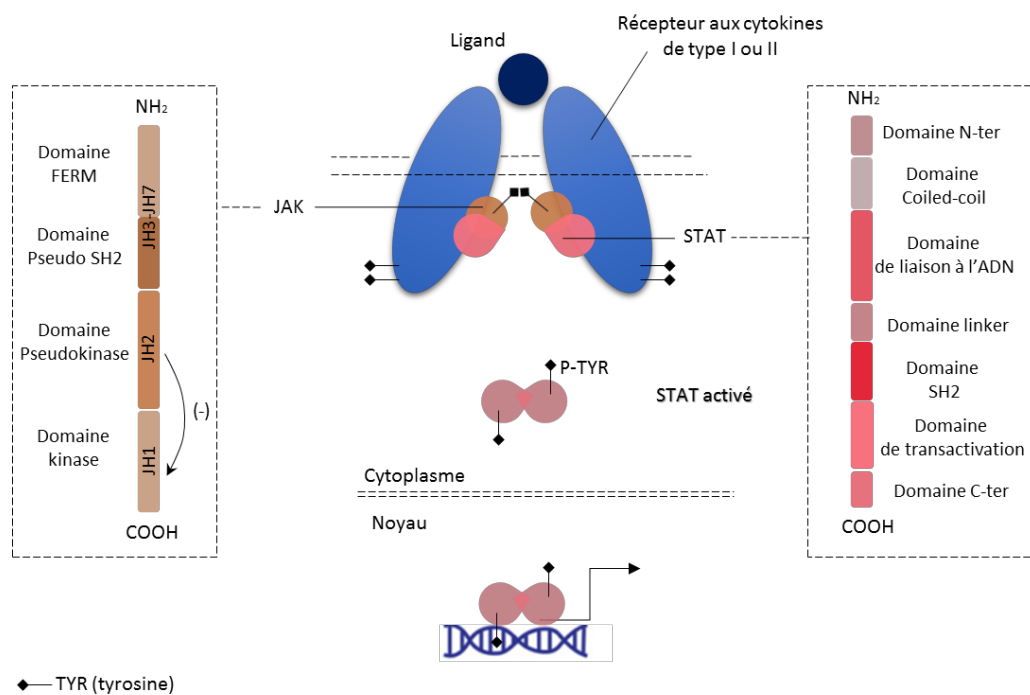


Figure 2 : Représentation schématique de la voie de signalisation JAK-STAT

La signalisation canonique JAK-STAT commence par l'association extracellulaire entre les cytokines et leurs récepteurs transmembranaires correspondants. L'oligomérisation des récepteurs induit la transactivation des JAKs qui, à leur tour, phosphorylent les queues cytoplasmiques des récepteurs pour créer les sites d'amarrage requis pour les STATs. Cela place les JAKs et les STATs dans une proximité spatiale permettant la phosphorylation de la tyrosine (p-Tyr) de ce dernier. La phosphorylation entraîne la dimérisation des STATs, leur translocation nucléaire, leur liaison à l'ADN et, en fin de compte, la modulation de la transcription des gènes. Ici sont représentés les différents domaines des JAKs et STATs. Inspiré de l'article de Villarimo *et al*, 2017

ii. Voies de transmission du signal JAK2 / STATs

JAK2 a été caractérisée en 1992 par l'équipe de A. Wilks [40]. Chez l'homme, le gène *JAK2* est localisé en position 24.1 du bras court du chromosome 9 et permet la traduction de 25 exons en une protéine de 130 kDa (soit 1132 acide aminés), elle-même composée de 4 grands domaines et de 7 domaines JH (*Janus homology*) comme les autres membres de sa famille (Figure 2).

Les rôles de JAK2 dans la signalisation cellulaire ont été décrits grâce aux études d'inactivation du gène ou *Knock Out* (KO). Le KO de *JAK2* n'est pas viable, il entraîne *in utero* une anémie et un défaut de différenciation érythroïde, entraînant la mort des embryons à 12,5 jours [41]. Les

études sur les KO conditionnels montrent l'implication de JAK2 dans l'érythropoïèse, la mégacaryopoïèse et la plus faiblement dans la granulopoïèse, ainsi que son rôle dans la maintenance des CSH [42]–[44]. Ensemble, ces études démontrent l'importance de JAK2 dans l'hématopoïèse.

JAK2 est fortement impliquée dans la signalisation myéloïde. De fait, JAK2 interagit avec les récepteurs myéloïdes tels que des récepteurs homodimériques de type I comme le récepteur à l'érythropoïétine (EPOR), le récepteur à la thrombopoïétine (TPOR), MPL ou bien le récepteur spécifique de la lignée granulocytaire le G-CSFR (*Granulocytes-colony stimulating factor receptor*), les récepteurs hétérodimériques tels que les récepteurs du GM-CSF (*Granulocytes-colony stimulating factor*) ou les récepteurs aux interleukines 3 et 5 (IL-3 ou IL-5) [35].

Tout d'abord, JAK2 joue un rôle de chaperon en permettant la stabilité et la montée du récepteur aux cytokines du réticulum endoplasmique (RE) vers la membrane cytoplasmique [45]. Une fois ancrée à la membrane, JAK2 toujours associée au récepteur va s'autophosphoryler sur les tyrosines Y1007 et Y1008 et transphosphoryler la partie intracytoplasmique du récepteur au niveau de ses résidus tyrosines conservés. Cette signalisation s'effectue généralement en réponse à la fixation d'une cytokine extramembranaire au récepteur. Ce mécanisme de cross-phosphorylation, va libérer un site de fixation pour les protéines de signalisation ayant un domaine SH2 tels que les protéines STATs ou des molécules de signalisation impliquées dans les voies des MAPK ou PI3K. En ce qui concerne les STATs, elles vont être à leur tour phosphorylées par JAK2 et former des hétéro ou homodimères afin de migrer dans le noyau pour se lier à des régions spécifiques de l'ADN et réguler la transcription de gènes cibles [35]. Plus particulièrement, via JAK2, l'EPOR active majoritairement STAT5, G-CSFR active STAT1 et 3 alors que le récepteur MPL active STAT1, 3 et 5.

La stabilité de JAK2 est consolidée par l'intervention des chaperons tels que les protéines de choc thermique ou HSPs (*heat shock proteins*). Plus particulièrement HSP90 a été identifiée comme un chaperon de JAK2 [46]. L'utilisation d'inhibiteurs de HSP90 permet de bloquer la réponse aux cytokines et d'induire la dégradation de JAK2 par le système du protéasome. De plus, une étude récente a mis l'accent sur l'importance des co-chaperons dans la stabilité de l'interaction entre le complexe JAK2-STAT3 et HSP90. En effet, il semblerait que le co-chaperon

de HSP90 et HSP70, STIP1 soit nécessaire à la stabilité de JAK2 et plus globalement au complexe JAK2/STAT3/HSP90. En revanche, son rôle dans la signalisation de STAT5 semble mineur [47].

Physiologiquement, la transmission du signal en réponse aux cytokines est transitoire et est finement régulée. De façon générale, l'arrêt du signal est dû (1) au recrutement de phosphatases sur le récepteur aux cytokines, (2) au recrutement de régulateurs négatifs induit par les cytokines elles-mêmes tels que les suppresseurs de cytokines ou SOCS (*Suppressors of cytokine signaling*), (3) l'interaction d'inhibiteurs de la famille des PIAS (*Protein inhibitors of STATs*) avec les protéines STATs et (4) à l'internalisation et la dégradation du récepteur par le système du lysosome et du protéasome (**Figure 3**) [35].

Les protéines qui contrôlent négativement la voie JAK2 à différentes étapes de la signalisation ont en commun la présence d'un domaine protéique SH2.

- Les phosphatases SHP1 (PTPN6) et SHP2 (PTPN11). SHP1 va se lier par son domaine SH2 aux récepteurs membranaires activés tel que l'EPOR ou cKIT et va atténuer l'activation de JAK2 en induisant sa déphosphorylation [48]. SHP2 va quant à elle agir sur STAT5 en permettant également sa déphosphorylation[49][50].
- Les protéines SOCS qui sont protéines clés de la signalisation aux cytokines et plus particulièrement SOCS1 et SOCS3 vont réguler négativement la signalisation JAK2 en entrant en compétition avec les STATs [51].
- La protéine adaptatrice LNK qui par l'intermédiaire de son domaine SH2 va atténuer l'activation de JAK2 et par conséquent la signalisation à l'EPO et au MPL [52][53].

D'autres protéines ont aussi un rôle sur l'inhibition de la signalisation mais ne possèdent pas de domaine SH2 tels que :

- Les PIAS qui régulent négativement la voie JAK-STAT par inhibition directe de la liaison des STATs à l'ADN, *via* le recrutement de molécules réprimant la transcription, comme les HDAC (*Histone désacétylases*), et la sumoylation des STATs [51].
- la E3-ligase CBL (*Casitas B-lineage lymphoma*) qui par ubiquitination de JAK2 et du récepteur associé, va entraîner leur dégradation par le système du protéasome et la voie des lysosomes [54].

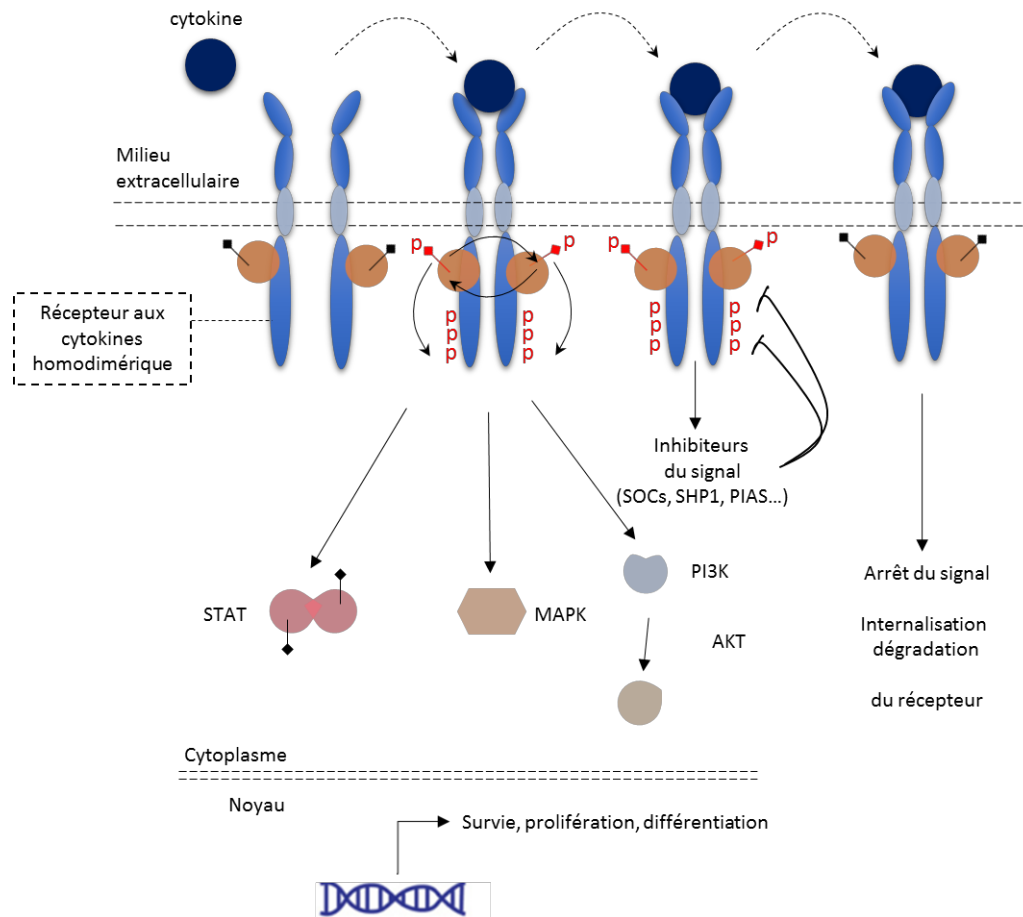


Figure 3 : Activation physiologique des récepteurs homodimériques aux cytokines via la voie JAK2

Les cytokines vont fixer leur récepteur homodimérique spécifique (EPOR ou TPOR), ce qui va entraîner un changement de conformation et permettre l'activation de JAK2. JAK2 va par un mécanisme de transphosphorylation, s'autophosphoryler et phosphoryler le récepteur. Il s'en suit l'amarrage des STATs au récepteur et leurs phosphorylations par JAK2. En parallèle des voies des STATs, JAK2 active également celle des MAPKs et de PI3K. Un mécanisme de rétrocontrôle va permettre l'inhibition du signal puis l'arrêt par l'internalisation et la dégradation du récepteur par le système du lysosome et du protéasome.

iii. La mutation JAK2V617F

En 2005, 4 équipes de recherche ont identifié dans les NMP classiques la mutation ponctuelle de la protéine JAK2 [26], [27], [55], [56]. La mutation JAK2 représente 95% des PV, 50% des TE et 60% des MFP [13].

Il s'agit d'une mutation acquise d'un nucléotide guanine en thymine au niveau de l'exon 14 de JAK2. Cette mutation a pour conséquence la substitution du résidu valine en phénylalanine du codon 617 (*JAK2V617F*) localisé dans le domaine JH2 (**Figure 4**). La mutation entraîne une rigidification de l'hélice alpha C du domaine JH2, favorisant la transphosphorylation de JH1 et l'activation constitutive de JAK2. Il en résulte une activation constitutive des signaux de

transduction de JAK2 en absence des cytokines et l'activation constitutive des voies de STAT3 et STAT5 [57]. La mutation V617F est une mutation gain de fonction. En effet la forme mutante de JAK2 acquiert en plus de sa pré-activation constitutive, de nouvelles propriétés dont la résistance à SOCS3 [58], l'association préférentielle à HSP90 [59] ainsi que la capacité à diminuer l'expression du récepteur au MPL à la surface membranaire permettant ainsi au MK d'échapper à la sénescence régulée par la TPO [35].

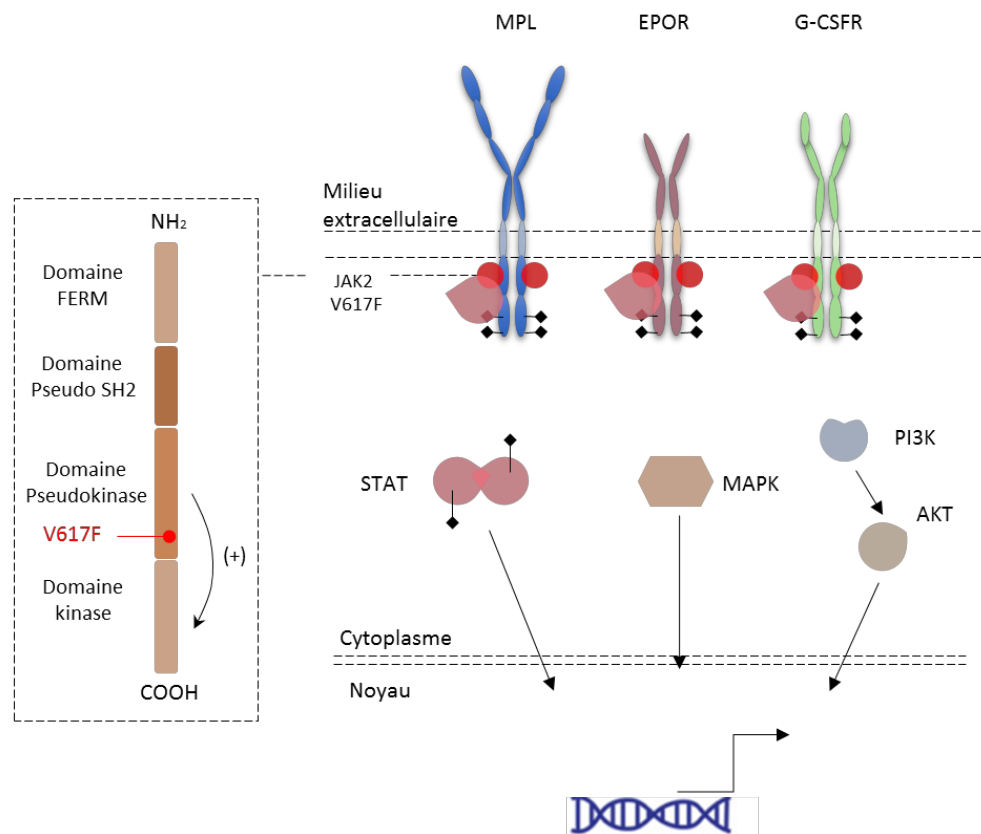


Figure 4 : Rôle des récepteurs aux cytokines dans la signalisation JAK2V617F

JAK2V617F active la signalisation des récepteurs homodimériques EPOR et MPL et du récepteur de la famille de l'IL-6, le G-CSFR. La structure de JAK2V617F est représentée.

Inspiré de l'article de Vainchenker et Kralovics, 2016

b. Mutations du récepteur à la thrombopoïétine (MPL)

Suite à la découverte de la mutation V617F de JAK2, d'autres mutations ont été recherchées pour les patients *JAK2V617F* négatifs. La première mutation somatique de MPL, le récepteur à la TPO a été identifiée en 2006 [28].

MPL est un récepteur oncogénique génétiquement localisé en 1p34. La traduction de ses 12 exons permet la synthèse d'une protéine d'environ 70 kDa.

Physiologiquement, la stimulation par la TPO permet la régulation de la prolifération des CSH et la stimulation de la maturation des MK en plaquettes [60][61]. En retour, le taux circulant de TPO diminue, ce qui permet le rétrocontrôle de la production plaquettaire [62]. La stimulation par le TPO est dépendante de la protéine JAK2. En effet, il a été montré que JAK2 colocalise avec MPL dans le RE, permettant le transport de MPL à la membrane plasmique [63]. La TPO va se fixer à la partie extramembranaire de MPL et permettre la phosphorylation de molécules de signalisation tels que STAT3 et STAT5 [64].

La mutation *MPL* est retrouvée chez environ 10% des patients PMF [13]. Il existe différentes sortes de mutations dont les plus fréquentes sont localisées au niveau de l'exon 10 et plus particulièrement sur l'acide aminé tryptophane en position 515 (W515). Le W515 est localisé au sein d'un motif amphiphathique, à la frontière entre les domaines transmembranaires et cytosoliques du récepteur. Ce motif a été décrit comme étant crucial pour le maintien du récepteur dans une conformation inactive en absence de ligand [45]. On recense 4 substitutions différentes du résidu tryptophane (W515L, W515L, W515A, W515R), dont les principales retrouvées sont les mutations *MPLW515L* et *MPLW515R* [28]. Ces mutations entraînent l'indépendance du récepteur à régulation par la TPO et son activation constitutive [65]. Plus particulièrement, après le recrutement de JAK2 dans le RE, *MPLW515L* migre à la membrane cytoplasmique et active constitutivement les voies de signalisation JAK2 [65].

La voie TPO/MPL avait déjà été identifiée comme pouvant être un mécanisme moléculaire important dans la mise en place de la MF. En effet, des études *in vivo* avaient déjà apprécié les effets d'une production persistante de TPO par les cellules de la moelle osseuse. L'exposition à de fortes doses induisait chez les animaux une NMP ayant de fortes similitudes avec la MF idiopathique observée chez l'homme [66].

c. Mutations de la calréticuline (*CALR*)

La CALR est une protéine chaperon de 46kDa qui réside dans le lumen du RE. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires incluant la régulation de l'homéostasie calcique et le

repliement de glycoprotéines émergentes [67]. Elle est localisée en 19p13.2 et code pour 9 exons.

Structurellement, elle possède plusieurs domaines remarquables dont une séquence de signal clivable en amino-terminal riche en prolines, un domaine de liaison au calcium chargé négativement et une séquence KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) de rétention dans le RE en carboxy-terminal [67].

Il a été recensé en 2013 par deux équipes, plus d'une cinquantaine de mutations concernant le gène de la *CALR* [29], [30]. Elles sont toutes localisées au sein de l'exon 9 et induisent une modification du cadre de lecture. Elles ont pour conséquence la modification du domaine C-terminal entraînant la perte de la séquence KDEL. Les deux principales mutations correspondent à la délétion 52pb (del52) aussi appelé de mutation de type 1 et à l'insertion 5pb (ins5) de type 2 [29][30]. Alors que la mutation de type 2 est majoritairement associée au phénotype de TE, le type 1 est quant à lui généralement associé à un phénotype de myélofibrose [45] .

Des travaux *in vivo* et *in vitro* ont étudié les mécanismes d'action des mutants *CALR*. Plus particulièrement, les souris exprimant le mutant *CALRdel52* développent une thrombocytose en réponse à une hyperplasie mégacaryocytaire et évoluent en une MF similaire à ce qui est observée chez l'homme [68]. D'un point de vue mécanistique, les mutants *CALR* activent le récepteur à la thrombopoïétine MPL dans le RE *via* sa partie extracellulaire et induisent la dimérisation et l'activation constitutive de JAK2 ainsi que les voies de signalisation en aval telles que les voies des STAT 1/3/5, de PI3K et de MAPK [68], [69]. De plus, des études ont montré que les mutants *CALR* sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et peuvent induire la sécrétion de cytokines par les monocytes [70] et activer faiblement le récepteur G-CSFR [8]. Les conséquences de cette activation dans la MF sont encore inconnues.

Les patients *CALR* positifs sont généralement plus jeunes et ont un risque moins élevé de décès comparativement aux patients mutés *JAK2* ou *MPL*, malgré un taux plaquettaire plus élevé [31].

En résumé les mutations « drivers » *JAK2*, *MPL* et *CALR*, activent des voies de signalisation communes (cytokines/récepteur/JAK2) (**Figure 4 et 5**), ce qui pourrait expliquer pourquoi ces différentes mutations sont généralement exclusives chez le patient. En effet, il est rare de

détecter deux mutations « drivers » chez le même patient mais lorsque c'est le cas, elles sont généralement présentes dans des clones ou sous clones différents.

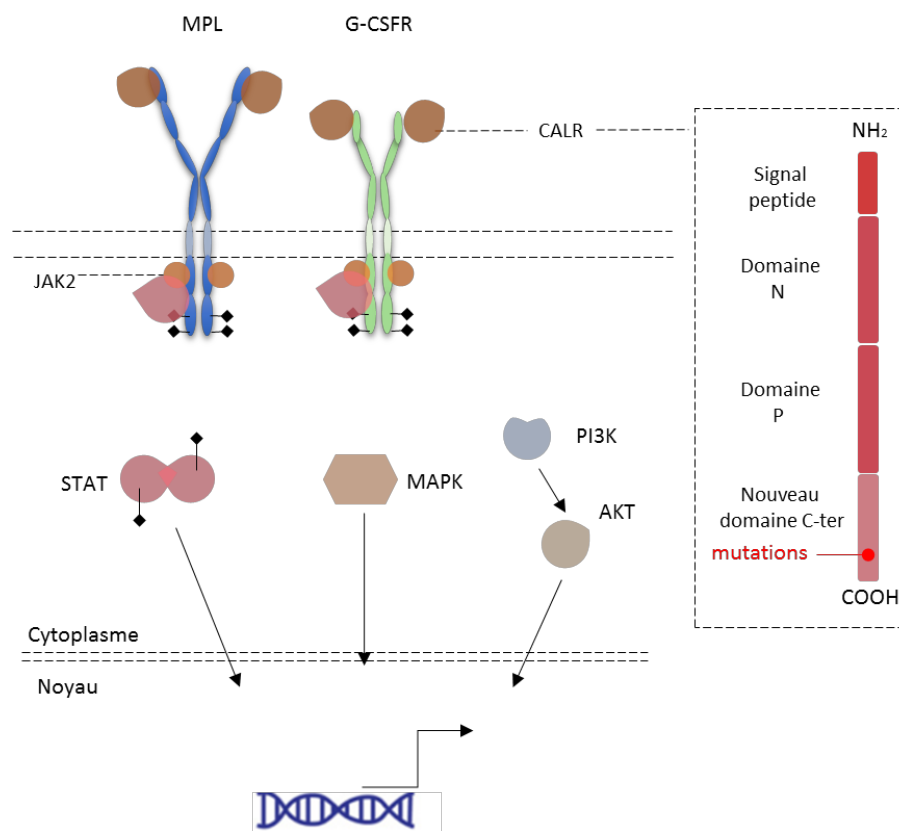


Figure 5 : Rôle des récepteurs aux cytokines dans la signalisation CALR

Les mutations *CALR* activent en leur partie extracellulaire le récepteur MPL et faiblement le récepteur G-CSFR. Ils induisent la dimérisation et l'activation constitutive de JAK2 ainsi que les voies de signalisation en aval telles que les voies des STAT 1/3/5, de PI3-K et des MAPKs. La structure de la calréticuline et la localisation des mutations sont représentées.

Adaptée de l'article de Vainchenker et Kralovics, 2016

d. Autres mutations associées à la MF

Mis à part les mutations « drivers », il est important de noter que d'autres mutations somatiques ont été identifiées comme pouvant jouer un rôle dans la biogenèse de la MF et de façon intéressante, influencer sur la survie des patients [71]. Ces mutations impliquent des protéines participant à la méthylation de l'ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), à des modificateurs d'histones (*ASXL1*, *EZH2*), des facteurs de transcription (*TP53*), des protéines impliquées dans les voies de signalisation (*LNK*, *CBL*) et des facteurs d'épissage (*SF3B1* et *SRSF2*) (**Tableau 4**). Ces mutations peuvent être retrouvées en association avec les mutations « drivers » et ne sont pas restreintes aux NMP (sauf pour LNK) car on les retrouve dans les syndromes myélodysplasiques

et les LAM. Contrairement à la majorité des patients PV et TE, les patients MF présentent généralement plusieurs mutations somatiques (3 mutations ou plus) [8]. Il se pourrait que ces mutations précèdent les mutations drivers et qu'elles jouent un rôle dans l'initiation et la progression de la pathologie.

Mutations somatiques	Localisation chromosomique	Fonctions	Fréquence & type de mutations
Voies de signalisations			
CBL (<i>casitas B-lineage lymphoma proto-oncogenes</i>)	11q23.3	E3 ubiquitine ligase permettant l'internalisation du récepteur aux cytokines	~6% Exons 8/9
LNK (<i>Links</i>)	12q24.12	Protéine adaptatrice et régulateur négatif de JAK2	Rare Mutation mono-allélique de l'exon 2
Méthylation de l'ADN			
DNMT3A (<i>DNA cytosine methyltransferase 3a</i>)	2p23	Méthylation de l'ADN	~7% R882
IDH1/IDH2 (<i>Isocitrate déshydrogénase</i>)	2q33.3/15q26.1	cofacteurs interviennent dans la synthèse des nucléotides et des acides gras	~4% 4 mutations
TET2 (<i>TET oncogene family number 2</i>)	4q24	Favorise la déméthylation de l'ADN	~17% Mutations qui impliquent plusieurs exons
Modifications des histones			
ASXL1 (<i>Additional Sex Comds-Like 1</i>)	20q11.1	Hématopoïèse normale et co activation de facteurs de transcriptions ou de régressions	~13% 12 mutations
EZH2 (<i>enhancer of zeste homolog2</i>)	7q36.1	Méthylation des histones	~7% Mutations qui impliquent plusieurs exons
Facteurs de transcriptions			
TP53 (<i>Tumor protein p53</i>)	17p13.1	Régule le cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN	~4% Exons 4à9
Epissage de l'ARN			
SF3B1 (<i>Splicing factor 3B subunit 1</i>)	2q33.1	Protéine du complexe du splicéosome	~7% Exons 14 et 15 (+ fréquemment)
SRSF2 (<i>serine/arginine-rich splicing factor 2</i>)	17q25.1	Protéine du complexe du splicéosome	~7% Exon 2

Tableau 4 : Autres mutations somatiques dans la MF

D'après de l'article de Tefferi, 2013 et de l'article de Vainchenker et Kralovics, 2016

I.2.2. Pathogénèse de la myélofibrose

L'activation pathologique des voies de signalisation JAK/STAT en réponse aux mutations drivers (*JAK2/MPL/CALR*) au sein des CSH de la moelle osseuse, est généralement présentée comme initiateur de la MF [72]. Cette dérégulation aberrante est décrite comme pouvant induire une production anormale de cytokines pro-inflammatoires, conduisant à l'expansion pathologique de MK, ainsi qu'à une fibrose médullaire et une HEM dans la rate [73]. Toutefois, la présence dans la population générale de la mutation *JAK2V617F* sans pathologie associée, nous amène à réfléchir aux événements additionnels, nécessaires à l'établissement du syndrome [74]. Récemment, les mécanismes à l'origine de la MF ont été rediscutés et il semblerait que le microenvironnement médullaire ainsi que l'inflammation chronique et les autres mutations somatiques jouent un rôle clé dans les premières étapes de la pathogénèse [8], [75], [76].

De façon générale, la physiopathologie de la MF comprend deux processus qui sont : 1) une myéloprolifération et 2) une réaction stromale associant l'apparition d'une fibrose médullaire, une néo-angiogenèse pathologique et une ostéosclérose [77] [78].

a. La niche médullaire contribue à la pathogénèse

Physiologiquement, les CSH ont une capacité d'autorenouveau et sont amenées à s'engager pour se différencier en cellules sanguines. Elles résident dans le microenvironnement médullaire et sont régulées par les niches hématopoïétiques [79]. La moelle osseuse est constituée de différentes niches responsables du maintien et de la régulation de l'ensemble des CSH [80].

Deux niches ont été particulièrement décrites; la niche vasculaire (zone entourant directement les vaisseaux sanguins et en contact avec les cellules endothéliales) et la niche endostéale (zone entourant directement l'os et en contact avec les ostéoblastes) [81]. La niche vasculaire régule la prolifération, la différenciation et la mobilisation des CSH alors que la niche endostéale garde les CSH en quiescence notamment grâce aux facteurs produits par les ostéoblastes [82]. Les niches sont composées de cellules stromales et d'une matrice extracellulaire (MEC) qui permet aux CSH d'interagir avec les autres cellules de la niche *via* des récepteurs cellulaires de surface, des jonctions gaps et des facteurs solubles (chémokines et cytokines par exemple). La niche vasculaire en association avec différents éléments du stroma et de la MEC vont permettre la

différenciation et la mobilisation des cellules myéloïdes différenciées pour rejoindre la circulation périphérique [82] (**Figure 6**). Un déséquilibre entre les deux niches a été suggéré comme pouvant être la cause de NMP [81]. En effet, chaque niche possède un microenvironnement qui lui est propre et qui leur permet d'assurer le maintien de l'homéostasie hématopoïétique comme par exemple la quiescence ou la prolifération des CSH. Une altération de la balance va ainsi conduire à la prolifération incontrôlée des cellules et à l'émergence de néoplasies.

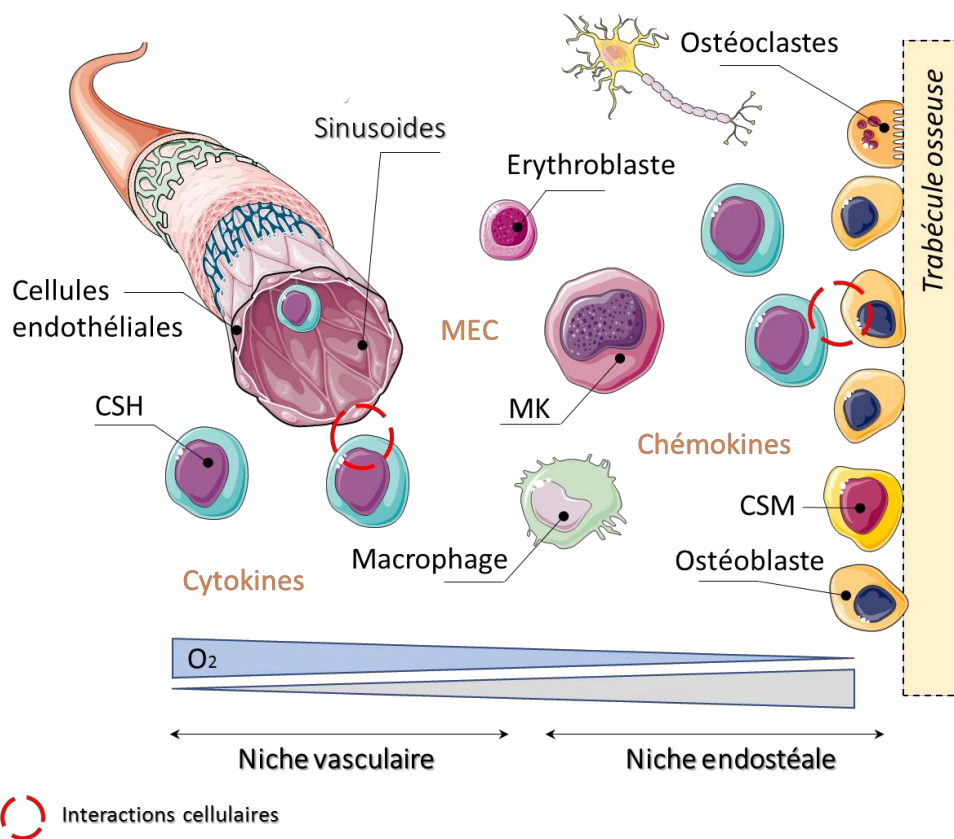


Figure 6 : Schématique représentation de l'environnement médullaire

Chez l'homme, l'hématopoïèse normale se produit dans la moelle osseuse où les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont en constantes interactions avec différentes niches. De façon très conceptuelle, les CSH sont scindées en deux niches. La niche endostéale composée d'ostéoblastes dérivés des cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui se différencient et contribuent à la formation des os et les ostéoclastes dérivés des cellules CSH qui participent à la résorption osseuse. La niche vasculaire est composée de cellules endothéliales résultent de la prolifération et la différenciation de cellules souches endothéliales et sont en étroites collaboration avec les CSH. La matrice extracellulaire (MEC) permet le contact cellules-cellules et est composée de cytokines, de chémokines, de calcium et d'O₂ lesquels sont essentiels à l'environnement des deux niches.

Inspiré de l'article de Le Bousse-Kerdilès et col, 2012

i. Les mégacaryocytes

De nombreuses études suggèrent que les mutations génétiques qu'acquière les CSH dans les premières étapes de la pathogenèse, et plus particulièrement les mutations dites « drivers », vont leur conférer un phénotype prolifératif [8] et participer à l'hypersensibilité aux facteurs de croissance [72]. Les CSH régulent et influencent le devenir de nombreuses cellules présentes au sein du microenvironnement médullaire [76] et plus particulièrement les MK qui occupent une place centrale dans la pathogenèse de la MF.

Physiologiquement, les MK matures dérivent de CSH multipotentes et sont produits par des étapes complexes de maturation et d'endomitoses (réplication de l'ADN sans processus de division cellulaire). Schématiquement, les CSH sont regroupées en deux catégories comprenant les CSH n'exprimant pas le cluster de différenciation CD34 (CD133+, CD34- CD38-) et les cellules CSH exprimant le CD34 (CD133+, CD34+ CD38-). Elles sont respectivement nommées LT-CSH (*Long Term*) et ST-CSH (*Short Term*). Au cours de processus de différenciation, les cellules ST-CSH vont produire des cellules progénitrices dont la capacité d'autorenouveau et de pluripotence va être perdue. De façon intéressante, la lignée mégacaryocytaire va partager avec la lignée érythroïde, un progéniteur bipotent mégacaryocytaire-érythroblastique ou MEP (*Megakaryocytes-erythroid progenitor*). Le MEP va s'engager sous l'influence des facteurs de transcription tels que GATA-1 et NF-E2, en un progéniteur différencié spécifique de la lignée mégacaryocytaire encore appelé CFU-MK (colony forming unit-megakaryocyte). Ce progéniteur étant capable de proliférer et de subir des endomitoses, il va aboutir à une cellule alors appelée mégacaryoblaste qui va rapidement terminer sa différenciation en un mégacaryocyte mature [83]. Les MK étant des précurseurs médullaires, une de leurs principales fonctions est la production des plaquettes sanguines [84] (**Figure 7**).

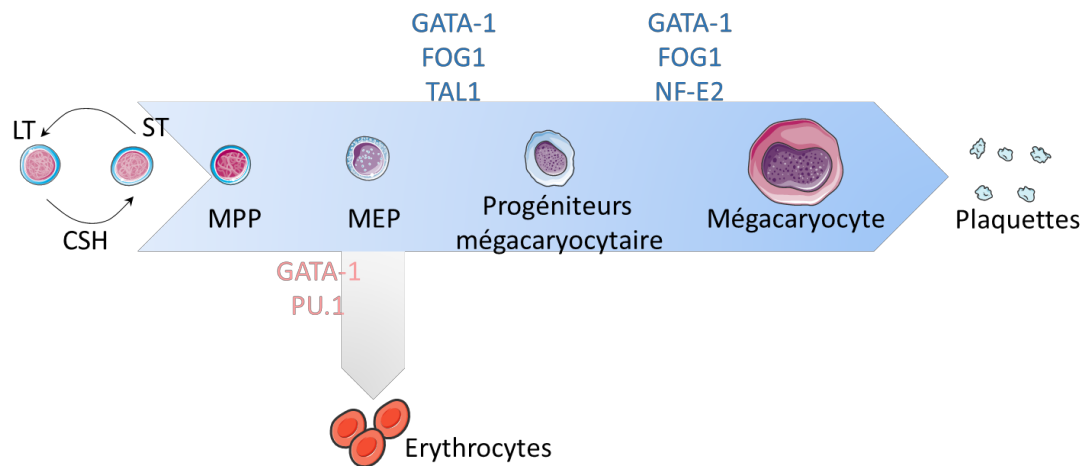


Figure 7 : Hématopoïèse et engagement mégacaryocytaire

La cellule souche hématopoïétique (CSH) se différencie en mégacaryocyte en passant par plusieurs stades de multipotence. Quelques facteurs de transcriptions qui orientent cette différenciation sont indiqués en bleu pour la mégacaryopoïèse et en rouge pour l'érythropoïèse. MPP pour MultiPotent Progenitor; MEP pour Megakaryocyte- Erythrocyte Progenitor.

La culture *in vitro* de cellules CD34+ issues de patients MFP a permis de montrer que les MK issus du clone prolifèrent rapidement tout en ayant un phénotype immature et une capacité moindre à entrer en apoptose du fait de la surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-xL [85].

Classiquement, une hyperplasie mégacaryocytaire est observée dans la moelle osseuse des patients MF. Les MK issus de la CSH maligne, vont anormalement proliférer et acquérir une structure singulière (localisation anormale de la protéine sélectine-P par exemple) qui va augmenter la capacité du MK à échapper à l'apoptose et à subir les phénomènes d'empéripolèse (traversée d'une cellule par une autre, sans qu'aucune ne soit altérée) [86]. De façon intéressante, les neutrophiles du microenvironnement vont participer au mécanisme d'empéripolèse en traversant les MK, ce qui aura pour conséquence, le relargage de cytokines pro-inflammatoires *via* la sécrétion de granules alpha [87].

Les cytokines produites par les MK telles que le TGF- β (*transforming growth factor*), le PDGF (*platelets derived growth factor*) et le FGF basique (*fibroblast growth factor*) vont stimuler les cellules du microenvironnement comme les fibroblastes et les cellules endothéliales (**Figure 8**), ce qui aura pour conséquence une fibrose et une néo-angiogenèse médullaire.

ii. La fibrose médullaire

La fibrose de la moelle osseuse joue un rôle central dans la MF [88]. Elle est caractérisée par un dépôt anormal et excessif de fibres de réticuline et parfois de fibres de collagène incluant le collagène de type I, III, IV et V de mauvais pronostic pour les patients [9],[69]. Plusieurs études associent le degré de sévérité de la pathologie avec le degré de fibrose collagénique. Cette corrélation n'a pour l'instant pas été observée pour la fibrose réticulinique [89]–[91]. Dans les stades avancés de la pathologie, on observe une augmentation un dépôt dans la MEC de laminine et des glycoprotéines (vitronectines, fibronectines et tenascine)[73].

Plusieurs types cellulaires ont été identifiés comme participant largement à l'établissement de la fibrose médullaire et plus particulièrement les cellules de la lignée mégacaryocytaire de par une production accrue de facteurs de croissance et de cytokines [92]. Cette production excessive conduit à la prolifération de fibroblastes (cellules dérivées de souches mésenchymateuses) et à l'établissement d'une fibrose médullaire.

Historiquement, le PGDF a été le premier facteur de croissance reconnu pour son implication dans la croissance et la prolifération des fibroblastes dans la MF [93]. En revanche, son activité semble limitée en ce qui concerne la production des fibres de collagène et de fibronectine [88].

Contrairement au PGDF, d'autres cytokines sont connues pour être impliquées dans le dépôt anormal de protéines au sein de la MEC comme le TGF- β qui occupe une place centrale dans la pathogénèse. Plus particulièrement, les MK et les monocytes dérivés des cellules souches malignes secrètent de façon excessive du TGF- β .

Le TGF- β a pour effet la production anormale de fibres de collagènes de types I, III et IV par les fibroblastes [72], [94], l'expansion autocrine des pro-plaquettes par les MK [95] et l'augmentation de l'expression de protéases qui inhibent la dégradation enzymatique de la MEC [96]. Outre les fibroblastes, les MK secrètent différents types de collagène comme le collagène de type I qui crée un environnement favorable à la différenciation des CSH vers la lignée mégacaryocytaire [82].

iii. La néo-angiogenèse

La néo-angiogenèse ou la formation de nouveaux vaisseaux, est un processus physiologique finement régulé par des médiateurs clés tels que le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et le FGF (*fibroblast growth factor*). Le VEGF apparaît pour être le facteur angiogénique le plus sélectif en agissant directement sur les cellules endothéliales [97]. D'autres facteurs sont connus pour leurs effets indirects sur l'angiogenèse tels que le TGF- β ou PDGF par exemple [98], [99].

Dans la MF, les MK et les plaquettes produisent des granules de type alpha contenant des facteurs angiogéniques comme le VEGF ou ANG1 (*angiopoietin 1*), qui sont directement impliqués dans le processus de néoangiogenèse. Chez les patients PMF, il a été observé une forte expression du VEGF et de ses récepteurs membranaires [77] ainsi que l'augmentation de la densité des microvaisseaux médullaires (DMV) [100]. De façon intéressante, la DMV semble être corrélée à la présence de la mutation *JAK2V617F*, ainsi qu'au grade de fibrose stromale [97] indiquant que la néoangiogenèse serait probablement un phénomène précoce de la physiopathologie, responsable en partie du développement de la fibrose [99], [101].

iv. L'ostéosclérose

L'ostéosclérose est quant à elle définie par une croissance osseuse pathologique au sein de la cavité médullaire.

Physiologiquement, l'homéostasie osseuse est contrôlée en grande majorité par ostéoprotégérine (OPG), une protéine leurre du ligand RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappaB ligand*) produit par les ostéoblastes et ayant une action sur la différenciation des ostéoclastes à partir des monocytes [102]. Le métabolisme osseux résulte en un équilibre entre la construction osseuse menée par les ostéoblastes d'origine mésenchymateuses et la destruction menée par les ostéoclastes d'origine hématopoïétiques.

Dans le contexte pathologique de la MF, les cellules endothéliales participent activement à l'ostéosclérose en produisant de l'OPG. Elles induisent la prolifération des ostéoblastes et inhibent la formation des ostéoclastes [102]. Les cellules hématopoïétiques sont aussi impliquées dans l'ostéosclérose tels que les MK qui produisent de l'OPG [103] et du TGF- β ,

augmentant ainsi la différenciation des ostéoblastes dans la moelle osseuse et l'aplasie des ostéoclastes.

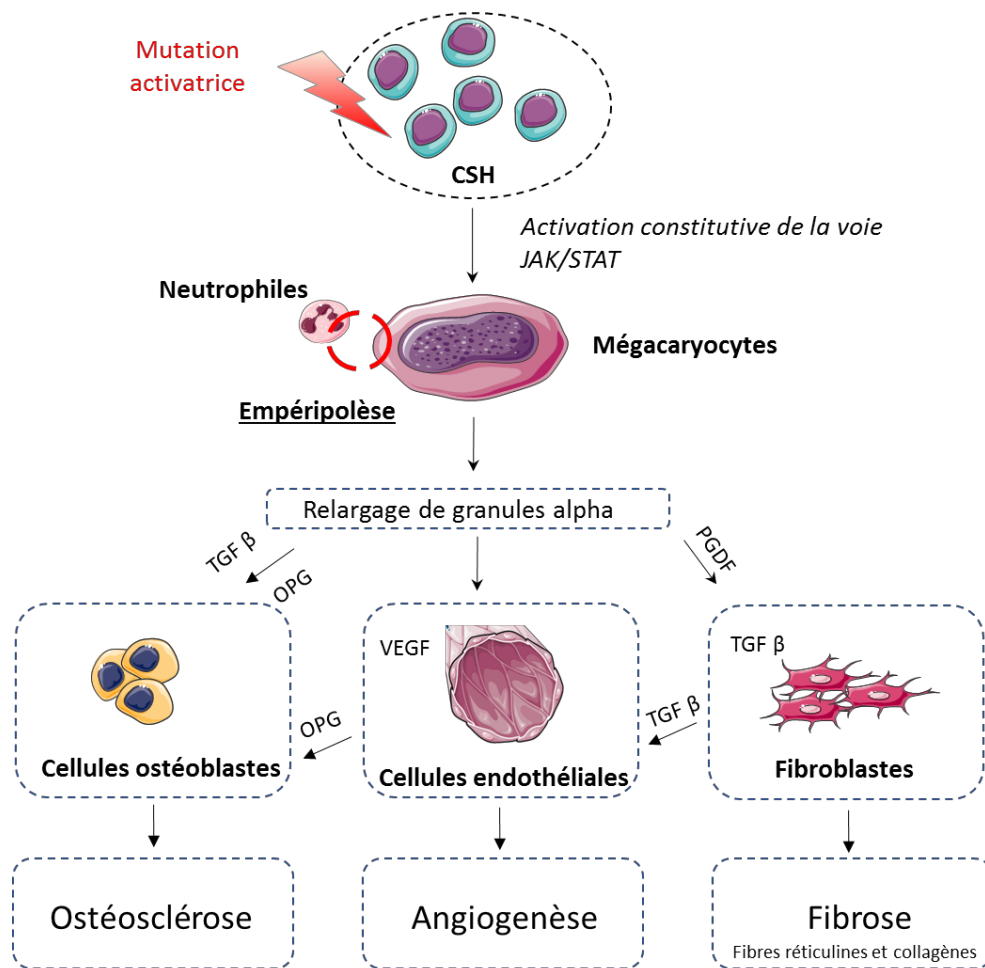


Figure 8 : Pathogénèse de la myélofibrose

L'activation constitutive de la signalisation JAK/STAT dans les CSH va conduire à une indépendance MK à la régulation par les cytokines. Les MK anormaux vont renforcer leur capacité à subir des phénomènes d'empériplèse avec les neutrophiles, ce qui va induire la libération de cytokines à travers la production de granules alpha. Ces granules vont induire une ostéosclérose, une angiogenèse pathologique et une fibrose médullaire.

Inspiré de l'article d'Agarwal et col, 2016

b. L'hématopoïèse extramédullaire

Cliniquement, la MFP est caractérisée par une mobilisation constitutive de CSH CD34⁺ et de cellules progénitrices endothéliales (CPE) (CD34,CD133) dans le sang périphérique [72], [104]–[106]. Les CPE semblent prédominer durant la phase préfibrotique alors que les CSH semblent caractériser les phases plus avancées de la pathologie [104].

Cette dérégulation de la maintenance des cellules souches médullaires va conduire à l'établissement de foyers de cellules endothéliales et hématopoïétiques au sein de différents organes tel que le foie ou la rate et à l'instauration d'une HEM. En association avec cette colonisation extramédullaire, une aplasie médullaire est observée chez les patients MF, ce qui suggère le déplacement de l'hématopoïèse de la moelle vers des sites hématopoïétiques normalement restreints à la vie embryonnaire [107]. Les CSH vont ainsi coloniser les niches vasculaires nouvellement créées ou "réinitialisées", ce qui va favoriser ainsi leur « *homing* », leur prolifération et leur différenciation dans les foyers extramédullaires [81].

Récemment, des études ont permis d'identifier la chémokine CXCL12 (*C-X-C motif chemokine 12*) également appelée SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) et son récepteur CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) comme les acteurs déterminant de la migration, du homing, de la rétention et de la prolifération des CSH et des cellules progénitrices au sein des foyers extramédullaires [108]–[110]. De façon intéressante, le microenvironnement splénique est caractérisé par une augmentation du taux de la chémokine CXCL12, ce qui contribue à la mobilisation des cellules CD34+ de la moelle vers la rate [111]. *A contrario*, le récepteur CXCR4 dont la fonction est de promouvoir la rétention des CSH dans la moelle, voit son expression diminuée, de par l'hyperméthylation de son promoteur dans les cellules souches de patients MFP [112]. Il semblerait que la signalisation JAK2 collabore avec la signalisation CXCR4 à travers la signalisation des STATs, de PI3K et de ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*), permettant ainsi la migration dépendante de CXCL12 [109]. En revanche, ces résultats semblent suggérer que JAK2 ne serait pas directement lié à la migration cellulaire mais augmenterait le chimiotactisme cellulaire de par l'augmentation de la voie CXCL12/CXCR4. Ces résultats permettraient en partie d'expliquer les effets bénéfiques des inhibiteurs de JAK2 sur la splénomégalie des patients [109].

c. L'inflammation chronique, l'œuf ou la poule

Depuis quelques années, l'implication de l'inflammation chronique dans la MF a été de plus en plus étudiée et sa place au sein de l'histoire naturelle de la maladie, très discutée [113]. Pour certains, les mutations « *drivers* » sont à la base de la pathogenèse, et ont pour conséquence la mise en place d'un contexte inflammatoire *a posteriori*. Cette hypothèse est largement soutenue par l'effet curatif de l'allogreffe de cellules souches chez les patients [114]. En effet,

l'éradication du clone malin a pour conséquence un retour à une hématopoïèse normale et une perte du contexte inflammatoire au cours du temps. *A contrario*, d'autres placent l'inflammation au premier plan et supposent que le contexte inflammatoire est un environnement favorable à l'apparition d'aberrations génétiques [115]. Cette thèse est soutenue par le passé médical de nombreux patients. En effet, il a été recensé des antécédents de maladies auto-immunes et d'infections rétrovirales chez patients, suggérant que les conditions inflammatoires développées au cours du temps aient pu prédisposer au développement d'une NMP [115][116].

Malgré les discordances quant à l'apparition du contexte inflammatoire, la MF comme les autres NMP est décrite pour être un « modèle humain de maladie inflammatoire » [116]. Elle est caractérisée par une moelle osseuse inflammatoire due à l'activation persistante de cellules immunitaires, de nombreux dommages à l'ADN et à une destruction tissulaire accompagnée d'un processus fibrotique [117].

Comme les autres pathologies inflammatoires, la MF est associée à une augmentation de l'activité de la voie de NF-Kappa-beta (NF- κ B) dans les cellules hématopoïétiques et les cellules du stroma médullaire, qui expose ces cellules à un stress oxydatif constant [117]. Cette augmentation va aussi induire la production de TNF-alpha (TNF- α ou *tumor necrosis factor alpha*) et de IL-6 qui va renforcer la voie de NF- κ B et de STAT3, ce qui va induire une inhibition de l'apoptose et une augmentation de la myéloprolifération [116]. Aussi, les leucocytes et les plaquettes activés vont renforcer le phénomène, en sécrétant continuellement des produits inflammatoires. Cliniquement, une étude a montré l'augmentation d'une trentaine de cytokines plasmatiques chez les patients MF tels que des nombreuses interleukines, du TNF- α , de l'interféron α et γ (IFN- α/γ) ainsi que des facteurs de croissances comme le G-CSF et le VEGF. Certaines étant indépendamment corrélées avec l'espérance de vie [118] et d'autres avec le développement d'une fibrose médullaire comme IL-8, le TGF- β 1, PDGF, FGF ou VEGF [77], [119].

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*) qui sont principalement produits par les neutrophiles, les macrophages et les monocytes, sont également surexprimés dans la MF et semble participer à la pathogenèse [77]. Un taux élevé de ROS a été détecté chez les patients MF [120] et de façon intéressante, les cellules clonales mutantes *JAK2V617F* produisent un excès de ROS *in vitro* [121]. Il semblerait que la cellule maligne facilite son

expansion clonale par l'induction d'un stress oxydant continue. En effet, les cellules saines étant sensibles à l'excès de ROS vont mourir par apoptose facilitant ainsi l'extension clonale [122]. De plus, il semblerait que ces dérivés soient impliqués à la fois dans la carcinogénèse, puisqu'ils facilitent l'émergence de mutations et à l'entretien de l'inflammation.

Aujourd'hui, la place de l'inflammation n'est pas encore claire quant à son déroulement dans la pathogénèse, en revanche, toutes les études s'accordent pour dire que les cellules inflammatoires et les médiateurs de l'inflammation sont des constituants importants de la maladie et participent à son évolution [123].

I.3. Les modèles murins de MF primitives et secondaires

Concernant la MF primitive ou secondaire à une NMP, il existe à l'heure actuelle un grand nombre de modèles murins permettant l'étude et la compréhension de la physiopathologie de la MF. Ils constituent aujourd'hui une excellente source d'outils précliniques et de recherche fondamentale.

Historiquement, les premiers modèles murins de MF ont été les modèles de surexpression de la thrombopoïétine (TPO^{high}) et les modèles de diminution de l'expression du facteur de transcription GATA-1 (GATA-1^{low}) [124]. Par la suite, d'autres modèles ont été développés dont le modèle de surexpression de la protéine mutante JAK2V617F, de la protéine MPL mutée [125] et plus récemment les modèles de surexpression de la CALR mutée [68].

Aussi, on retrouve dans la littérature d'autres modèles murins présentant un syndrome myéloprolifératif et une fibrose médullaire tels que les animaux surexprimant les gènes de fusion TEL/PDGFBêtaR [126], TEL/JAK2 [127] ou FLT3-ITD [128] et les souris transgéniques pour le facteur de transcription BACH1 [129].

Seuls les modèles murins faisant l'objet d'une utilisation au cours de mes travaux de thèse, ont été détaillés ci-dessous, à l'exception du modèle CALR qui a fait l'objet de récentes publications.

I.3.1. Les modèles TPO^{High}

La TPO est une cytokine soluble produite par le foie et les reins, contrôlant la croissance, le développement et le renouvellement des MK, ainsi que l'homéostasie plaquettaire [130]. La

mise en évidence d'un lien entre les fortes doses de TPO et le développement d'une MF a été observée de façon fortuite lors d'une étude sur la restauration de la déficience plaquettaire par injection prolongée de TPO chez la souris [109].

a. Généralités

A l'heure actuelle, il existe différentes approches permettant de générer des modèles murins de MF associés à de fortes doses de thrombopoïétine (TPO^{high}).

On recensera un grand nombre de modèles murins qui se différencient par leur fond génétique et les différentes techniques mises en œuvre pour surexprimer la TPO. Classiquement, trois grandes techniques se distinguent ; 1) l'administration systémique de TPO par l'utilisation de protéines recombinantes humaine ou murine, 2) la transplantation de CSH infectées de manière rétroviral chez des animaux irradiés ou l'utilisation d'adénoviraux et 3) l'utilisation de souris transgéniques exprimant le gène murin ou humain de la TPO.

Tous ces modèles développent une fibrose médullaire et sont parfois associés à une ostéosclérose. Leur étude a permis de mieux comprendre la physiopathologie de la MF et de mettre en évidence le lien entre le TGF- β et la fibrose médullaire par exemple [131].

b. Les modèles TPO^{high} par infection rétrovirale

Le modèle d'infection rétrovirale est un modèle d'induction prolongée de fortes doses de TPO. Il a été historiquement développé par deux équipes dans les années 90 et consiste à cloner par infection rétrovirale l'ADNc de la TPO murine dans les cellules hématopoïétiques de souris à partir d'un vecteur rétroviral [66], [132]. Les cellules sont ensuite transplantées chez les animaux létalement irradiés afin de reconstituer une hématopoïèse à long terme. Ces deux modèles ayant à la base une stratégie commune, se différencient entre autre, par des dissimilitudes au niveau de l'évolution de la numération sanguine, de la mortalité observée au court de l'étude et du taux de TPO plasmatiques.

Le modèle murin TPO^{high} réalisé par JL. Villeval et ses collaborateurs est un modèle de MF sévère qui évolue en deux étapes et qui présente de fortes similitudes avec la MF observée chez l'homme contrairement au modèle développé par X.Q. Yan et ses collaborateurs. Dans le premier modèle, une thrombocytose est observée durant les deux premiers mois suivant la

greffe. Certains animaux possèdent une hyperleucocytose accompagnée d'une augmentation des progéniteurs circulants. Une hyperplasie mégacaryocytaire et granulocytaire est observée dans la moelle osseuse et dans la rate. Après cette myéloprolifération, une seconde phase apparaît et laisse place à l'installation d'une fibrose médullaire, une ostéosclérose et une HEM. Finalement après 7 mois d'évolution, la majorité des animaux évoluent vers une pancytopénie fatale (réduction du nombre de globules rouges et blancs, ainsi que du nombre de plaquettes) et quelques animaux semblent évoluer vers une transformation blastique.

La maladie obtenue par JL. Villeval et ses collaborateurs conduit au décès de la totalité des animaux dans les 9 mois suivant la transplantation alors que le modèle de X.Q. Yan et ses collaborateurs n'induit pas de mortalité à ce stade. Il semblerait que le taux plasmatique de TPO extrêmement élevé et constant tout au long de l'étude dans le modèle de JL. Villeval, *a contrario* du modèle de X.Q. Yan (où le taux de TPO chute après quelques semaines), puisse expliquer en partie les dissimilitudes observées.

Le modèle de JL. Villeval a permis de caractériser l'implication du TGF- β et de comprendre les mécanismes responsables de l'ostéosclérose [133]. Ces travaux ont permis notamment montrer que le TGF- β possède un rôle clé dans sa mise en place de la fibrose [96]. Ils ont aussi permis d'étudier l'efficacité d'inhibiteurs de JAK2 dans la MF associée à de fortes doses de TPO et de montrer que lorsque la fibrose est engagée, il ne semble pas possible de la reverser même avec l'utilisation d'inhibiteurs de JAK2 ayant des effets bénéfiques dans d'autres modèles de MF [134].

Ainsi il semblerait que le modèle TPO^{high} développé par Villeval permettrait d'étudier dans un temps relativement court, la mise en place des traits fibrotiques et la physiopathologie associée dans la MF, en revanche son utilisation reste discutable en ce qui concerne les études précliniques [131].

I.3.2. Les modèles JAK2V617F

JAK2 est un important élément de la signalisation TPO/MPL et il n'est donc pas surprenant que l'introduction d'une mutation sur JAK2 induise des phénotypes similaires aux souris TPO ou MPL [131]. L'introduction de la mutation *in vivo* a permis d'évaluer les conséquences

fonctionnelles de la mutation et les mécanismes fondamentaux sous-jacents de la physiopathogénèse des NMP et de la MF.

a. Généralités

Comme pour les modèles TPO, il existe 3 différentes techniques permettant d'introduire la mutation *JAK2V617F in vivo* (**Tableau 5**). On distingue les modèles; 1) de transplantation de cellules de moelle osseuse préalablement transduites par infection rétrovirale [135]–[138], 2) l'utilisation de souris transgéniques (expression de l'ADNc *JAK2V617F* murin ou humain au stade pronucléaire) [139]–[141] et 3) l'élaboration de modèle *Knock-In (KI)* exprimant la forme mutée *JAK2V617F*, restreinte au système hématopoïétique[142]–[145].

Contrairement aux souris TPO, tous ces modèles *JAK2V617F in vivo* ne développent pas forcément de MF et lorsqu'elle apparaît c'est secondairement au développement d'une TE ou une PV.

b. Les modèles transgéniques *JAK2V617F*

Faisant suite à l'élaboration de modèles murins par la méthode de transduction rétrovirale de cellules de la moelle osseuse, des modèles *in vivo* transgéniques ont été élaborés. Ils ont été conçus afin d'exprimer la protéine mutante *JAK2V617F* dans le compartiment hématopoïétique. Pour cela, une construction de chromosome artificielle de bactérie (BAC) contenant un ADNc *JAK2V617F* (humain ou murin), sous contrôle d'un promoteur tissu spécifique, a été injectée dans des ovocytes de souris durant l'embryogenèse.

Trois groupes ont utilisé cette méthode, ce qui a permis d'étudier et de caractériser le rôle de *JAK2V617F* au sein du compartiment hématopoïétique. Le modèle de Shide et ses collaborateurs [139], exprime une protéine *JAK2V617F* de souris sous le contrôle du promoteur *H-2Kb*. Deux lignées de souris ont été développées, une lignée exprimant faiblement le transgène et une lignée l'exprimant fortement. Ces travaux ont permis de montrer que les souris qui expriment faiblement *JAK2V617F*, développent un phénotype caractéristique de la TE alors qu'au contraire les souris qui expriment fortement le transgène ont un phénotype de PV se transformant progressivement en MF. Les deux lignées présentent une indépendance à la régulation par les cytokines et une augmentation de l'activation de STAT5. Ces résultats ont

été confirmés par les travaux de Xing et ses collaborateurs, montrant que l'utilisation d'un ADNc humain *JAK2V61F* sous contrôle du promoteur constitutif *Vav*, avait des phénotypes différents en fonction de l'expression du transgène.

Contrairement aux précédents travaux, Tiedt et ses collaborateurs ont utilisé une méthode d'activation constitutive ou conditionnelle du transgène (*JAK2V617F* humain) dans le système hématopoïétique par l'utilisation de la technique de Cre recombinase et de promoteurs spécifiques (*Vav* [146] et *Mx* [147]). Le modèle *MxCre* utilise la Cre-recombinase, inductible par injection péritonéale de polyinosine-polycytosine (pIpC). L'enzyme étant sous le contrôle du promoteur *Mx*, elle ne sera exprimée qu'à la suite d'une injection d'interféron chez l'animal. L'expression de la recombinase va ainsi permettre d'induire l'expression du transgène uniquement dans le système hématopoïétique à un temps voulu. *A contrario*, le modèle *VavCre* va permettre l'expression constitutive de la Cre-recombinase sous contrôle du promoteur *Vav* et par conséquent du transgène, à faible niveau, dans le système hématopoïétique spécifiquement et tout au long de la vie de l'animal.

Comme dans les précédentes études, les deux modèles se distinguent par leur phénotype respectif. Dans le modèle *MxCre*, les souris développent un phénotype comparable à une polyglobulie (augmentation de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine indépendamment de la régulation par l'EPO, taux élevé de cellules leucocytaires et de plaquettes) qui évolue vers une MF. À la différence du modèle *MxCre*, les souris présentent dans le modèle *VavCre* les caractéristiques d'une TE (thrombocytose accompagnée d'une légère augmentation des nombres de cellules leucocytaires) qui évoluent vers une MF.

Outre l'étude de la physiopathogénèse de la MF, ces différents modèles ont été utilisés dans des études précliniques pour évaluer *in vivo* l'efficacité des traitements proposés pour les NMP et plus particulièrement pour la MF.

Table 14.40.1 Summary of Mutant JAK2V617F MPN Models

Author	Mouse	V617F species	JAK2 promoter	Cre-promoter	Phenotype	LSK Frequency
<i>Transgenic models</i>						
Shide et al. (2008)	C57Bl/6/DBA/2	Mouse	<i>H-2Kb-</i>	n/a	Low exp: ET-like (to PV) High exp: PV-like (to MF)	n/a
Xing et al. (2008)	C57Bl/6/DBA/2	Human	<i>Vav-</i>	n/a	Low exp: mild PV-like High exp: PV-like (to MF)	n/a
Tiedt et al. (2008)	C57Bl/6	Human	Minimal human <i>Jak2-</i>	<i>Mx-</i> and <i>Vav-</i>	<i>Vav-</i> : ET-like (to MF) <i>Mx-</i> : PV-like (to MF)	n/a
<i>Knock-in models</i>						
Akada et al. (2010)	129Sv/C57Bl/6	Mouse	<i>Jak2-</i>	<i>Mx-</i>	PV-like (to MF)	Increased
Marty et al. (2010)	129Sv/C57Bl/6	Mouse	<i>Jak2-</i>	n/a	PV-like (to MF)	Increased
Mullally et al. (2010)	129Sv/C57Bl/6	Mouse	<i>Jak2-</i>	<i>E2a-</i>	PV-like ^a	Unchanged
Li et al. (2010)	129Sv/C57Bl/6	Human	<i>Jak2-</i>	<i>Mx-</i>	ET-like	Decreased
<i>Retroviral transduction models</i>						
Wernig et al. (2006)	BALB/c and C57Bl/6	Mouse	n/a	n/a	PV-like (to MF)	n/a
Lacout et al. (2006)	C57Bl/6	Mouse	n/a	n/a	PV-like (to MF)	n/a
Zaleskas et al. (2006)	BALB/c and C57Bl/6	Mouse	n/a	n/a	PV-like (to MF)	n/a
Bumm et al. (2006)	BALB/c	Mouse	n/a	n/a	PV-like (to MF)	n/a

^aMyelofibrosis did develop in transplant recipients.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents modèles murins JAK2V617F

D'après l'article d'Andrew Dunbar et col.

1.3.3. Les modèles CALR

En 2013, une cinquantaine de mutations au niveau du gène de la *CALR* ont été recensées chez les patients atteints de MF et de TE [29], [30]. Ainsi, plusieurs équipes ont choisi de développer des modèles murins de surexpression de mutants de la *CALR*, afin d'étudier les conséquences de ces mutations *in vivo*. Les mutations *CALRdel52* et *CALRins5* étant plus fréquemment retrouvée chez les patients MFP et TE, elles ont été privilégiées dans les études [68], [148], [149].

Contrairement aux précédents modèles, 2 différentes techniques ont été choisies afin d'étudier l'effet des mutations *in vivo*. Deux études ont privilégié la transplantation de CSH infectées de manière rétrovirale [68], [149] alors que d'autres ont utilisé des souris transgéniques, exprimant le mutant *CALRdel52* humain, sous la dépendance d'un promoteur *H-2kb* [148].

De façon intéressante, ces études semblent s'accorder sur le fait que l'introduction de la mutation *CALdel52*, plus fréquemment retrouvée chez les patients MFP, induit une pathologie murine semblable à la TE observée chez l'homme, contrairement à la mutation *CALRins5* où la pathologie est moins prononcée. Ainsi, les souris *CALRdel52* développent une thrombocytose associée à une hyperplasie mégacaryocytaire sans affecter les lignées érythrocytaire et granulaire. Paradoxalement, l'évolution de la pathologie vers des caractéristiques de MF n'a pas été constitutivement observée dans les différents modèles. De fait, le modèle de transduction rétrovirale obtenue par Elf et ses collaborateurs, comme le modèle de souris transgéniques *CALRdel52*, ne progresse pas vers des caractéristiques de MF alors que le modèle de transduction rétrovirale obtenu par Marty et ses collaborateurs évolue à partir du 6ème mois suivant la greffe vers un phénotype de MF similaire à la pathologie humaine. Ces discordances pourraient être en partie expliquées par les différences d'expression protéique au sein des modèles murins [148].

I.4. Les thérapies actuelles pour la MF

D'un point de vue thérapeutique, il n'existe à l'heure actuelle, aucun traitement curatif de type pharmacologique pour la MF. L'unique modalité thérapeutique qui permet de guérir une MF, consiste en l'allogreffe de CSH chez les patients [150]. En revanche, peu de patients sont éligibles à cette alternative médicale à cause de leur âge avancé, au fort risque de morbidité et au peu de donneurs compatibles. De plus, les patients sélectionnés pour la greffe ont un haut risque de complications post-transplantation et une survie estimée à 40-60% [151].

Afin de pouvoir offrir un espoir thérapeutique pour les autres patients, différentes options pharmacologiques ont pu être testées dans la MF notamment suite à la découverte de *JAK2V617F* en 2005. Avant JAK2, les traitements consistaient à contrôler les symptômes de la maladie par des agents pharmacologiques ou par des procédures chirurgicales comme la splénectomie par exemple. Elles ont eu pour effets de limiter les symptômes mais aucune thérapie ne ciblait directement le clone malin ni n'altérait véritablement le devenir de la pathologie.

En 2011 l'agence Américaine du médicament (FDA pour *US Food and Drug Administration*) a approuvé l'utilisation orale d'un inhibiteur de JAK1/2, le ruxolitinib (Jakafi®, Incyte Corporation).

Alors que le ruxolitinib a un effet significatif envers les symptômes de la MF, il semble incapable de reverser les anomalies histopathologiques de la moelle osseuse et la transformation des patients vers la LAM.

La demande de traitement étant très forte pour les patients, de multiples stratégies thérapeutiques ont été tentées et certaines ont pu franchir la barrière des essais cliniques.

I.4.1. Les inhibiteurs des kinases JAKs

a. Le Ruxolitinib

Le ruxolitinib ou INCB018424 a été identifié pour son potentiel à inhiber les protéines JAKs et plus particulièrement JAK1 et JAK2 [152]. Des études précliniques ont permis d'évaluer son activité dans la signalisation anormale JAK/STAT[153]. Ces travaux ont montré que de faibles concentrations en inhibiteur étaient capables d'inhiber la phosphorylation de STAT5 et ERK dans les lignées humaines *JAK2V617F* contrairement aux lignées leucémies *BCR-ABL* positives. Cette diminution de phosphorylation est accompagnée d'une diminution de prolifération cellulaire et de l'induction de l'apoptose. Les expériences *ex vivo* ont démontré l'efficacité de l'inhibiteur sur l'expansion des progéniteurs érythroïdes à partir de cellules de patients mutées pour *JAK2*. De plus, les études *in vivo* témoignent de l'impact du traitement sur la survie des animaux, la splénomégalie et sur les cytokines pro-inflammatoires anormalement augmentées par la maladie. En revanche, le traitement ne semble pas affecter les paramètres sanguins. Ces résultats ont été confirmés plus récemment dans les modèles murins transgéniques [154].

Le ruxolitinib a été adopté pour la FDA le 16 novembre 2011, pour le traitement des patients ayant un risque intermédiaire ou élevé de MF, suite à ses effets favorables observés lors des phases I/II et III (COMFORT I et II) des essais cliniques. Ces dernières (COMFORT I et II) comparaient l'efficacité du ruxolitinib avec un traitement placebo ou le meilleur traitement disponible respectivement [155] [156].

Cliniquement, le ruxolitinib présente des effets significatifs sur les symptômes de la maladie tels que la réduction du score TSS (*symptom score* [157]), la prise de poids, l'augmentation des paramètres nutritionnels (cholestérol et albumine), la réduction des biomarqueurs de

l'inflammation et l'augmentation du taux d'EPO et de leptine. En revanche les effets bénéfiques concernant la fibrose médullaire restaient modestes [158]. Les études auraient également mis en avant l'effet bénéfique du ruxolitinib sur la survie des patients, laquelle est corrélée à la taille de la rate [159] mais ces données sont controversées.

b. Les autres inhibiteurs de JAKs

Au vu des études cliniques concernant le ruxolitinib, d'autres agents chimiothérapeutiques ont été explorés pour le traitement de la MF tels qu'un inhibiteur de JAK1/2, le momelominib (CYT387, Gilead) ; un inhibiteur de JAK1, l'itacinib (INCB039110, Incyte Corporation) ou un inhibiteur ciblant plusieurs kinases dont JAK2 et FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*), le pacritinib (SB1518, CTI BioPharma). Tous ces inhibiteurs sont actuellement en phase d'essai clinique II ou III pour la MF [158].

Des inhibiteurs spécifiques de JAK2 comme l'AG490 ou le fedratinib (SAR 302503 ou TG101348, Sanofi) ont été évalués. L'AG490 initialement découvert pour son efficacité dans les leucémies aigues lymphoblastiques [160] n'a pas franchi les essais cliniques pour les NMP de par sa toxicité. Quant au fedratinib [161], ayant franchi les essais cliniques de troisième phase pour la MF, il a vu son développement suspendu par la FDA en 2013 en raison de complications neurologiques. Pourtant, son utilisation est encore suggérée notamment pour les patients intolérants ou résistants au ruxolitinib [160]. En effet, l'utilisation des inhibiteurs de JAKs semblent favoriser l'apparition de nouvelles mutations génétiques, c'est pourquoi des approches alternatives sont étudiées et des combinaisons de traitement sont envisagées [162].

I.4.2. Approches alternatives

a. La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques

Les inhibiteurs de JAK2 n'ayant pas complètement répondu aux attentes cliniques, d'autres cibles thérapeutiques ont été recherchées.

Outre l'activation constitutive de la voie de JAK/STAT et de ses effecteurs sous-jacents (STAT3/5, MAPK et PI3K), des signalisations indépendantes ont été identifiées pour être dérégulées dans la MF comme la signalisation du TGF- β , des voies impliquées dans la régulation de l'activité transcriptionnelle ou des voies du développement par exemple.

On peut noter que des anomalies de la signalisation des voies d'Hedgehog, de mTOR et du TGF- β , ont été détectées *in vivo* chez des souris GATA^{low} [163]. Aussi, certains patients présentent une forte activité enzymatique de la télomérase [164] ou une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs dûe à l'hyperméthylation des ilots CpG lors de la transformation blastique [165].

C'est pourquoi, on recense une vingtaine de composés thérapeutiques actuellement en essais cliniques pour la MF, tels que des immunomodulateurs, des agents hypométhylants, des agents antifibrotiques, des inhibiteurs de la voie PI3K-Akt-mTOR, des inhibiteurs d'Hedgehog, d'histones désacétylases (HDACi) des inhibiteurs de télomérases et des inhibiteurs de la protéine de choc thermique HSP90 [158] (**Tableau 6 et Figure 9**).

Type d'inhibiteurs	Composé	Cible thérapeutique	Industrie pharmaceutique	Stade de développement
Immunomodulateurs	Thalidomide, Thalidomid®		Celgene	Phase II
	Lenalidomide, Revlimid®	Système immunitaire/Cytokines	Celgene	Phase II
	Pomalidomide, Pomalyst®		Celgene	Phase II/III
Agents hypométylants	Azacitine, Vidaza®	Méthylation ADN	Celgene	Phase II
	Decitabine, Dacogen®		Otsuka	Phase II
Agents antifibrotiques				
<i>Anticorps</i>	Fesolimumab, GC1008	TGF-β	Genzyme	N/A
<i>Anticorps</i>	Sotatercept, ACE-011	Voie TGF- β et SMAD	Acceleron	Phase II
<i>Prot. recombinantes</i>	PRM-151	Diff. Cellulaire	Promedior	Phase I/II
	Simtuzumab, GS6624	LOXL2	Gilead	Phase II
Inhibiteurs de voies signalisations :				
<i>PI3K/AKT/mTOR</i>	Everolimus	mTOR		N/A
<i>Hedgehog</i>	Glasdegib, PF-0049913	Hedgehog	Pfizer	N/A
	Saridegib, IPI-926	Hedgehog	Infinity Pharmac.	N/A
	Erismodegib, LDE225	Hedgehog	Novartis	Phase II
<i>HDAC</i>	Panobinostat, Farydak®	HDAC	Novartis	Phase II
	Vorinostat, Zolinza®	HDAC	Merck	Phase II
	Pracinostat, SB939	HDAC	MEI Pharma	Phase II
<i>Téломérase</i>	Imetelstat, GRN163L	Activité téломérase	Geron Corp.	Phase II
	AUY922	HSP90/JAK2V917F	Novartis	Phase II
	PU-H71	HSP90/JAK2V917F		N/A

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des thérapies émergentes dans les traitements de la MF

D'après les articles de Tremblay *et al*, 2017 et Geyer *et al*, 2017

b. La combinaison de traitements

La prise de conscience de la complexité de la pathogenèse a ainsi été facilitée par l'émergence d'associations thérapeutiques.

Les inhibiteurs de JAK2 ont ainsi vu leur efficacité améliorée grâce à l'utilisation de combinaisons avec des inhibiteurs de HDAC ou des inhibiteurs de HSP90 par exemple. De façon

intéressante, le panobinostat combiné avec un inhibiteur spécifique de JAK2 (TG101209), induit l'hyperacétylation du chaperon moléculaire HSP90, ce qui a pour conséquence d'induire la dégradation protéosomale de ses protéines clientes telles que JAK2. Les études *in vitro* de cette combinaison ont ainsi montré l'augmentation de l'apoptose des cellules positives pour *JAK2V617F* et l'inhibition renforcée de la signalisation JAK/STAT [166]. En accord avec ses résultats, la combinaison d'un inhibiteur de HSP90 (AUY922) et du TG101209 a également montré un avantage thérapeutique [167].

L'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques et l'association de différents traitements devraient permettre dans l'avenir, non seulement d'agir efficacement sur les symptômes et le développement de la pathologie mais aussi d'aboutir à une véritable rémission de longue durée pour les patients.

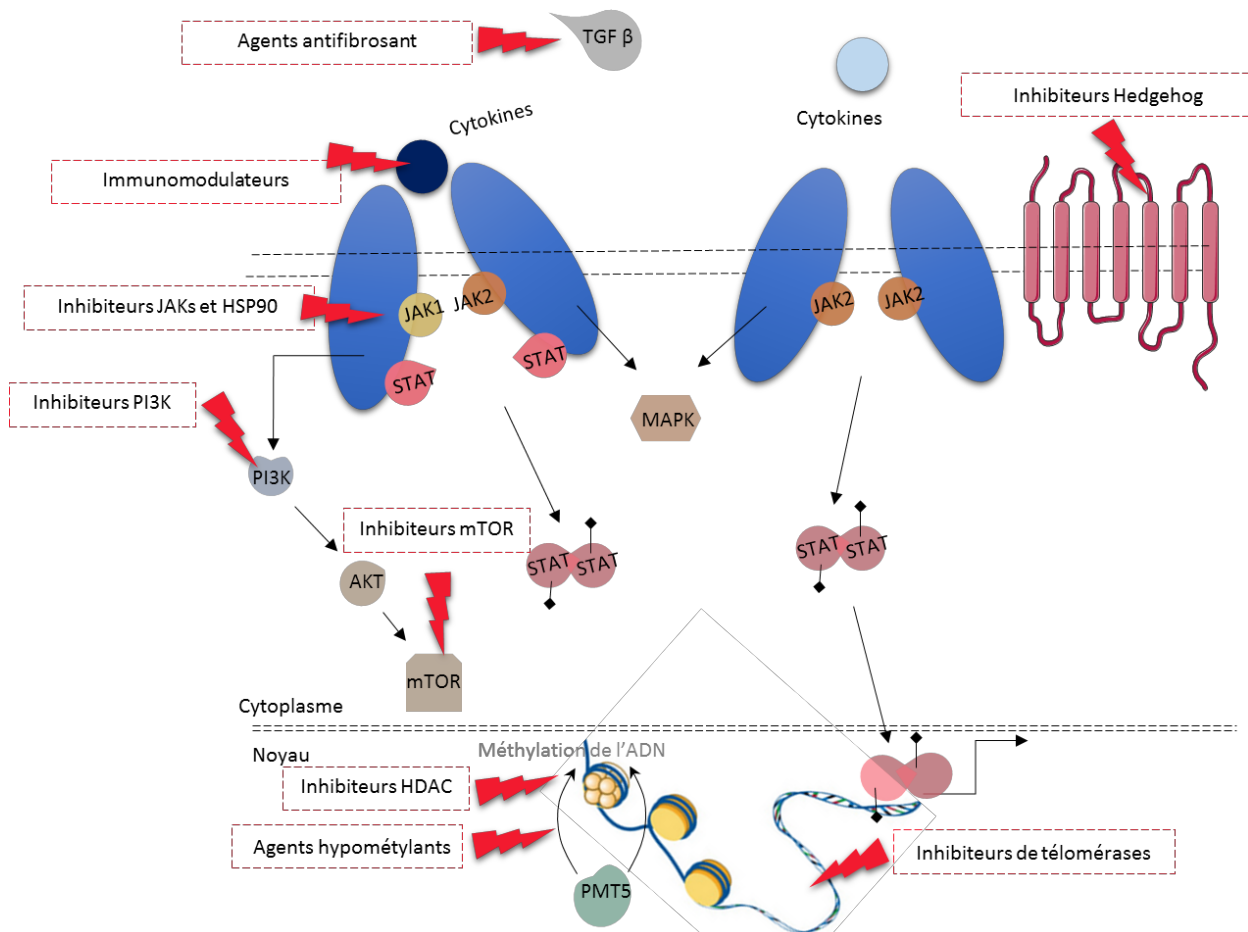


Figure 9 : Schéma représentatif des possibilités thérapeutiques dans la MF
 Inspiré de l'article de Naval Daver et Rita Assi, 2017

II. LES PROTEINES DE CHOC THERMIQUE (HSP), NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES DANS LES NEOPLASIES MYELOPROLIFERATIVES

II.1. Généralités sur les HSP

II.1.1. La réponse cellulaire au stress

L'homéostasie cellulaire est un mécanisme d'autorégulation dynamique, mis en place par les cellules afin de maintenir un équilibre physiologique stable. En effet, les cellules sont constamment soumises à toutes sortes de stimuli qu'ils soient environnementaux (les températures élevées, le stress oxydatif, les rayonnements UV), chimiques (les agents oxydants, les chimiothérapies, éthanol) ou encore physiologiques (l'inflammation, la fièvre élevée, la carence nutritive). Les cellules ont développé une capacité à résister aux agressions et à s'adapter pour survivre.

La réponse des cellules au stress a initialement été mise en évidence chez la drosophile. En 1962, F. Ritossa observa l'induction d'un renflement de certains chromosomes géants de glandes salivaires de drosophile en réponse à un choc thermique de quelques degrés ou à un agent chimique (2,4-dinitrophénol, DNP) [168]. Il nommera cette induction comme étant la « heat shock response » [169]. Douze années après les premiers travaux de Ritossa, Tissières et ses collaborateurs mettent en évidence la synthèse de protéines de stress pendant le renflement des chromosomes de la drosophile faisant suite au choc thermique. Les protéines de stress seront ainsi appelées « *heat shock protein* » (HSPs). Les HSPs étant des protéines très conservées, on les retrouve dans une majorité d'organismes unicellulaires et pluricellulaires allant de la drosophile [170] à la levure [171] jusqu'à l'homme.

La *heat shock response* est caractérisée par l'augmentation de l'expression des HSP en réponse à un stress aigu ou chronique [172]. Celle-ci requière l'activation d'un facteur de transcription HSF pour « *heat shock factor* » et de sa liaison à une région d'ADN spécifique située dans le promoteur des gènes HSP, nommée HSE pour « *heat shock elements* ». Les HSE correspondent à des répétitions inversées de la séquence nGAAn : « 5' nTTCnGAAn 3' ». La fixation du HSF sur son HSE va ainsi permettre l'activation transcriptionnelle des gènes HSPs inductibles, aboutissant à la synthèse (détectable) de protéines dans la cellule [173]. Depuis l'isolation du gène unique

HSF de *Saccharomyces cerevisia* [174] et *Drosophila melanogaster* [175], plusieurs membres de la famille des HSF ont été retrouvés chez les vertébrés (HSF1-4) et les plantes. De façon générale, HSF1 est le facteur de transcription prédominant chez les vertébrés et HSF3 a été retrouvé chez les oiseaux et récemment chez la souris. HSF1 et HSF3 sont activés en réponse à différents type de stress comme chimiques ou thermiques par exemple alors que HSF2 est induit lors de processus de différenciation [176]–[178]. HSF4 est quant à elle présente chez l’homme, les oiseaux et les rongeurs, et agit comme un modulateur dans le développement et la maintenance des organes sensoriels [179], [180].

En l'absence de stimulation, HSF1 est retenu dans le cytoplasme sous forme de monomère inactif. Lors d’un stress, HSF1 passe sous forme de trimère actif et est soumis à de nombreuses modifications post-traductionnelles régulant son activité et sa stabilité. Les trimères de HSF1 s’accumulent dans le noyau où ils se fixent au niveau de séquences consensus HSE situées sur les promoteurs des gènes *Hsps* [181]. La liaison de HSF1 aux HSE va ainsi permettre la synthèse des HSPs qui vont agir dans la cellule telles des chaperons moléculaires afin de réguler l’homéostasie, de promouvoir la survie cellulaire et de réparer les dommages protéiques [172]. L’atténuation de la réponse au stress implique d’une par l’acétylation du domaine de liaison à l’ADN de HSF1 et d’autre part les protéines de chocs thermique HSP90 et HSP70 qui vont maintenir HSF1 sous forme de monomère inactif. Lors d’un stress trop sévère, le dommage subit par la cellule étant trop important pour être réparé, la cellule entrera dans un processus de mort comme l’apoptose ou la nécrose rapide.

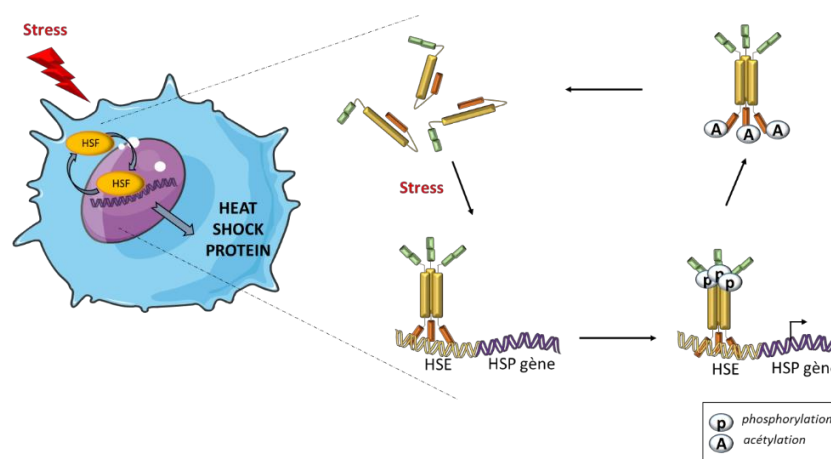


Figure 10 : Schématique représentation de la réponse au stress par HSF1 chez les vertébrés.

Le stress cellulaire induit la relocalisation de HSF1 sous forme de trimères dans le noyau cellulaire. La phosphorylation stimule l’activité transcriptionnelle de HSF1 permettant ainsi la synthèse des gènes HSPs. Adaptée de l’article Morimoto et col, 1998

II.1.2. Classification des HSPs

Basée sur leur structure et leur fonction, les HSPs sont généralement classées en fonction de leur masse moléculaire. Chez les mammifères, on distingue 6 grandes familles de HSP : HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP47 et les petites HSPs ou *small heat shock proteins* (sHSP). Chaque famille est composée de plusieurs HSPs dont la dénomination n'a pas toujours été simple puisqu'un même produit génique peut être nommé de différente manière.

En 2009, HH. Kampinga et ses collaborateurs, proposent une directive pour la nomenclature des HSPs humaines. Celle-ci est fondée à partir de la nomenclature génique « HUGO *Gene Nomenclature Committee* ». Les HSPs humaines ont ainsi été regroupées en 5 superfamilles [182]. Cette nomenclature bien que très utile pour connaître les différents noms et orthologues murins des HSP humaines, n'est pour l'instant pas systématiquement utilisée. En plus de leur masse moléculaire, chaque famille possède des propriétés qui leur sont propres comme la localisation cellulaire, la dépendance à l'ATP ou non ainsi que la possibilité de former des oligomères par exemple. Il existe une liste non exhaustive de HSPs, certaines étant plus étudiées que d'autres. Trois familles nous intéressent particulièrement ici.

La famille HSP90 est fortement conservée au cours de l'évolution et est retrouvée dans la quasi-totalité des organismes à l'exclusion des archéobactéries. On distingue 5 sous-familles classées en fonction de leur localisation subcellulaire (**Tableau 7**): HSP90 cytosolique, GP96 (*Glycosylated Protein 96*) dans le réticulum endoplasmique, TRAP1 (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Protein 1*) mitochondriale, ch-HSP90 dans les chloroplastes et HtpG bactérien. A l'opposé de HSP90, HtpG bactérien n'est pas essentiel à la réponse au stress [183]. Dans notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à HSP90 α (HSPC1) et HSP90 β (HSPC3).

The HSP90/HSPC family					
	Gene name	Protein name	Old names	Human gene ID	Mouse ortholog ID
1	<i>HSPC1</i> ^a	HSPC1	HSP90AA1; HSPN; LAP2; HSP86; HSPC1; HSPCA; HSP89; HSP90; HSP90A; HSP90N; HSPCAL1; HSPCAL4; FLJ31884	3320	15519
2	<i>HSPC2</i> ^a	HSPC2	HSP90AA2; HSPCA; HSPCAL3; HSP90ALPHA;	3324	X
3	<i>HSPC3</i> ^a	HSPC3	HSP90AB1; HSPC2; HSPCB; D6S182; HSP90B; FLJ26984; HSP90-BETA	3326	15516
4	<i>HSPC4</i> ^a	HSPC4	HSP90B1; ECGP; GP96; TRA1; GRP94; endoplasmin	7184	22027
5	<i>HSPC5</i> ^a	HSPC5	TRAP1; HSP75; HSP90L	10131	68015

^a Under consultation with HGNC and the scientific community

Tableau 7 : Nomenclature de la famille de HSP90 (HSPC) chez l'homme

D'après l'article de Kampinga, 2009

La famille HSP70 (HSP70s) constitue l'une des familles protéiques la plus conservée au cours de l'évolution et la plus étudiée des HSPs [184]. HSP70 est retrouvée dans une multitude d'organismes allant des bactéries aux plantes jusqu'à l'homme [185]. De façon intéressante, tous les eucaryotes possèdent plus d'un gène codant pour une protéine ainsi que de multiples isoformes. La famille de HSP70 possède 13 produits géniques chez l'homme et on notera 11 orthologues murins (**Tableau 8**). Certains membres sont inductibles comme HSP70 (HSP72 ou HSPA1A) alors que d'autres sont constitutivement exprimés comme HSC70 (HSP73 ou HSPA8). Ici, nous nous concentrerons sur l'une des formes les plus inductibles en condition de stress chez les mammifères [184], HSP70 (HSP70-1, HSPA1A).

HSP70 superfamily: HSPA (HSP70) and HSPH (HSP110) families					
	Gene name	Protein name	Old names	Human gene ID	Mouse ortholog ID
HSP A					
1	<i>HSPA1A</i>	HSPA1A	HSP70-1; HSP72; HSPA1	3303	193740
2	<i>HSPA1B</i>	HSPA1B	HSP70-2	3304	15511
3	<i>HSPA1L</i>	HSPA1L	hum70t; hum70t; Hsp-hom	3305	15482
4	<i>HSPA2</i>	HSPA2	Heat-shock 70kD protein-2	3306	15512
5	<i>HSPA5</i>	HSPA5	BIP; GRP78; MIF2	3309	14828
6	<i>HSPA6</i>	HSPA6	Heat shock 70kD protein 6 (HSP70B')	3310	X
7	<i>HSPA7^a</i>	HSPA7	Heat shock 70kD protein 7	3311	X
8	<i>HSPA8</i>	HSPA8	HSC70; HSC71; HSP71; HSP73	3312	15481
9	<i>HSPA9</i>	HSPA9	GRP75; HSPA9B; MOT; MOT2; PBP74; mot-2	3313	15526
10	<i>HSPA12A</i>	HSPA12A	FLJ13874; KIAA0417	259217	73442
11	<i>HSPA12B</i>	HSPA12B	RP23-32L15.1; 2700081N06Rik	116835	72630
12	<i>HSPA13^b</i>	HSPA13	Stch	6782	110920
13	<i>HSPA14</i>	HSPA14	HSP70-4; HSP70L1; MGC131990	51182	50497
HSP H					
1	<i>HSPH1</i>	HSPH1	HSP105	10808	15505
2	<i>HSPH2^b</i>	HSPH2	HSPA4; APG-2; HSP110	3308	15525
3	<i>HSPH3^b</i>	HSPH3	HSPA4L; APG-1	22824	18415
4	<i>HSPH4^b</i>	HSPH4	HYOU1/Grp170; ORP150; HSP12A	10525	12282

^a Annotated as pseudogene, but possibly a true gene

^b Under consultation with HGNC and the scientific community

Tableau 8 : Nomenclature de la famille de HSP70 (HSPA) et HSP110 (HSPH) chez l'homme.

D'après l'article de Kampinga, 2009

La famille des sHSP fut l'une des toutes premières familles de HSPs découvertes et ce grâce aux premiers travaux d'Alfred Tissières [170]. En revanche, leurs fonctions restèrent longtemps énigmatiques [186] notamment après avoir découvert que la délétion de HSP26 de levure n'avait aucune conséquence fonctionnelle ni d'effet sur la thermotolérance. Chez les mammifères, la famille des sHSP (HSPB) est composée de 10 membres, tous comportant un motif commun en C-terminal nommé le domaine alpha-cristalline (**Tableau 9**). Les deux

membres les plus étudiés et les plus fortement induits en réponse à un stress sont HSP27 (HSPB1) et l'alphaB-cristalline (HSPB5). Ici nous nous concentrerons sur HSP27 (HSPB1).

The HSPB family (small heat shock proteins)				
Gene name	Protein name	Old names	Human gene ID	Mouse ortholog ID
1 <i>HSPB1</i>	HSPB1	CMT2F; HMN2B; HSP27; HSP28; HSP25; HS.76067; DKFZp586P1322	3315	15507
2 <i>HSPB2</i>	HSPB2	MKBP; HSP27; Hs.78846; LOH11CR1K; MGC133245	3316	69253
3 <i>HSPB3</i>	HSPB3	HSPL27	8988	56534
4 <i>HSPB4</i> ^a	HSPB4	crystallin alpha A; CRYAA, CRYA1	1409	12954
5 <i>HSPB5</i> ^a	HSPB5	crystallin alpha B, CRYAB; CRYA2	1410	12955
6 <i>HSPB6</i>	HSPB6	HSP20; FLJ32389	126393	243912
7 <i>HSPB7</i>	HSPB7	cvHSP; FLJ32733; DKFZp779D0968	27129	29818
8 <i>HSPB8</i>	HSPB8	H11; HMN2; CMT2L; DHMN2; E2IG1; HMN2A; HSP22	26353	80888
9 <i>HSPB9</i>	HSPB9	FLJ27437	94086	75482
10 <i>HSPB10</i> ^a	HSPB10	ODF1; ODF; RT7; ODF2; ODFP; SODF; ODF27; ODFPG; ODFPGA; ODFPGB; MGC129928; MGC129929	4956	18285
11 <i>HSPB11</i>	HSPB11	HSP16.2; C1orf41; PP25	51668	72938

^aUnder consultation with HGNC and the scientific community

Tableau 9 : Nomenclature des petites HSPs chez l'homme.

D'après l'article de HH Kampinga, 2009

II.1.3. HSP90

a. Structure de HSP90

HSP90 est une protéine chaperon et ATP dépendante très abondante dans les cellules eucaryotes. Elle représente 1-2% des protéines totales et peut augmenter jusqu'à 4-6% dans les cellules en état de stress [12]. Elle participe à de nombreux processus cellulaires et son activité va dépendre de sa conformation tridimensionnelle [11].

Chez les mammifères, les deux membres les plus abondants sont HSP90 α et HSP90 β . Ils sont exprimés dans le cytoplasme grâce à deux gènes distincts et possèdent 86% d'homologie. HSP90 α représente la forme inductible localisée dans le cytosol et dans le noyau alors que HSP90 β est une isoforme constitutivement exprimée dans le cytoplasme [187].

HSP90 comme tous les membres de sa famille partage une structure commune composée de 3 principaux domaines : un domaine carboxy-terminal (C) responsable de la dimérisation, un domaine intermédiaire ou *Middle domain* (M) et un domaine amino-terminal (N) contenant un site de liaison à l'ATP (**Figure 11**). Le domaine N permet la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, deux fonctions essentielles à l'activité chaperon de HSP90. L'activité ATPasique de HSP90 est fortement régulée par la fixation de co-chaperons (sur le motif MEEV), de protéines clientes mais également par des modifications post-translacionnelles comme l'acétylation, la

phosphorylation ou l'ubiquitination. De manière générale, HSP90 agit essentiellement sous forme d'homodimère de type α - α ou β - β mais peut dans certains cas agir sous forme d'hétérodimère ou de monomères [188].

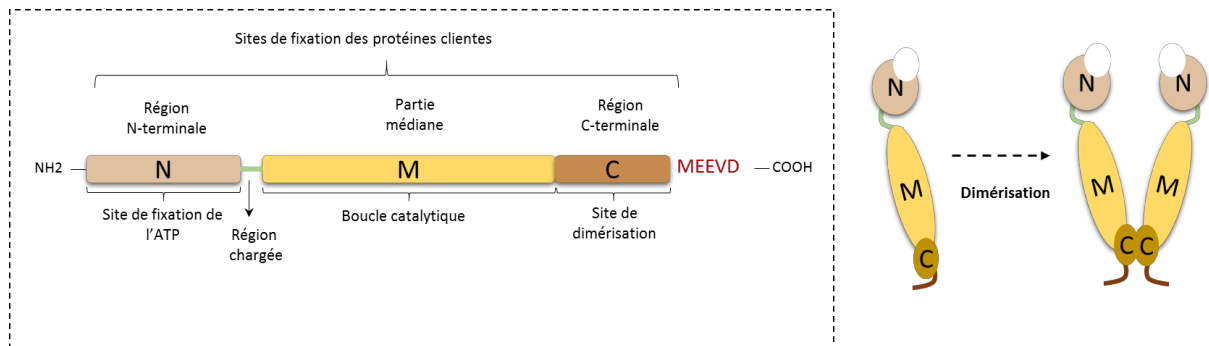


Figure 11 : Schéma de la structure de HSP90 monomérique et dimérique

Structure schématique d'un monomère de HSP90 : N représentant le domaine amino-terminal capable de lier l'ATP, M représentant le domaine intermédiaire ou partie médiane (*Middle domaine*), C représentant le domaine carboxy-terminal responsable de la dimérisation de HSP90. La partie carboxy-terminale contient le motif MEEVD nécessaire à la fixation de co-chaperon. Modèle proposé pour la dimérisation de HSP90 par les domaines C-terminaux.

Adaptée de l'article SE Jackson, 2013

b. Fonctions intracellulaire et extracellulaire de HSP90

HSP90 est un chaperon moléculaire nécessaire à la maturation et au repliement correct des protéines notamment lors des conditions de stress. De plus, il permet la stabilité, la régulation et l'activation de protéines ou de complexes protéiques [189].

De manière générale, HSP90 va piéger telle une « pince » une protéine cliente entre ses deux monomères puis fixer et hydrolyser l'ATP pour permettre la bonne conformation et la stabilité de la protéine prise en charge contrôlant ainsi sa dégradation par le système du protéasome (Figure 12).

On recense plus de 200 protéines clientes pour HSP90 [190] et nombres d'entre elles sont impliquées dans des processus cellulaires essentiels tels que la croissance cellulaire, la prolifération ou la survie. On notera également que certaines protéines sont décrites pour jouer un rôle dans le développement des néoplasies [191]. En effet, des protéines associées à l'oncogénèse tels que des médiateurs de l'apoptose (Bcl-2, Apaf-1), des régulateurs du cycle cellulaire, des gènes suppresseurs de tumeur (p53), des médiateurs de l'invasion tissulaire ou

métastatique (MMP2 ou *matrix metalloproteinase-2*), des facteurs de transcription (HSF1, HIF-1 (*Hypoxia inducible factor-1*), STAT3), des molécules de signalisations (AKT, RAF-1), des récepteurs hormonaux (androgène, progestérone, glucocorticoïde) ou des kinases mutantes (Bcr-abl, JAK2V617F) sont connues pour interagir avec HSP90. La capacité de HSP90 à interagir avec un grand nombre de protéines est contrôlée par ses cycles d'ATP mais également par ses co-chaperons qui agissent tels des adaptateurs et permettent la sélection et la spécificité des protéines clientes [188]. Par exemple, le co-chaperon HOP pour « *Hsp organizing protein* » a la capacité de se lier à HSP90 et HSP70 par son domaine TRP (*tetratricopeptide repeat*), permettant ainsi de coupler deux systèmes chaperons mais aussi de stabiliser la dimérisation de HSP90 et d'inhiber son cycle ATP [188].

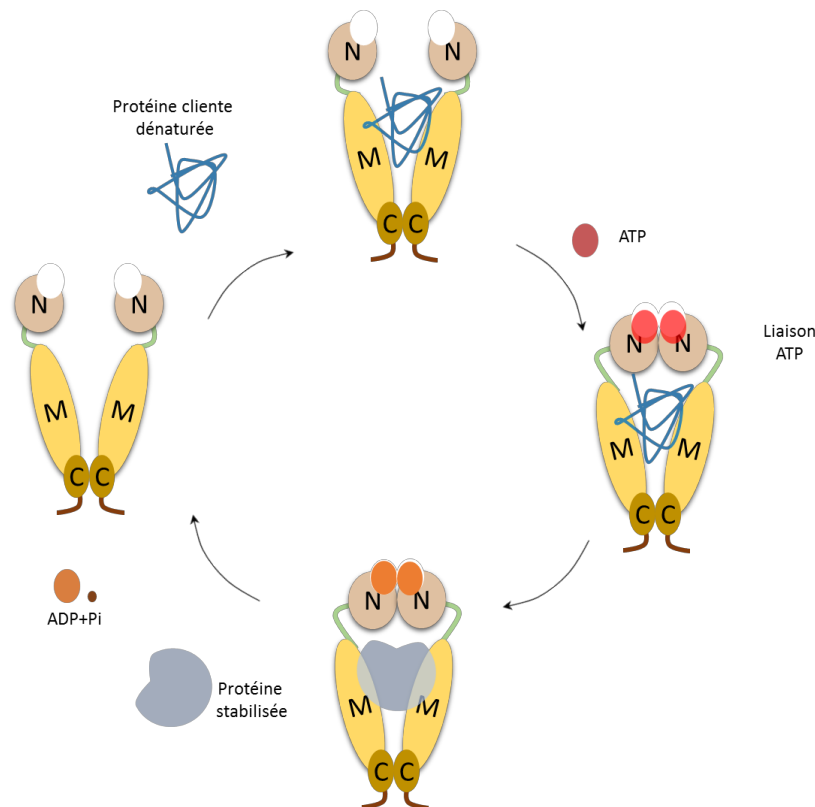


Figure 12 : Le cycle chaperon de HSP90

Modèle schématique du cycle chaperon de HSP90. La protéine cliente dénaturée va venir se fixer entre deux monomères de HSP90. La fixation de l'ATP va induire le changement de conformation de la pince de HSP90. La protéine cliente est ainsi piégée, renaturée et stabilisée. L'hydrolyse de l'ATP provoque la libération de la protéine cliente.

Adaptée de l'article de Pearl et Prodromou, 2006

De façon intéressante, l'inactivation des gènes *in vivo* de HSP90 a été étudiée chez la souris. Alors que le KO de HSP90 β est létal à l'état embryonnaire, l'inactivation de la forme inducible

(HSP90 α) est viable. Le KO HSP90 α possède un phénotype normal à l'exception que les males sont stériles [192][193].

HSP90 peut également être retrouvé dans le milieu extracellulaire (eHSP90). eHSP90 a été rapporté pour participer à de nombreux processus physiologiques et pathologiques comme la cicatrisation [194], l'angiogenèse [195], l'activation des monocytes, de macrophages ou des cellules dendritiques [196] ainsi que dans l'invasion tumorale [197] et la formation de métastases [198]. Il semblerait que les cellules normales ne soient pas capables de sécréter HSP90 en dehors d'une condition de stress (chimiothérapies, chaleur, rayonnements UV, stress oxydatifs ou les cytokines par exemples) alors que les cellules cancéreuses en produisent de manière constitutive [199]. Les voies de sécrétion de HSP90 ne sont pas encore totalement élucidées mais il semblerait que les cellules utilisent la voie des exosomes afin de libérer HSP90 dans le milieu extracellulaire [194], [200].

La forme induite de HSP90 (HSP90 α) est préférentiellement retrouvée dans le milieu extracellulaire. En effet, des études sur les milieux de culture de cellules normales et cancéreuses ont mis en évidence une plus forte proportion d'eHSP90 α que d'eHSP90 β dans le milieu extracellulaire. Au niveau clinique, des études montrent une augmentation de HSP90 α jusqu'à 1000 fois plus élevée chez les patients atteints de cancers en comparaison avec des donneurs sains dans le plasma [201] ou le sérum [202]. De plus, il semblerait que l'invasion tumorale et les métastases corrélerent avec le niveau extracellulaire de HSP90 α [197]. Les études sur l'inhibition spécifique d'eHSP90, à l'aide d'un inhibiteur non perméable (le DMAG-N-oxide) montrent une capacité à réduire l'invasion tumorale [198].

c. Inhibiteurs de HSP90

HSP90 est impliquée dans de nombreuses pathologies et notamment en cancérologie comme le cancer du sein [203], les leucémies comme les leucémies aigües et myélomonocytaires chroniques [204] ou les néoplasies myeloprolifératives [59]. Elle est impliquée dans l'oncogenèse et la progression tumorale, et l'augmentation de son expression est souvent associée à un mauvais pronostic [203]. Ensemble, ces études mettent en évidence le rôle clé de HSP90 dans l'oncogenèse et son véritable intérêt thérapeutique en clinique anti-cancéreuse.

Il existe une multitude d'inhibiteurs de HSP90 (**Annexe, Tableau 1**). Dans cette partie, nous nous concentrerons sur ceux ayant un intérêt en hématologie clinique. Il existe deux principales classes de molécules inhibitrices de HSP90 : des inhibiteurs naturels et leurs dérivés et des inhibiteurs chimiques.

La découverte du domaine ATP a été d'une grande importance dans la découverte d'inhibiteurs de HSP90 et plus particulièrement pour les inhibiteurs naturels. Les plus connus étant la geldanamycine et le radicicol [205].

La geldanamycine est un antibiotique de la famille des ansamycines à benzoquinone capable de se lier avec une forte affinité à la poche à ATP de HSP90 [205], [206]. Beaucoup de dérivés de la geldanamycine ont été décrits dont le plus utilisées sont le 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (tanespimycine, 17-AAG) et son dérivé soluble, le 17-[2-(diméthylamino) ethyl] amino-17-demethoxygeldanamycin (alvespimycine, 17-DMAG). Ces deux composées sont en phase d'évaluation d'essais cliniques. Une formulation sans DMSO du 17-AAG est testée en phase III alors que le 17-DMAG est en phase I pour un grand nombre de cancers. Comme la geldanamycine, le radicicol est un antibiotique antifongique qui se lie au domaine amino-terminal de HSP90 [207] et déstabilise les protéines clientes de HSP90. S'avérant instable *in vivo*, un dérivé nommé VER-52296 (NVP-AUY922) a été développé et est entré en phase d'essais cliniques en 2007.

Des dérivés synthétiques ont également vu le jour notamment des dérivés des purines. Les premiers dérivés tels que le PU-H71 et le PU-DZ8 partagent des propriétés biologiques communes avec la geldanamycine et le radicicol [208]. Ces dérivés ont une plus forte affinité pour HSP90 que l'ADP tout en étant plus soluble et spécifique que les inhibiteurs naturels. D'autres composés chimiques ont été produits notamment par la compagnie Serenex tels que le SNX-5422 ou le SNX-7081 utilisé dans les leucémies lymphoïdes chroniques [209].

En revanche, la majorité des inhibiteurs de HSP90 dont le 17-AAG, le PU-H71 ou l'AUY922 ont l'inconvénient majeur d'induire l'expression compensatoire des autres HSPs (HSP70 et/ou HSP27). En effet, HSP90 étant le régulateur privilégié du facteur de transcription HSF1, son inhibition va induire la dissociation des monomères de HSF1, entraînant ainsi la formation et la translocation nucléaire de trimères actifs et l'induction transcriptionnelle des autres HSPs [210].

Cette induction compensatoire de HSPs aura pour conséquence de rendre les cellules cancéreuses résistantes à la chimiothérapie [211], [212].

II.1.4. HSP70

a. Structure de HSP70

Comme HSP90, HSP70 est un chaperon moléculaire dépendant de l'ATP. Il possède une structure composée d'un domaine amino-terminal nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP (ABD pour *ATP Binding Domain*), un domaine intermédiaire et un domaine carboxy-terminal de liaison aux peptides (PBD pour *Peptide Binding Domain*) [185], [213].

Le PBD est composé de deux feuillets- β et d'une hélice- α ainsi que d'un motif EEVD en partie carboxy-terminale, lui-même nécessaire à la liaison et au repliement du substrat et à la fixation d'autres HSP ou des co-chaperons [214]. HSP70 agit sous forme de monomère dans la cellule et son activité va dépendre de l'ATP et de sa localisation cellulaire qui peut être intracellulaire, membranaire ou extracellulaire (**Figure 13**).

b. Fonctions intracellulaires et extracellulaires de HSP70

HSP70 est un chaperon moléculaire dépendant de l'ATP ayant de multiples rôles intracellulaires et extracellulaires. Il est localisé dans le cytosol, dans le noyau et est également retrouvé à la membrane des cellules cancéreuses. HSP70 est capable d'agir dans des conditions dites « normales » mais aussi suite à des stress environnementaux ou physiologiques.

En condition de stress cellulaire, HSP70 s'accumule dans les cellules et permet le maintien de l'homéostasie et de la survie cellulaire [214]. De par son rôle chaperon, HSP70 est capable d'assister les protéines néo-synthétisées, de participer à l'assemblage de complexes protéiques et de permettre le transport de protéines à travers les membranes cellulaires [215].

Son activité chaperon est régulée par ses co-chaperons qui peuvent être regroupés en trois groupes : (A) les co-chaperons qui possèdent un J-domaine capables de se lier au domaine ABD de HSP70 et de stimuler l'activité ATPasique comme HSP40. (B) les facteurs d'échange de nucléotides NEF (*nucleotide factor exchange*) comme BAG-1 (*Bcl-2 associated athanogene 1*), HSP110 ou HSP27 qui catalysent l'hydrolyse de l'ATP. (C) les co-chaperons qui possèdent un

domaine TPR capable de lier le motif EEVD comme CHIP (*C-terminus of HSP70-interacting protein*) ou Hop [208], [216].

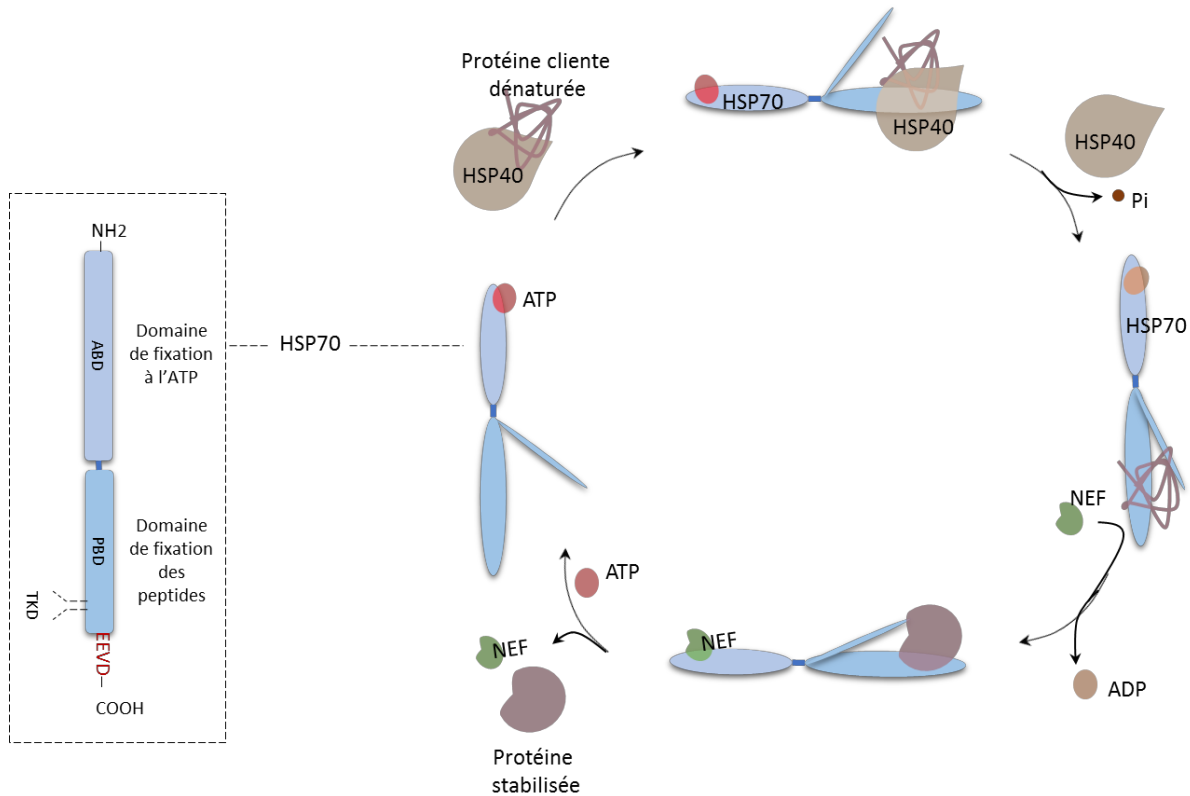


Figure 13 : Structure et modèle schématique du cycle chaperon de HSP70

La protéine cliente dénaturée va être prise en charge par HSP40 et qui délivrée à HSP70 déjà liée à l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP entraîne un changement de conformation de HSP70 qui se « referme » sur son substrat pour le stabiliser. Des facteurs d'échanges nucléotidiques (NEF) permettront la dissociation de l'ADP. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP permettra « l'ouverture » d'HSP70 et la libération du substrat stabilisé.

Adaptée de l'article de Hennessy et col, 2005

Outre son rôle de chaperon moléculaire, HSP70 possède des fonctions anti-apoptotiques et immunologiques [217]. Dans la cellule, HSP70 agit à différents points clés de l'apoptose : (1) en amont de la voie mitochondriale, en modulant l'activation de kinases de stress : AKT, JNK ou ERK, (2) au niveau de la mitochondrie en contrôlant la libération du cytochrome C et en interagissant avec BAX [218] et (3) en aval de la voie mitochondriale, en bloquant l'apoptose induite par APAF-1 [219] et la caspase 3 [220]. HSP70 peut aussi inhiber l'apoptose induite de manière extrinsèque. En effet, il a été montré que HSP70 était capable d'interagir avec les récepteurs de mort DR4 et DR5 (*Death receptor 4/5*) et d'inhiber la mort cellulaire dans les cellules leucémiques *BCR-ABL* positives [221].

Contrairement à d'autres HSPs, l'inactivation du gène de HSP70 (HSP70.1) est viable *in vivo*. En revanche, les souris présentent un dysfonctionnement de la fonction cardiaque [222].

Dans le milieu extracellulaire, HSP70 possède des fonctions immunologiques et immuno-modulatrices [217]. HSP70 est retrouvée sous deux formes : une forme libre et une forme liée aux membranes. Cette différence vient du fait qu'il existerait deux mécanismes d'export de HSP70 à l'extérieur de la cellule [223], [224] : (1) une voie dite passive, où HSP70 est retrouvée sous forme libre dans le milieu extracellulaire suite à la mort cellulaire des cellules nécrotique et (2) une voie active, de type sécrétoire, où HSP70 est retrouvée associée à des membranes de vésiculaires extracellulaires comme celles des exosomes (nano-vésicules de 30 à 90 nm).

Notre équipe, en collaboration avec l'équipe de François Ghiringhelli, a pu montrer le rôle immuno-modulateur des exosomes présentant HSP70 à leur membrane [225]. Il est important de noter que les exosomes dérivés de tumeurs présentent HSP70 à leur surface alors que les exosomes dérivés de cellules normales en sont dépourvus [226]. Les travaux de Chalmin F, ont montré que HSP70 à la surface des exosomes, ciblait spécifiquement les cellules immunosuppressives ou *Myeloid-Derived Suppressor cells* (MDSC) via son interaction avec le *Toll-like Receptor 2* (TLR2). La fixation va ainsi permettre l'activation de la voie de signalisation STAT3 et la production autocrine d'IL-6 par les MDSC. Les MDSC sont des cellules myéloïdes immatures de la moelle osseuse rejoignant le microenvironnement tumoral en cas de cancer [227]. Leur activation via HSP70 va favoriser les processus d'échappements tumoraux.

HSP70 est aussi retrouvée sous forme circulante et de nombreuses études mettent en relation son taux extracellulaire avec la réponse aux traitements chimiothérapeutiques ou le volume tumoral et le décrivent comme un biomarqueur de choix en cancérologie [228]–[230].

c. Inhibiteurs de HSP70

HSP70 est connue pour être surexprimée dans beaucoup de pathologies comme le cancer du sein, le cancer colorectal mais également dans les leucémies aiguës et chroniques myéloblastiques et leucémies myélomonocytaires chroniques [231][232]. De nombreuses études rapportent son rôle clé dans le développement tumoral et son expression anormalement élevée dans les tumeurs, est souvent associée à la formation de métastases et

à un mauvais pronostic pour les patients [208]. De par ses fonctions immunogènes et anti-apoptotiques, HSP70 représente une cible thérapeutique de choix en cancérologie.

Il existe différents types d'inhibiteurs de HSP70 mais peu à ce jour ont réussi à passer les premières phases d'essais cliniques.

Notre équipe a mis au point le premier inhibiteur liant le domaine PDB de HSP70. Il s'agit d'un dérivé peptidique, ADD70, qui a été produit sur la base de l'interaction entre HSP70 et sa protéine cliente AIF (*apoptosis inducing factor*). Cet inhibiteur est capable de séquestrer HSP70 dans le cytosol et de sensibiliser les cellules cancéreuses à la mort induite par les traitements chimiothérapeutiques [233].

Un autre inhibiteur du PDB, le 2-phenylethynesulfon-amide (PES ou pifithrin) est un composé chimique, bloquant l'association de HSP70 avec ses co-chaperons et ses protéines clientes. Il va déstabiliser la fonction chaperon de HSP70 et induire la mort cellulaire [55],[56]. Contrairement à l'ADD70 ou au PES, certains inhibiteurs sont spécifiques du domaine de liaison à l'ATP (ABD). Le premier testé fut le VER-155008. Il s'agit d'un composé dérivé de l'adénosine qui est considéré comme un analogue de l'ATP. Il inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose dans les lignées humaines cancéreuses du sein et colorectales [236]. En revanche, il cible également la forme constitutive de HSP70, HSC70. Notre équipe a aussi mis au point des inhibiteurs spécifiques de la forme inductible afin de palier à cet effet indésirable [237]. Il s'agit de deux aptamères peptidiques A17 et A8, capables de lier les domaines PDB et ABD respectivement et de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par le 5-fluorouracil (5-FU) ou le cisplatine. Nous avons également montré *in vivo* que l'utilisation de l'aptamère A8, en complément du cisplatine, permettait de réduire significativement le nombre de MDSC dans la rate, de bloquer la progression tumorale et de restaurer une réponse immunitaire efficace [238].

II.1.5. HSP27

a. Structure multi-phosphorylable et oligomérique

HSP27 est une protéine chaperon de 27 kDa, indépendante de l'ATP qui partage avec les autres membres de sa famille une capacité à être phosphorylée et à s'oligomériser. Schématiquement,

HSP27 est composée de trois domaines : (1) d'un domaine noté WDPF (pour la présence de résidus W (tryptophane), D (acide aspartique), P (proline), et F (phenylalanine) en position amino-terminale, nécessaire à la formation d'oligomères (2) d'un domaine conservé nommé alpha-cristallin (ACD) et (3) d'une queue flexible de 22 résidus en carboxy-terminale permettant la stabilité des grands oligomères (**Figure 14**).

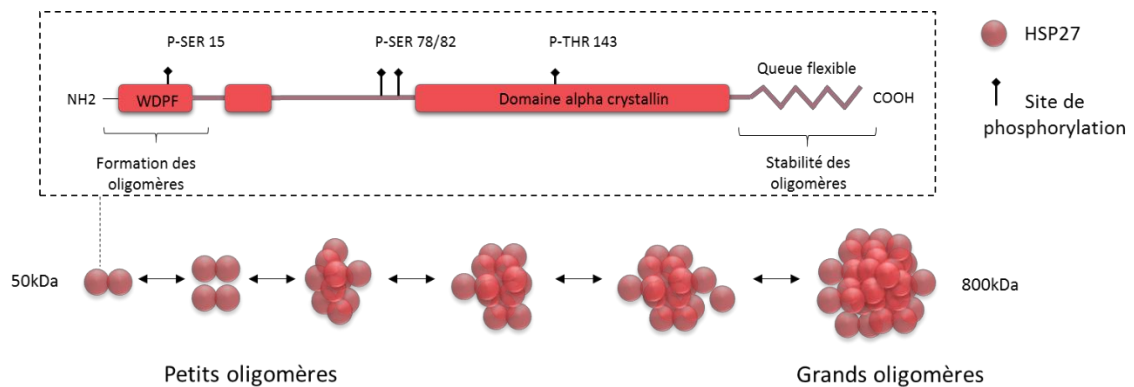


Figure 14 : Structure et organisation de HSP27 humaine

HSP27 est en équilibre entre un état dimérique et oligomérique. Selon son organisation et son statut de phosphorylation, HSP27 aura différentes fonctions au sein des cellules.

D'après l'article d'Arrigo et col, 2011

HSP27 possède une structure tridimensionnelle dynamique et complexe dont la masse moléculaire native varie de 50 à 800 kDa [239]. Son organisation structurale est largement sous la dépendance de son environnement et de son statut de phosphorylation [239]. Le degré de phosphorylation de HSP27 peut être modifié par des agents comme les esters de phorbol, le calcium ou les conditions de stress comme le choc thermique [240].

Elle possède trois serines phosphorylables (Ser15, Ser78 et Ser82) qui sont localisées au niveau de son domaine amino-terminal. Plusieurs kinases sont connues pour phosphoryler HSP27 et plus particulièrement les MAPKAP Kinase 2/3 [241], elle-même activées par phosphorylation par la *mitogen-activated protein kinase* p38 (p38MAPK). En 2000, un nouveau site de phosphorylation localisé de la thréonine 143 (Thr 143) fut découvert. La Thr 143 y est décrite comme pouvant être phosphorylée par la protéine kinase *cGMP-dependent protein kinase* (cGK) et pour jouer un rôle dans l'agrégation plaquettaire [242].

Comme il a été précédemment mentionné, HSP27 est capable de s'oligomériser. Il a été proposé que le domaine alpha-cristallin et plus particulièrement la cystéine 137 soit responsable de la formation de dimères stables (50 kDa) capables de se multimériser entre eux par des interactions intermoléculaires.

Classiquement, HSP27 est décrite sous forme de dimère lorsque la protéine est phosphorylée alors que sous forme non phosphorylée, elle se retrouve sous forme de gros oligomères. Aujourd'hui ce dogme est remis en question et nombreux sont les travaux qui tentent d'analyser la composition en phosphorylation des différents oligomères [239], [243]. De plus, les auteurs cherchent à mettre en relation les différentes structures oligomériques avec une ou plusieurs fonctions et des protéines clientes.

Pour conclure, Il est important de noter que contrairement à HSP90 et HSP70, HSP27 est un senseur cellulaire dynamique qui va être apte à former des oligomères spécifiques et à interagir avec des partenaires spécifiques, le tout en fonction de l'environnement cellulaire dans lequel la protéine se trouve [244].

b. Fonctions et rôles intra et extracellulaire

HSP27 a été pour la première fois décrite pour son rôle protecteur à la suite d'un choc thermique [245]. Par la suite, HSP27 fut étudiée pour ses nombreuses fonctions cellulaires en réponses à d'autres types de stress comme le stress oxydatif [246], les stimuli pro-inflammatoires [247] ou les agents chimiothérapeutiques [248], [249]. HSP27 est un chaperon moléculaire ubiquitaire qui possède des aptitudes cytoprotectrices et anti-oxydantes [250]. Elle participe aux processus de différenciation cellulaire et interagit avec des acteurs du cytosquelette [251] et de l'apoptose [252].

Elle est exprimée dans de nombreux tissus et types cellulaires au cours du développement et de la différenciation cellulaire [253]. D'une manière générale, son expression basale est faible mais elle est fortement inductible en cas de stress. Elle est constitutivement localisée dans le cytosol [254] mais sa localisation intra-cytoplasmique peut varier avec le type cellulaire. En réponse à un stress ou un choc thermique, HSP27 est redistribuée dans la cellule notamment vers la région nucléaire. Par exemple, dans les cellules HeLa (cellules de cancer du col de

l'utérus) ayant subi un stress thermique, HSP27 migre transitoirement de la région perinucléaire vers le noyau [240].

Lors d'un stress cellulaire, HSP27 grâce à son activité « *holdase* » agit en tant que chaperon moléculaire afin de séquestrer les protéines dénaturées [255]. Les protéines sont ensuite prises en charge par des chaperons dépendants de l'ATP (HSP70, HSP90) afin d'être renaturées. HSP27 peut aussi séquestrer des oligomères protéiques pouvant être toxiques pour les cellules [256]. Les études *in vivo* ont ainsi montré que HSP27 formait des agrégats non toxiques avec les oligomères et permettait ainsi la protéostasie cellulaire.

HSP27 joue également un rôle clé au cours du stress oxydatif. Cette HSP est induite et participe au stockage et à l'élimination de protéines oxydées [257]. Sous forme de gros oligomères, HSP27 diminue la production et la quantité intracellulaire de ROS en modulant entre autre l'activité d'enzymes anti-oxydantes comme la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et en augmentant la quantité de glutathion intracellulaire [246][258].

L'implication de HSP27 dans le processus de différenciation a été mise en évidence pour la première fois dans les cellules souches embryonnaires. En effet, cette étude montre que l'augmentation de l'expression de HSP27 est nécessaire à la différenciation des cellules souches embryonnaires laissant entendre que le KO HSP27 serait non viable. Mais contrairement à ce qui avait été admis auparavant, un KO de HSP27 a pu être réalisé en 2013 [259]. Ainsi, il a été démontré *in vivo* que HSP27 contrôlait directement la prolifération et le cycle cellulaire, impactait la réponse inflammatoire et aidait à cicatrisation [260]–[263].

Notre équipe a également montré le rôle clé de HSP27 dans la différenciation érythroïde [264]. L'expression de HSP27 augmente au cours du processus de différenciation, principalement sous sa forme phosphorylée, migre dans le noyau des cellules CD36⁺ où elle va se lier au facteur de transcription GATA-1. En conséquence GATA1 est ubiquitinylé puis dégradé par le système du protéasome.

HSP27, comme HSP70 et HSP90, est retrouvée dans le milieu extracellulaire soit sous forme libre, sécrétée par les cellules, ou au sein de vésicules telles que les exosomes [265], [266]. HSP27 extracellulaire joue un rôle dans de nombreux processus comme la différenciation cellulaire, l'angiogenèse, l'inflammation, la progression de l'athérosclérose et la croissance tumorale [267]–[270].

De nombreux types cellulaires comme les granulocytes, les macrophages, les kératinocytes, les plaquettes, les cellules du système cardiovasculaire ainsi que les cellules cancéreuses du poumon, du foie, du sein et de l'ovaire ont été démontré comme libérant HSP27 dans le milieu extracellulaire [152], [269], [271], [272]. De façon intéressante, les cellules ayant subi un choc thermique voient leur sécrétion de HSP27 augmentée, en corrélation avec l'augmentation du taux intracellulaire [266].

HSP27 extracellulaire a été décrite comme interagissant avec les TLRs (*Toll-like receptors*) dont le TLR-2, TLR-3 et TLR-4 [273]–[275]. Grâce à sa fixation aux TLRs, HSP27 induit la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance [267], [273]–[275]. Son activité sur la signalisation est fonction du type cellulaire sur lequel elle va agir. Par exemple, son action sur les macrophages humains induit la voie NF- κ B et la sécrétion de GM-CSF et d'IL-10 [274], alors que sur les cellules endothéliales microvasculaires, la voie du NF- κ B induit la sécrétion de VEGF et d'IL6 et IL8 [275].

Aussi, le taux de HSP27 extracellulaire est corrélé avec l'agressivité tumorale ainsi que la réponse à la chimiothérapie du patient. C'est pourquoi, HSP27 est aujourd'hui envisagée comme un biomarqueur potentiel [266], [269], [276].

c. Inhibiteurs de HSP27

HSP27 est constitutivement exprimée dans un grand nombre de types cellulaires et de tissus lors des différentes étapes du développement et de la différenciation cellulaire. Les taux élevés de HSP27 sont eux communément détectés dans certaines pathologies comme la fibrose (pulmonaire [277] ou rénale [278]) et le cancer (cancer du sein [279], le cancer colorectal [280], le cancer du pancréas [281] et dans les LAM [282]).

Son expression étant généralement corrélée avec le statut oncogénique des cellules cancéreuses et à l'acquisition de phénomènes de résistance aux traitements [283], [284]. Des inhibiteurs de HSP27 ont ainsi été développés afin de contrebalancer les effets négatifs de HSP27 dans les cellules. Plusieurs stratégies ont été mises au point afin de cibler spécifiquement HSP27.

La première permet de cibler directement l'ARNm de HSP27 à l'aide d'un oligonucléotide anti-sens (OGX-427). OGX-427 ou Apatorsen est un oligonucléotide synthétique de 20 nucléotides (20-mer) dirigé contre le site d'initiation de la traduction protéique. Il permet de façon dose

dépendante d'inhiber efficacement l'expression de HSP27 [285]. Il a pu montrer son efficacité dans plusieurs cancers comme le cancer de la prostate [285], de la vessie[286], du pancréas [287] ou du poumon [288]. Notre équipe a montré son effet bloquant sur la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et sur le développement de la fibrose dans un modèle *in vivo* de fibrose pulmonaire idiopatique [277]. De plus, les atouts majeurs de cet inhibiteur, sont qu'il n'induit pas l'expression compensatoire d'autres HSPs et qu'il ne présente pas d'effets toxiques notoires, ce qui le rend fortement prometteur en thérapie anticancéreuse. L'OGX-427 est actuellement en phase II d'essai clinique pour les cancers du poumon, de la prostate et de la vessie (<http://oncogenex.com/apatorsen-ogx-427>).

Une seconde approche, vise à cibler directement la protéine HSP27, malheureusement il n'existe à l'heure actuelle que très peu d'inhibiteurs de ce type. L'un d'entre eux, le RP101 (Bromovinyldeoxyuridine, Brivudine, BVDU) fut dans un premier temps décrit pour ses effets synergiques avec les traitements chimiothérapeutiques du cancer du pancréas. Il s'agit à l'origine, d'un composé antiviral utilisé contre l'herpès simplexe de type 1 et le virus varicelle zona. Il fut ensuite décrit pour sa capacité à lier spécifiquement HSP27 au niveau des deux résidus phénylalanines (Phe29 et Phe33). De par son interaction avec HSP27, la brivudine bloque la fixation de certaines oncoprotéines clientes de HSP27 (AKT1, CASP3, CYC1) et stimule l'activation des caspases. Le RP101 est également capable de réduire l'invasion tumorale *in vitro* et d'accentuer fortement les effets de la chimiothérapie *in vivo* [289]. Un inhibiteur chimique a été décrit pour se lier et moduler la phosphorylation de HSP27, le KRIBB3 [290].

La stratégie thérapeutique visant à bloquer l'interaction de HSP27 avec ses onco-partenaires n'est pas restreinte aux inhibiteurs chimiques. En effet, deux aptamères peptidiques (PA11 et PA50) ont été conçus afin de se lier spécifiquement HSP27 et d'inhiber sa capacité à reconnaître ses partenaires spécifiques sans moduler son expression [291]. Ces deux aptamères ont montré une capacité à contrebalancer la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques et à inhiber la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffe. Compte tenu de la capacité de ces aptamères à moduler l'organisation de la structure de HSP27 et son interactome pro-cancéreux, ils pourraient représenter une nouvelle opportunité thérapeutique [291].

II.2. Protéines de choc thermique, cibles thérapeutiques pour les néoplasies myéloprolifératives *BCR-ABL* négatives ?

Les HSPs sont connues pour être supprimées dans une large gamme de cancers chez l'homme et pour avoir un rôle dans la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire ainsi que dans la tumorigénèse (partie II.1). De fait, il n'est pas étonnant de les retrouver impliquées dans les néoplasies myéloprolifératives.

La première HSP à avoir été identifiée dans les NMP est HSP90, puis HSP70 a été mise en évidence plus particulièrement dans la PV.

L'ensemble de ses données a fait l'objet d'une publication présentée en annexe.

II.2.1. HSP90

L'implication de HSP90 dans les NMP a été particulièrement mise en avant lors des études précliniques. L'utilisation d'inhibiteurs de HSP90 est suggérée comme une alternative thérapeutique pour les NMP dépendante de JAK2. Cette nouvelle stratégie consiste à cibler de façon originale les protéines clientes de HSP90 afin de déstabiliser la signalisation JAK/STAT.

Les premiers travaux consistaient à inhiber indirectement la protéine cliente AKT en utilisant un inhibiteur de HSP90, le 17-AAG [292]. L'utilisation du 17-AAG, dans la lignée homozygote pour *JAK2V617F*, HEL92.1.7, a eu pour effet de diminuer la phosphorylation de JAK2 et STAT5 en association avec une diminution de l'expression de HSP90 et d'AKT. Ces résultats ont suggéré que HSP90 participait à la stabilité ou à l'activation de JAK2.

HSP90 est décrit pour être un chaperon de JAK2 dans le contexte de la signalisation de l'interféron [46]. Puis en 2010, S. Marubayashi, confirme l'interaction directe de HSP90 avec JAK2 dans le contexte des NMP [59]. L'utilisation d'un inhibiteur moins toxique que le 17-AAG, le PU-H71, a permis de diminuer la prolifération cellulaire, d'atténuer les voies de signalisation JAK-STAT et d'induire l'apoptose des lignées *JAK2V617F* et *MPLW515L* positives. Son utilisation *in vivo*, normalise la formule sanguine, l'HEM et diminue la fréquence allélique dans les modèles murins *JAK2V617F* et *MPLW515L*. De façon intéressante, l'inhibition de HSP90 diminue la phosphorylation de STAT5 dans les cellules CD34+ de patients. Contrairement au 17-AAG, un effet synergique a été observé entre le PU-H71 et d'autres inhibiteurs de JAKs, tels que le

TG101348 et le ruxolitinib utilisé en clinique pour le traitement de la MF [59][293]. La combinaison entre le PU-H71 et le ruxolitinib semble bénéfique sur le développement de la fibrose médullaire *in vivo*.

De façon intéressante, le panobinostat, un inhibiteur d'HDAC ayant la capacité de bloquer la fonction chaperon de HSP90, a montré une synergie en association avec TG101209. Son efficacité a été évaluée *in vivo* dans les modèles *JAK2V617F* et *MPLW515L* et a confirmé l'avantage thérapeutique de l'utilisation des inhibiteurs de HSP90 [166].

D'autres inhibiteurs de HSP90 ont été évalués comme l'AUY922. L'inhibiteur induit la dégradation protéosomale de *JAK2V617F*, ce qui a pour effet de modérer la signalisation de JAK2 (pSTAT5, pAKT et pERK1/2) dans les cellules *JAK2-V617F* humaines et murines et les cellules de patients de types CD34+. L'association avec le TG101209 confirme l'effet synergique de la combinaison et son utilisation a été envisagée dans le but de contourner les résistances génétiques dû à l'emploi des inhibiteurs de JAK2 [167][162].

L'ensemble de ces données a mis en avant l'implication de HSP90 dans les NMP et a suggéré que l'inhibition de HSP90 en combinaison avec l'inhibition de JAK1/2, était une approche thérapeutique intéressante. En revanche, le PU-H71 ainsi que l'AUY922 induisent dans le contexte des NMP l'expression de HSP70 *via* l'activation de HSF1 *in vitro* et *in vivo* [59], [162], [293]. Cette expression compensatoire d'HSPs, déjà connu dans d'autres contextes, est un frein à l'inhibition puisqu'ils peuvent provoquer un échappement et une résistance tumorale.

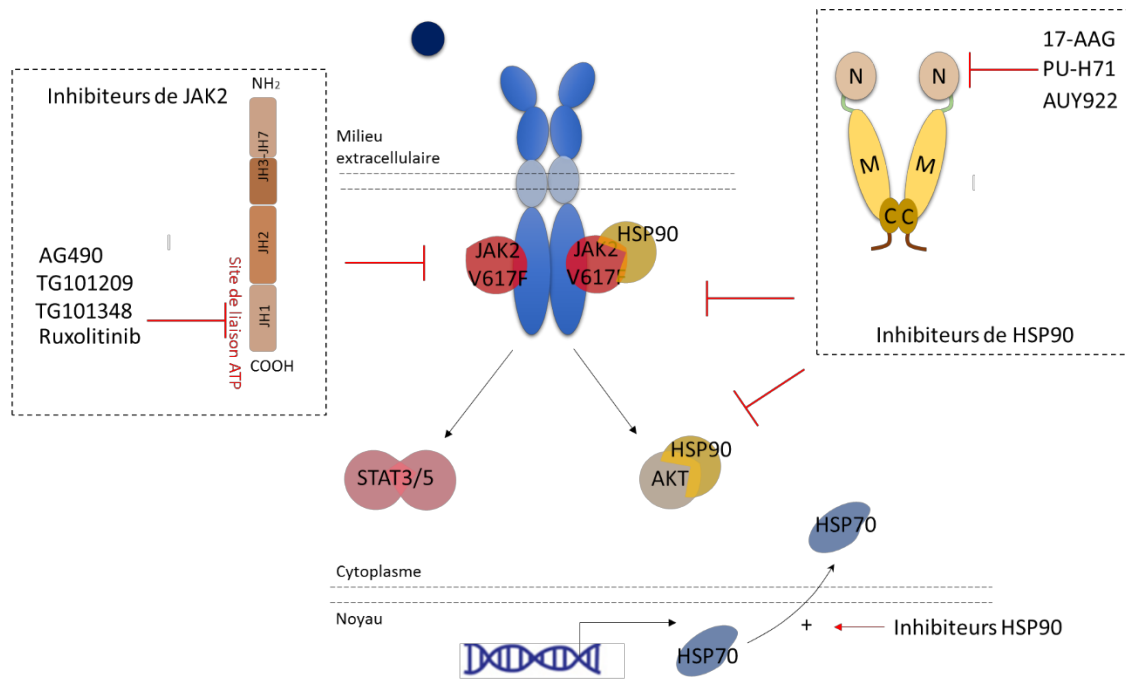


Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'inhibition de HSP90 et JAK2 dans les cellules JAK2 dépendantes

Les principaux inhibiteurs de JAK2 et de HSP90, se fixent au site de liaison de l'ATP qui est localisé dans le domaine JH1 de JAK2 et domaine N terminale de HSP90. L'inhibition de JAK2V617F va permettre d'inhiber les voies constitutivement activées des JAKs et des STATs, et l'inhibition de HSP90 va déstabiliser les protéines clientes du chaperon. En revanche, les inhibiteurs de HSP90 ont l'inconvénient d'induire l'expression compensatoire des HSPs tels que HSP70.

II.2.2. HSP70

L'implication de HSP70 dans les NMP a été mise en évidence par une analyse protéomique de cellules granulocytaires de patients PV et ET mutées pour JAK2 [294].

Dans cette étude, HSP70 était surexprimée dans les cellules granuleuses de patients PV en comparaison avec des patients TE. L'utilisation du KNK437, un inhibiteur connu pour diminuer l'expression HSP70 *via* son effet envers HSF1 [295], a permis d'induire l'apoptose de colonies de cellules érythroïdes de patients PV. Cet effet semble être le résultat de l'inhibition de la signalisation de JAK2 par HSP70, ce qui a été confirmé à l'aide d'un ARN interférant (siRNA) de HSP70. Dans ces lignées *JAK2V617F* humaines et murines, l'inhibition de HSF1 par le KNK437 ou le siRNA spécifique de HSP70, a eu pour effet de réduire la phosphorylation de STAT5 et de JAK2 en accord avec une diminution de l'expression des protéines. Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que HSP70 pourrait être impliqué dans la pathogenèse de la PV et constituer une cible thérapeutique.

Par ailleurs, l'association du ruxolitinib et du KNK437 a montré un effet synergique dans les lignées *JAK2V617F* et les cultures de colonies érythroïdes de patients PV, ce qui renforce l'idée que l'inhibition des HSPs pourrait être une thérapie efficace seul ou en association avec un inhibiteur de la voie JAK/STAT pour les patients atteints de PV [296].

III. MISE EN RELATION DES DONNEES DE LA LITTERATURE ET GENESE DU PROJET DE RECHERCHE SUR HSP27

La MF est une NMP complexe pour laquelle de nombreuses mutations génétiques ont été identifiées comme participant directement ou indirectement au développement de la maladie [8]. Ces nombreuses aberrations génétiques associées à un contexte inflammatoire important à pour impact de déréguler plusieurs voies de signalisation dont la principale est celle de JAK/STAT. Au vue de ces données, de nombreuses cibles thérapeutiques ont été envisagées, sans pour autant qu'aucun traitement expérimental n'ai pu donner de résultats totalement satisfaisant pour les patients.

Actuellement, la recherche d'inhibiteurs est une priorité thérapeutique, et plus particulièrement depuis que les études sur le ruxolitinib - qui est le seul traitement approuvé par la FDA pour ses effets positifs sur les symptômes de la MF- n'ont pas mis en évidence d'effets bénéfiques sur la fréquence allélique ou le cours de la pathologie [158].

De façon intéressante, HSP90 qui est le chaperon moléculaire de JAK2, a été identifié comme étant un acteur de la signalisation JAK2 et représente une cible thérapeutique potentielle [59], [205], [294]. Malheureusement, malgré l'espoir clinique que représentait l'utilisation des inhibiteurs de HSP90, les résultats des études précliniques n'ont pas réellement répondu aux attentes. En effet, l'inhibition de HSP90 seul ou en combinaison avec des inhibiteurs de JAK2 induit des effets toxiques et provoque une augmentation compensatoire d'autres HSPs qui pourrait conduire à des phénomènes de résistance, ce qui pourrait expliquer au moins en partie l'échec thérapeutique.

Outre HSP90 et HSP70, d'autres HSPs possèdent des rôles tout aussi importants dans la différenciation hématopoïétique et dans la résistance des cellules cancéreuses. C'est en

particulier le cas de HSP27, qui est un chaperon moléculaire fortement induit en situation de stress cellulaire et par les cellules cancéreuses [250]. Ce chaperon représente actuellement une cible thérapeutique dans les cancers solides (cancer de la prostate) [297], la fibrose pulmonaire [277] et également dans les LAM [282], [298].

Un inhibiteur spécifique de HSP27, l'OGX-427 est d'ailleurs en cours d'essai clinique pour les cancers de la prostate, pancréas, de la vessie et du poumon (<http://oncogenex.com/apatorsen-ogx-427>) et des études montrent qu'il présente des effets bénéfiques sur le développement de la fibrose pulmonaire [298].

Puisqu'il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour cette pathologie et compte tenu du potentiel de cette petite protéine de stress, nous avons de façon originale, émis l'hypothèse que HSP27 pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique dans les pathologies hématologiques associées à un processus fibrotique comme la MF.

En accord avec notre hypothèse, une activation de la voie de p38MAPK associée à une l'hyperphosphorylation de HSP27 a été observée dans les MK de patients PMF [299].

Nous avons donc cherché à déterminer le rôle de HSP27 dans cette population cellulaire et plus largement dans la MF en évaluant *in vivo* et *in vitro* les effets de l'inhibiteur de HSP27, l'OGX-427 et en mesurant chez les patients MF le niveau intra et extracellulaire de cette HSP.

PROJET DE RECHERCHE

Méthodologie

HSP27 est un chaperon moléculaire connu pour être impliqué dans les LAM et certains types de fibroses pathologiques. La genèse de ce travail a donc été d'examiner la possible implication de HSP27 dans la MF.

Dans ce contexte, mon projet de thèse visait à répondre à trois principales questions :

- **Quel est le niveau d'expression des HSPs et plus particulièrement de HSP27, intra- et extra-cellulaires dans la MF ?**

Nous avons pour cela déterminé l'**expression des HSPs** chez les patients atteints de MF au niveau : (i) des cellules souches circulantes de type **CD34+** (ii) dans le **sérum** des patients (ELISA) (iii) sur les coupes de **moelles osseuses** par immuno-histologie (iii). Nous avons également évalué le taux intracellulaire des HSPs dans des cellules leucémiques humaines mutées pour *JAK2V617F* (HEL92.1.7 et SET-2).

- **HSP27 a-t-elle un lien avec la signalisation JAK-STAT, connue pour être majoritairement dérégulée dans la MF ?**

Nous avons pour cela (i) étudié *in vitro* l'effet de la déplétion de HSP27 par siRNA, shRNA et OGX-427 sur la **prolifération** des cellules leucémiques en comparaison avec des lignées leucémiques non mutées et dans les cellules de patients atteints de MF et (ii) étudié l'**interaction** de HSP27 avec les principaux acteurs de la voie JAK/STAT, *in vitro* (Octet) et *in cellulo* (Co-immunoprécipitation et essai de ligature de proximité).

- **Quels sont les effets de l'utilisation d'un inhibiteur de HSP27 dans le traitement des MF ?**

Nous avons évalué l'effet de l'OGX-427, un oligonucléotide anti-sens spécifique de HSP27, (i) *in vivo*, dans **deux modèles murins** de MF proche de ce qui est observé chez l'homme (Collaboration avec JL. Villeval (IGR Villejuif, France) et R. Skoda (Bâle, Suisse)) et (ii) *in vitro* sur les lignées mutantes *JAK2V617F* en comparaison avec des lignées leucémiques non mutées pour JAK2.

Impact de HSP27 dans la myélofibrose : un nouveau partenaire pour JAK2 et STAT5

Ici seront présentés les méthodes et les résultats obtenus au cours de ma thèse et nous ayant permis de rédiger un article original soumis à « Nature Communications » en avril 2017.

L'article est présenté sous sa forme soumise le 22 juillet 2017 dans les annexes du manuscrit.

I. MATERIELS ET METHODES

Lignées cellulaires

La lignée leucémique érythroïde HEL92.1.7 (ACC-11, DMSZ) et la lignée lymphoblastique K562 (ACC-10, DMSZ) dérivée d'une leucémie myéloïde chronique, ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Dominique Dutscher, France) supplémenté en 10% (vol/vol) de sérum de veau fœtal (SVF). La lignée leucémique mégacaryoblastique SET-2 (ACC-608, DMSZ) issue d'une thrombocytémie essentielle dans du milieu RPMI 1640 supplémenté en 20% (vol/vol) de SVF. Les cellules rénales embryonnaires humaines 293 transformées (293T) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dominique Dutscher, France) supplémenté en 10% (vol/vol) de SVF. Les différentes lignées ont été maintenues dans une étuve à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. L'absence de mycoplasmes dans les cultures cellulaires a été régulièrement vérifiée.

Les lignées HEL92.1.7 et SET-2 ont été caractérisées comme étant homozygote et hétérozygote pour *JAK2V617F* respectivement. La lignée K562 est connue pour exprimer la protéine de fusion bcr-abl caractéristique de la LMC et ne présente pas de mutation de JAK2.

Prélèvements d'origine humaine

Les échantillons de patients (sérum, coupe de biopsie ostéomédullaire et sang de cordon) ont été récoltés au sein de l'Hôpital Universitaire de Dijon (Dijon, France) et de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France). Les patients ont été diagnostiqués à l'aide des critères de l'Organisation Mondiale de la Santé en vigueur au moment du diagnostic. L'étude a été conduite en accord avec la déclaration d'Helsinki et avec le consentement de chaque patient.

Modèles murins de myélofibrose

Le modèle TPO^{high} : le modèle TPO^{high} a été généré à l'animalerie de l'Institut Gustave Roussy et les expérimentations post-transplantations ont été réalisées à l'animalerie centrale de Dijon.

Toutes les procédures ont été réalisées en accord avec les lignes directrices du Ministère de la Recherche et de la Technologie (Paris, France).

Les souris femelles de fond génétique C57BL/6J, provenant de Janvier, Lyon, France, ont été maintenues dans des conditions dépourvues de pathogènes. La nourriture et l'eau ont été fournies *ad libitum*. Afin de générer le modèle de myélofibrose induite par la TPO, les souris âgées de 2-4 mois, ont été irradiées et transplantées par des cellules de moelle osseuse préalablement infectées (MPZTPO), comme précédemment décrit [66]. Un mois après la transplantation, les souris ont été réceptionnées et acclimatées à l'animalerie centrale de Dijon puis randomisées sur la base des paramètres sanguins en deux groupes de 10 souris.

Injections et suivi des animaux

Les souris (10 souris par groupe) ont été traitées par un oligonucléotide anti-sens spécifique du site d'initiation de l'ARN messager de HSP27 (OGX-427, Brevet PCT n°10/605498, 2005, Oncogenex Pharmaceuticals, Washington, Etats-Unis) ou par un oligonucléotide contrôle (CTL, Oncogenex Pharmaceuticals, Washington, Etats-Unis), dilués dans du PBS à la dose de 10 mg/kg en injection intrapéritonéale, 3 fois par semaines pendant une durée de 5 semaines. D'après les données de la littérature, la dose administrée varie entre 10 et 20 mg/kg pendant 5/7 semaines en injection intrapéritonéale dans les modèles murins de xénogreffe de cancer de la vessie, du cou et de la prostate [300]–[302]. L'injection de 20mg/kg ayant montré une toxicité dans le modèle TPO^{high}, la dose de 10mg/kg a été privilégiée pour les modèles murins utilisés.

Le suivi des souris a été réalisé par pesée hebdomadaire et un prélèvement sanguin caudal a été effectué toutes les deux semaines afin de suivre les numérations sanguines tout au long de l'étude. Le prélèvement sanguin a été réalisé à l'aide de tubes EDTA (BD Vacutainer EDTA K2, BD, Le Pont de Claix, France) et la mesure du taux d'hématocrite, de plaquettes et de leucocytes a été déterminée à l'aide d'un automate (Scil Vet abc Plus+, Altorf, France).

Sacrifice et prélèvement des échantillons

Quatre semaines après la dernière injection, les souris ont été prélevées à la queue pour la numération de la formule sanguine finale puis anesthésiées par inhalation d'isoflurane (TEM, Lormont, France). Un prélèvement sanguin intracardiaque sur tube sec a été réalisé afin d'obtenir la quantité nécessaire de sang pour l'étude sérologique. Pour chaque animal, la rate a été prélevée, mesurée, pesée et divisée en deux parties. Une partie a été fixée à l'aide d'une

solution de paraformaldéhyde à 4% pour les études histologiques et l'autre partie broyée et conservée à -20°C pour les études d'immunoempreintes (*Western blot*). Un fémur par animal a été collecté et fixé dans une solution décalcifiante de formol tamponnée au phosphate 4% et inclus en paraffine pour les analyses histologiques.

Le modèle *JAK2V617F* : Les expérimentations sur modèle *JAK2V617F* ont été réalisées à l'animalerie de l'Hôpital Universitaire de Bâle. Toutes les procédures ont été réalisées en accord avec la réglementation fédérale et les ordonnances de protection et d'expérimentations des animaux Suisse. Les expérimentations ont été approuvées par la commission cantonale (Bâle, Suisse).

Les souris femelles de fond génétique C57BL/6, provenant de la société Janvier, ont été maintenues dans des conditions dépourvues de pathogènes. La nourriture et l'eau ont été fournies *ad libitum*. Afin de générer le modèle, les souris âgées de 2 mois, ont été irradiées puis transplantées avec des cellules de la moelle osseuse provenant de souris transgéniques *JAK2V617F* (ScLCre ; FF1 ; GFP+) et de souris sauvage C57BL/6 (*JAK2* WT), au ratio 1 :1, comme il a été précédemment décrit [154].

Six semaines après la transplantation, les souris *JAK2V617F* ont été randomisées en 2 groupes de 5 souris sur la base des paramètres sanguins.

Injections et suivi des animaux

Cinq souris par groupe ont été traitées par l'OGX-427 dilué dans le PBS, à une dose de 10 mg/kg en injection intrapéritonéale, 3 fois par semaines ou par du PBS (véhicule), pendant 10 semaines. Le suivi des souris a été réalisé par une pesée hebdomadaire et un prélèvement caudal toutes les trois semaines. La numération a été effectuée à l'aide d'un automate (ADVIA 120 Hematology Analyser, Bayer, Allemagne).

Sacrifice et prélèvement des échantillons

Deux heures après la dernière injection, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (TEM, Lormont, France). Un prélèvement sanguin, a été réalisé par ponction intracardiaque sur tube sec pour l'étude sérologique. Pour chaque animal, la rate a été prélevée, pesée et scindée en deux parties. Une moitié a été fixée à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde à 4% pour les études histologiques et l'autre broyée. Sur cette deuxième

moitié, une partie des cellules a été marquée pour les analyses de cytométrie en flux et le reste des cellules a été conservée à -20°C pour les études d'immunoempreintes (*Western blot*). Deux fémurs ont été collectés par souris. Le premier a été fixé dans une solution décalcifiante de formol tamponnée au phosphate 4% puis inclus en paraffine pour les analyses histologiques. Le second a été purgé afin de récupérer les cellules médullaires. Une partie des cellules a été marquée pour les analyses de cytométrie en flux et le reste conservé à -20°C.

Transfections transitoires

Électroporation (AMAXA)

Les cellules HEL92.1.7, SET-2 et K562 ont été transfectées à l'aide du système Amaxa (Lonza, Amaxa Inc., Cologne, Allemagne). Cinq millions de cellules ont été repris dans 100 µL de solution V puis incubé avec 13 µg de siRNA ciblant HSP27 (siRNA#1: 122371; siRNA#2: S6991, Ambion) ou par 11 µg d'OGX-427 ou un siRNA contrôle (Negative Control#1, Sigma-Aldrich). Les cellules transfectées avec de l'ADN plasmidique ont été incubées soit avec une combinaison de 4 µg de plasmides pCDNA3.1-HSP27-HA et 6 µg pCDNA3-JAK2V617F (don, Dr Sylvie Hermouet) ou 4 µg pCDNA3.1-HSP27-HA et 6µg pCMV-STAT5A-Myc (HG10035-CM, Sino Biological, Chine).

Les programmes de transfection ont été respectivement : X-005 pour les cellules HEL 92.1.7, X-013 pour cellules SET-2 et T-016 pour les cellules K562. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 48 heures.

Transfections stables par infection rétrovirale

Constructions des plasmides

Pour les expériences d'inactivation stable, la séquence ciblant HSP27 humaine (shRNA-HSP27) a été clonée dans le vecteur d'expression PRRLsin-PGK-eGFP-WPRE (PRRL) contenant un site de restriction de l'enzyme XhoI et une séquence codant pour la protéine fluorescente GFP (don, Dr Isabelle Plo).

Afin d'intégrer la séquence shRNA-HSP27 dans un vecteur d'expression PRRL, deux séquences d'oligonucléotides (OND) ont été modélisées et commandées chez Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne) : une séquence FORWARD (F) et une séquence REVERSE (R).

F	gatcccc(GATCACCATCCCAGTCACCTT)ttcaagaga(AAGGTGACTGGGATGGTGATC)tttttggaaa
R	agcttttccaaaaa(GATCACCATCCCAGTCACCTT)tctcttgaa(AAGGTGACTGGGATGGTGATC)ggg

40 µM d'ODN ont été hybridées dans un tampon d'hybridation (500 mM Acétate de potassium, 150 mM HEPES-KOH (pH 7,4) et 10mM d'acétate de Magnésium) 15 minutes à 37°C.

Un plasmide navette pH1 (don du Dr Isabelle Plo) a été utilisé afin d'y intégrer le produit d'hybridation contenant la séquence shRNA-HSP27. Pour cela, le vecteur a été digéré par les enzymes de restrictions BglIII et HindIII (Promega, Madison). Après l'étape d'hybridation, les OND et le plasmide pH1 (50 ng) ont été ligués de façon enzymatique par la ligase DNA T4 (New England Biolabs, Massachusetts, États-Unis). Le produit de ligation a ensuite été transformé dans les bactéries *E.Coli* compétentes (One shot® TOP10, Invitrogen, France). Une dizaine de colonies individualisées ont été amplifiées et purifiées. L'extraction d'ADN plasmidique a été réalisée à l'aide de mini-colonnes (kit Wizard® Plus SV mini preps DNA Purification system, Promega, Madison) suivant les instructions du fabricant. Les constructions ont été vérifiées par séquençage (Genewiz, Takelays, Royaume Uni).

4µg de plasmide pH1 ayant intégré les ODN hybridées, ont été digérés par digestion enzymatique XhoI (Promega, Madison) afin d'isoler la séquence d'intérêt du shRNA-HSP27. La séquence a ensuite été purifiée sur gel d'agarose 2% et sur colonne (Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up, Promega, Madison).

Le vecteur PRRL a été digéré pour intégrer la séquence d'intérêt. Pour cela, 4 µg de plasmide ont été soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme XhoI (Promega, Madison, États-Unis) puis traité à la phosphatase alcaline (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)). Le vecteur digéré a ensuite été migré sur gel d'agarose 1% et purifié sur colonne (Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up (Promega, Madison)).

Le plasmide PRRL purifié et la séquence d'ADN shRNA-HSP27 ont été ligués par la ligase T4 DNA (New England Biolabs, Massachusetts, États-Unis). Le produit de ligation a été transformé dans les bactéries *E.Coli* ultra-compétentes (XL-10 Gold, Aligent Technologies, Californie, États-Unis). Les

bactéries transformées ont été incubées à 32°C et une dizaine de clones ont été amplifiés et purifiés comme précédemment.

Le vecteur PRRL-shRNA-HSP27 final a été vérifié par séquençage (Genewiz, Takelay, Royaume Uni).

Production de particules virales

Les cellules 293T (2,6 millions) ont été implantée la veille dans une boîte de Pétri de 100 mm de diamètres. A 70% de confluence, les cellules ont été transfectées avec une solution de phosphate de calcium. Brièvement, 15 µg de plasmide PRRL-HSP27, 10 µg de plasmide pCR48 (psPAX2 codant pour les protéines Gag et Pol) et 5 µg de plasmide pCR47 (pMD2.G codant pour la protéine de l'enveloppe et du VSV-G) ont été mélangé à une solution de 62,5 µL de chlorure de calcium (2M). Le complexe ADN/chlorure de calcium a été ensuite déposé goutte à goutte dans 500µL d'une solution saline HeBSS2X (Hepes Buffered Saline solution ; 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 12 mM D-glucose, 20 mM Hepes ; pH 7,2). Le mélange final a été incubé durant 20 minutes à température ambiante, favorisant ainsi la formation de cristaux ADN /phosphate de calcium. La transfection a été effectuée par ajout de ce mélange sur les cellules, lesquelles ont ensuite été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 16 heures. Le lendemain, le milieu de culture a été remplacé par un milieu DMEM dépourvu de SVF et les cellules ont été remises à l'étuve pour 48 heures.

Le milieu conditionné des cellules contenant les particules virales a été récolté et centrifugé 5 minutes à 2000 tours par minutes à 4°C puis purifié par filtration (filtre de 0,45 µM). Afin de concentrer les particules virales, le surnageant purifié a été ultra centrifugé pendant 45 minutes à 20 000 G à 4°C. Les particules virales ayant sédimentées, elles ont été reprises puis concentrées dans une solution de saline de phosphate (PBS) 100 fois. Les aliquotes viraux ont été gardés au -80°C.

Infections virales : Titration et infections cellulaires

Les lignées cellulaires ainsi que les cellules de patients ont été infectées par un concentré viral après détermination du titre infectieux. Pour cela, 500 000 cellules de HEL92.1.7 ont été infectées par des dilutions successives de virus. Quatre-vingt-seize heures post infection, les cellules ont été lavées au PBS et le pourcentage de cellules positives pour la GFP (caractérisant l'efficacité d'infection) a été déterminé par cytométrie en flux (LSRII BD).

Le titre a été calculé à partir des conditions ayant une population positive à la GFP inférieur à 20%.

$$\text{Titre virale} = \frac{\% \text{ cellules GFP positives} \times 500\,000 \text{ (cellules infectées)} \times 1000 \text{ (}\mu\text{l)}}{100 \times \text{volume (}\mu\text{L) de suspension virale ajoutée}}$$

Les cellules ont été infectées par un concentré viral donnant sur cellules HEL92.1.7 une efficacité de transfection > 90%.

Prolifération cellulaire

Les cellules non transfectées (NT) et transfectées (TR) transitoirement (siRNA) ou stablement (shRNA) ont été évaluées pour leur capacité à proliférer par une méthode colorimétrique (XTT, Cell proliferation Kit II, Roche, France). 48 heures suivant la transfection, 100 μL de culture cellulaire ont été prélevés puis déposés en triplicata dans une plaque 96 puits. 50 μL de mélange XTT a été ajouté dans chaque puit comme préconisé par le fabricant. La plaque a été incubée 4 heures à 37°C sous atmosphère contrôlée. La prolifération cellulaire a été évaluée par spectrophotométrie. L'absorbance à 490 nm a été mesurée en comparaison avec une longueur d'onde de référence à 690 nm.

Immunoempreinte (Western blot)

Les extraits protéiques provenant de cellules et de la rate ont été lysés par une solution de lyse ou *modified Laemmly Buffer* (5% Sodium Dodecylsulfate, 10% glycerol, 32,9 mM Tris-HCl pH 6,8 supplémentée en anti-protéases (cOmplete ULTA tablets, Roche) en présence d'anti-phosphatases (PhosStop, Roche) puis chauffés pendant 8 minutes à 98 °C. 30 μg d'extrait protéique ont été déposés sur gel de polyacrylamide de concentration compris entre 8-12% (selon la masse moléculaire de la protéine d'intérêt) après ajout d'un tampon de charge au 1/8 (vol/vol) (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, β -mercapto-éthanol 5%, SDS 2,3%, Glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,01%). Les protéines ont alors été séparées selon leur poids moléculaire sous l'action d'un champ électrique de 80 Volts dans un tampon de migration (glycine 200 mM, SDS 0,01%, Tris 25 mM).

Les protéines ont ensuite été transférées pendant 1 heure et 45 minutes sur une membrane de type PVDF (GE healthcare Europe GmbH, Orsay, France), activée préalablement dans un bain

d'éthanol absolu, à 47 Volts dans un tampon de transfert (Tris 50 mM, acide borique 50 mM). Les membranes ont été saturées pendant 1 heure dans une solution de sérum albumine bovine (SAB) à 5% dans le TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 170mM, Tween-20 0,1%, pH 8) puis incubées dans une solution d'anticorps primaire spécifique sur la nuit à 4°C.

Anticorps utilisés : anti-JAK2 (dilution 1:1000, #3230), anti-phospho-JAK2 (dilution 1:1000, #3771), anti-STAT5 (dilution 1:1000, #9363), anti-phospho-STAT5 (dilution 1:1000, #4322) et anti-c-MYC (dilution 1:1000, #9402) provenaient de chez Cell Signalling technologies; anti-HSP27 (dilution 1:1000, SPA-803 (spécifique de la protéine humaine), SPA801), -HSP70 (dilution 1:1000, SPA-810), -HSP90 (dilution 1:1000, AC88) provenaient de chez Enzo Life Sciences

Après 2 lavages de 15 minutes dans le TBS-T, les membranes ont été incubées 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Etats-Unis) dilué au 1 :10 000 dans une solution de TBS-T ou 30 minutes avec un anticorps anti-actine couplé à la peroxydase diluée au 1 :25 000 dans du TBS-T. Après 3 lavages de 10 minutes au TBS-T, les membranes ont été incubées 1 minute avec un réactif chimioluminescent (Luminata Crescendo, EMD Millipore, Etats-Unis). Le signal a été révélé par imagerie (ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Analyse des interactions protéiques

Interférométrie

L'analyse *in vitro* de l'affinité d'interaction entre nos protéines d'intérêts a été réalisé par la méthode d'interférométrie. Les protéines recombinantes JAK2 (TP320503, Origene), STAT5 alpha (TP305753, Origene) et STAT5 beta (TP309429) ont été testées pour leur capacité à fixer HSP27 immobilisée sur un capteur par la technologie BLI Octet (Octet RED, Forté bio, Dax, France). Cette technologie permet d'analyser l'interférence des ondes lumineuses réfléchies par 2 surfaces : (1) une protéine immobilisée sur un biocapteur et (2) une référence interne. Tout changement du nombre de molécules liées à la protéine immobilisée (sur le biocapteur) provoque un décalage dans le motif de l'interférence qui sera mesuré en temps réel.

La protéine recombinante HSP27 (ADI-ESP-715, Enzo life Sciences) a été dessalée sur colonne de dessalage (élimination des sels et du glycérol pouvant perturber les interactions) par centrifugation (Zeba™ Spin Desalting Columns, 7k MWCO, 0,5 mL, 1189-1195, Fisher Scientific, Etats-Unis) puis reprise à 10 µg/ml dans une solution de PBS. Une étape de biotinylation a été réalisée avec un rapport en biotine/protéine de (3 :1) (EZ-Link NHS-PEG4-Biotin, 1189-1195, Fisher Scientific, Etats-Unis) ce qui permettait la fixation de HSP27 sur le biocapteur. La biotine en excès a été éliminée par une étape de dessalage sur colonne comme précédemment. La protéine recombinante HSP27 biotinylée, a été immobilisée sur le biocapteur saturé en streptavidine grâce à l'interaction streptavidine/biotine de forte affinité (10^{15} M). Les mesures d'association et de dissociation de HSP27 avec les protéines recombinantes JAK2, STAT5 α/β et le contrôle négatif (le domaine RING de la protéine CBP, protéine recombinante produite par le Dr Rodrigues-Lima) ou positif (la protéine alphaB-cristalline, ADI-SPP-228, Enzo-Life Sciences, Villeurbanne, France) ont été analysées à 26°C sur une durée de 600s.

Co-Immunoprécipitation

Vingt-quatre heures suivant la transfection, les cellules HEL92.1.7 ont été lavées par une solution de PBS à température ambiante et sevrée en sérum pendant 16 heures. Les cellules ont ensuite été stimulées 10 minutes par 10% de SVF ou d'érythropoïétine (10 ou 50 unités par ml) à 37°C sous atmosphère contrôlée. La réaction a été arrêtée par deux lavages en PBS froid. Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon de lyse (50 mM d'Hepes (pH8), 150 mM de NaCl, 5 mM d'EDTA, 0.1% de Triton X-100, 10% de Glycérol, 0,25 mM de DTT, 10 mM NaVO₄, 10 mM de NaF) contenant des inhibiteurs de protéases. Les lysats cellulaires ont été soumis à un « pré-clearing » 1 heure à 4°C sur roue, avec 45 µL de billes de protéine G (Protein G UltraLink Resin beads, Pierce) préalable. Après centrifugation, les billes ont été éliminées par centrifugation et les lysats dosés.

2 µg d'anticorps anti-HSP27 (SPA-800, Enzo-Life Sciences, Villeurbanne, France) ou d'anticorps non relevant IgG de souris (I5381, Sigma-Aldrich) par point ont été incubés 1 heure à température ambiante avec 50µL de billes de protéines G.

Les lysats cellulaires (800 µg) ont été ajoutés aux billes saturées par l'anticorps et le volume ajusté à 500 µL final par le tampon de lyse. Les échantillons ont ensuite été placés 3 heures sur

roue à 4°C permettant ainsi aux complexes protéiques contenant HSP27 de se fixer aux billes. Les immunoprécipitats ont été lavés 4 fois par la solution de tampon de lyse puis repris dans 45 µL de tampon de charge (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, β-mercapto-éthanol 5%, SDS 2,3%, Glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,01%). Les protéines éluées ont été dénaturées à 95°C pendant 8 minutes. Après une centrifugation de 5 minutes à 5 000 g, les échantillons ont été déposés sur gel d'acrylamide. Les protéines ont été séparées selon leurs poids moléculaires sous l'action d'un champ électrique (Western Blot). Les protéines formant un complexe avec HSP27 ont ainsi pu être révélées par chimiluminescence.

Essai de ligature de proximité (PLA, Proximity ligation assay)

1 millions de cellules HEL 92.1.7 transfectées en présence des siRNAs (siRNA#1 ou siRNA contrôle) ou NT, ont été lavées au PBS puis fixées par une solution de paraformaldéhyde à 4%, 48 heures après la transfection. L'agent de fixation a été éliminé par un lavage au TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 170mM). Après centrifugation à 300g pendant 5 minutes, les cellules ont été perméabilisées par une solution de méthanol froid pendant 10 minutes à -20°C puis saturées 30 minutes par une solution de T-BST contenant 3% de SAB. Les cellules ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C par 250 µL d'une solution d'anticorps primaires dilués dans le TBS-T contenant 3 % de SAB et 10 % de sérum de singe.

Anticorps utilisés : anticorps anti-HSP27 de souris (dilution 1 :100, SPA-800, Enzo-Life Sciences), anti-JAK2 de lapin (dilution 1 :100, #3230, Cell signalling technologies), anti-STAT5 de souris (dilution 1 :100,610191, BD Transduction Laboratories) et anti-STAT5 de lapin (dilution 1 :100, #9363, Cell signalling technologies). Les combinaisons d'anticorps suivantes ont été réalisées : HSP27 de souris / JAK2 de lapin, HSP27 de souris / STAT5 de lapin, STAT5 de souris / JAK2 de lapin.

Le lendemain, les cellules ont été lavées dans une solution de TBS-T puis incubées 1 heure à 37°C dans 100 µL de la solution d'anticorps secondaires de lapin et de souris couplés aux amorces d'oligonucléotides (également nommé amorces PLA MINUS (lapin) et PLA PLUS (souris) (O'link Biosciences, Uppsala, Suède)). La solution d'amorces (20 µL chacun) a été préparée 30 minutes à l'avance dans une solution de TBS-T contenant 3% de SAB et 10% de

sérum de singe à température ambiante. L'excès d'amorces a été éliminé par un lavage au TBS-T suivi d'une centrifugation à 300g pendant 5 minutes.

Les cellules ont ensuite été incubées avec 100 µL de tampon d'amplification, contenant 2,5µL de ligase et 20µL de tampon de ligase (Duolink® In Situ Detection Reagents Orange, Sigma) diluée dans de l'eau ultra-pure. L'étape de ligation à 37°C pendant 30 minutes, a permis aux oligonucléotides MINUS et PLUS, de s'hybrider pour former une structure circulaire. Les structures circulaires ne sont formées que si les amorces sont à proximité l'une de l'autre (< 40nm).

Après une étape de lavage en TBS-T, les cellules ont été placées dans 100 µL de tampon d'amplification contenant 1,25 µL de polymérase et 20µL de tampon d'amplification (Duolink® In Situ Detection Reagents Orange, Sigma) diluée comme précédemment. L'étape d'amplification à 37°C pendant 2 heures et 10 minutes à l'abri de la lumière, va permettre d'amplifier les molécules circulaires par un simple et fiable mécanisme d'amplification par cercle roulant. Après un lavage final dans le tampon de lavage B, les cellules ont été reprises dans 100 µL d'eau ultra-pure et déposées sur lamelles préalablement enduites de poly-L-Lysine. Les lamelles ont été montées sur un milieu contenant du 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Prolong diamond, Life Technologies) afin de marquer les noyaux.

Les lames ont été ensuite observées au microscope à fluorescence. La fluorescence rouge (spot) observée à la longueur d'onde X a permis de marquer l'interaction entre deux protéines (Axio imager 2, Zeiss, France). Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel ICY afin de quantifier le nombre de spots par cellule.

Cytométrie en flux

Les cellules mononuclées (CMN) du sang périphérique et du sang de cordon ont été isolées par gradient de Ficoll (Lymphoprep, Life technologies, Courtaboeuf, France). L'anneau cellulaire à l'interface entre le plasma et le Ficoll a été récupéré puis lavé 3 fois en PBS.

Les CMN (1 millions par point) ont été immunomarquées à l'aide d'anticorps anti-CD34-PE-Cy7 (#348811, BD Biosciences) et anti-CD45-APC (#555485, BD Biosciences) dans un tampon commercial (Stain Buffer, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) pendant 45 minutes à température ambiante. Les CMN ont été culotées et lavées 2 fois dans du PBS avant d'être fixées 15 minutes avec 1ml de solution de fixation commerciale (CytoFix, BD Biosciences, Le

Pont de Claix, France). Après deux lavages consécutifs au Stain Buffer, les cellules ont été perméabilisées dans 1 mL de solution commerciale de perméabilisation (Perm/wash, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) puis culotées.

Les immunomarquages des HSPs ont été réalisés dans le tampon de perméabilisation pendant 30 minutes à température ambiante.

Anticorps utilisés : anticorps anti-HSP27-FITC (dilution 1:200, SPA-800FI), anti-HSP70-FITC (dilution 1 :100, SPA-810FI), anti-HSP90-Alexa488 (dilution 1 :10, SPA-830-488) et anti-IgG-FITC mouse (dilution 1 :100, #553456, BD Biosciences)

Les cellules ont été lavées deux fois dans le tampon de perméabilisation et le Stain Buffer avant d'être repris dans 300µL de PBS. Les marquages ont été analysés par cytométrie en flux (LSRII, Becton Dickinson). La population de cellules souches a été fenêtrée en CD45^{faibles} et CD34⁺ et les médianes d'intensités de fluorescences des HSPs intracellulaires et ont été évaluées sur cette population.

Concernant les prélèvements de souris *JAK2V617F*, les cellules de moelle osseuses et de rate ont été marquées et analysées par cytométrie en flux comme décrit précédemment [papier Lucia].

Quantification sérique des HSPs

Le dosage des HSPs sériques a été réalisé à partir du sérum isolé par centrifugation à 2 500 g pendant 15 minutes à 20°C. Les prélèvements de sang périphérique utilisés ont été récoltés sur tube sec (tube sec à bouchon rouge pour les prélèvements cliniques et tube de 1,5 ml chez la souris). HSP27 étant connu pour être instable dans le plasma [303], le sérum a été privilégié au plasma pour les analyses et conservé à -80°C avant d'être utilisé.

Préalablement à la quantification, les sérums ont été dilués dans le PBS; 1:50 pour HSP90α, 1 :4 pour HSP70, 1 :2 pour HSP27. Les taux des HSPs ont été évalués par les kits ELISA commerciaux (Pour les HSPs humaines : ADI-EKS-715, ADI-EKS-895-ADI-EKS-500 (Enzo-Life Sciences) et pour HSP25 chez la souris : SEA693Mu, (Cloud Clone Corp) suivant les recommandations du fabricant.

Immunohistochimie

Les coupes blanches de biopsies ostéomédullaires de patients ont été fournies par le service anatomopathologie de l'Hôpital Universitaire de Dijon. Les coupes ont été déparaffinées et réhydratées par des bains successifs de xylène et d'éthanol. Après avoir été rincés à l'eau courante et au PBS, les tissus ont été démasqués dans un tampon citrate pH 6,0 et incubés avec une solution d'anticorps primaires pendant 1 heure à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C.

Les anticorps utilisés : anticorps anti-HSP27 (dilution 1 :50, ab5579, Abcam), anti-HSP70 (dilution 1 :250, ab47455, Abcam) et anti-HSP90 α (dilution 1 :500, ab59459, Abcam).

La révélation des lames a été réalisée par le système de détection de polymère Novolink permettant la visualisation des anticorps primaires de souris ou de lapin (Leica Biosystems, France). Les coupes ont été contre colorées à l'hématoxyline puis déshydratée et montées sur lame. Les photographies ont été prises sur la station Cell Observer (Zeiss).

Les coupes de fémurs et de rates de souris ont été colorées à l'hématoxyline éosine afin d'étudier la composition cellulaire médullaire et spléniques. Les analyses morphologiques ont été réalisées en aveugle par un anatomopathologiste.

Analyses statistiques

Les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées en utilisant le logiciel Graph Pad Prism (San Diego, Etats Unis). Une différence significative entre deux groupes, a été évaluées par les tests paramétriques t –test (avec correction de Welch's pour l'analyse des CD34⁺ ; CD45^{faible} ; de patients) ou non paramétriques Mann-Whitney en fonction de la distribution des échantillons testés.

II. RESULTATS

II.1. Le traitement avec un inhibiteur de HSP27 impacte la progression de la myélofibrose dans le modèle murin TPO^{high}

Afin d'étudier le rôle de HSP27 dans la myélofibrose, nous avons analysé l'effet d'un oligonucléotide anti-sens de seconde génération inhibiteur spécifique de HSP27 (OGX-427), dans un modèle murin de myélofibrose induite par la TPO (modèle murin TPO^{high}).

Le modèle de souris TPO^{high} présente des caractéristiques communes avec la MF observée chez l'homme telles qu'une hyperplasie mégacaryocytaire, une fibrose médullaire, une splénomégalie et une hématopoïèse extramédullaire [66].

Le traitement des souris TPO^{high} par un inhibiteur de la traduction de HSP27, nous a ainsi permis d'évaluer les effets de la déplétion protéique en HSP27 sur la physiopathologie de la myélofibrose *in vivo*.

II.1.1. HSP27 est surexprimée dans le sérum des souris TPO^{high}

Dans un premier temps, la concentration sérique de HSP27 a été évaluée chez des souris TPO^{high} ayant des symptômes avancés de la MF (13 semaines suivant la greffe) en comparaison avec des souris sauvages C56BL/6J, de même âge et de même sexe (WT) par ELISA. Nous avons observé une augmentation significative ($p=0,0229$) de la concentration extracellulaire de HSP27 chez les souris développant une MF (10,09 ng/mL, $n=9$) en comparaison avec des souris WT (0,33 ng/mL, $n=10$). Ces résultats nous confortant quant à l'implication de HSP27 dans la pathologie, l'étude de l'efficacité d'un inhibiteur de HSP27 a donc été poursuivie *in vivo*.

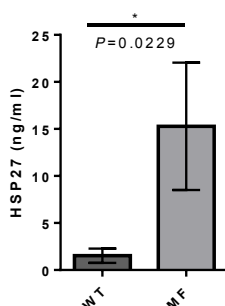


Figure 16 : HSP27 est surexprimée dans le sérum des souris TPO^{high}

Quantification de HSP27 extracellulaire en ng/ml dans le sérum de souris C57BL/6J WT ($n=10$) et TPO^{high} ($n=9$) mesurée par la méthode ELISA après 13 semaines de transplantation. Moyenne \pm SEM, * $p \leq 0,05$.

II.1.2. La progression de la myélobiose a été limitée par la déplétion de HSP27

Les effets de la déplétion de HSP27 par OGX-427 ont été évalués sur la physiopathologie de la MF dans le modèle murin TPO^{high}. Pour générer ce modèle, des cellules de moelle osseuse infectées par un rétrovirus codant pour le gène de la TPO (induisant une sécrétion accrue de TPO) ont été transplantées chez des souris receveuses préalablement irradiées. Un mois après la transplantation les souris TPO^{high} ont été traitées 3 fois par semaine à la dose de 10 mg/kg par l'OGX-427 ou par un oligonucléotide contrôle (CTL) pendant 1 mois (Figure 17).

Nous avons suivi l'évolution des paramètres sanguins des souris traitées ou non avec l'inhibiteur de HSP27 tout au long de l'étude et une analyse post-mortem a été réalisée sur les fémurs et la rate.

Une étude rétrospective de la mortalité a également été menée à partir de la première injection jusqu'à l'euthanasie des animaux (13 semaines post greffe).

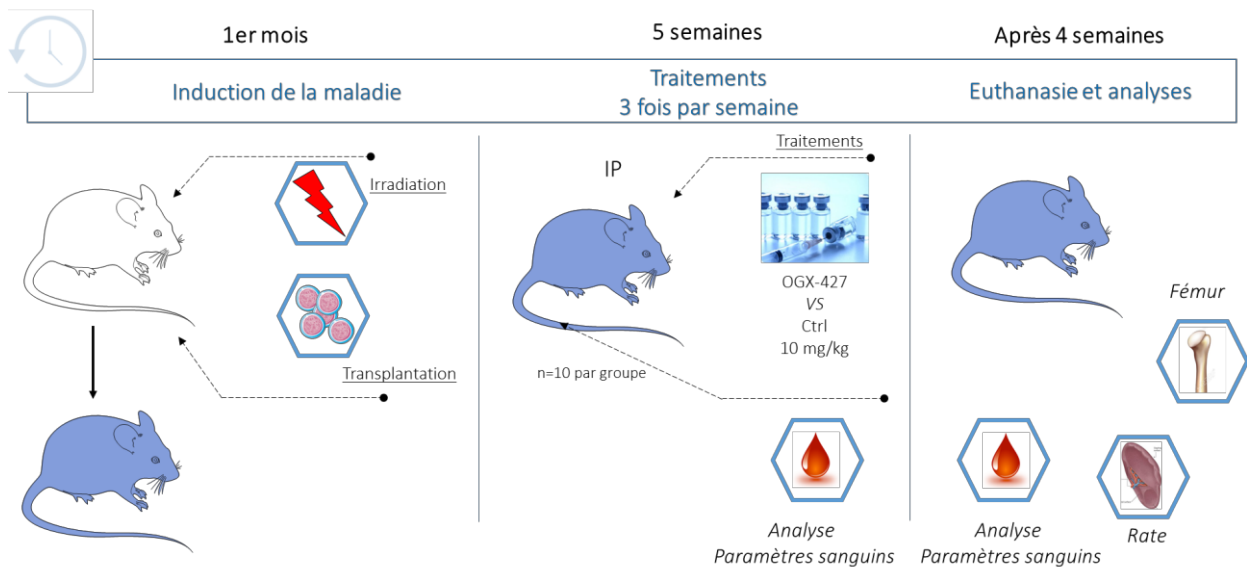


Figure 17 : Stratégie in vivo de l'inhibition de HSP27 par l'OGX-427 dans le modèle TPO^{high}

1 mois après avoir été transplantées, les souris TPO^{high} ont été traitées 3 fois par semaines par l'OGX-427 ou l'oligonucléotide contrôle à la dose de 10mg/kg pendant 5 semaines puis euthanasiées 4 semaines après la dernière injection.

II.1.3. L'OGX-427 ne présente pas de toxicité aux doses utilisées

Les résultats des paramètres sanguins ne mettaient pas en évidence de différence significative entre les deux groupes (**Figure 18**), montrant que l'inhibiteur à la dose et à la fréquence utilisées (10 mg/kg, 3 fois par semaine) n'induisait pas de toxicité dans le modèle TPO^{high}.

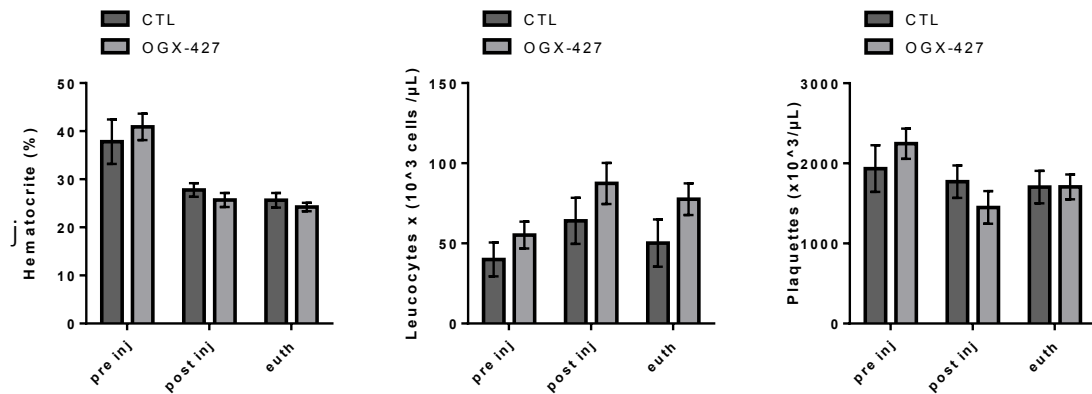


Figure 18 : L'OGX-427 n'induit pas de modification des paramètres sanguins chez les souris TPO^{high}

Numération sanguine (hématocrite, leucocytes et plaquettes) avant et après traitements par l'OGX-427 (n=9) ou l'oligonucléotide contrôle (CTL) (n=9) ainsi que le jour de l'euthanasie. Moyenne \pm SEM.

II.1.4. L'OGX-427 : effets significatifs sur la rate et la moelle osseuse

Nous avons observé une diminution significative de 65% du niveau protéique de HSP27 ($p=0,0399$) dans les cellules spléniques des souris traitées à l'OGX-427 par rapport aux cellules spléniques des souris ayant reçu le traitement contrôle (CTL) et ce 1 mois après l'arrêt des traitements (**Figure 19A**).

La diminution de la splénomégalie étant un des critères majeurs de l'efficacité thérapeutique pour la MF, nous avons cherché à déterminer si l'OGX-427 pouvait influencer ce paramètre. Les résultats ont montré une diminution significative du poids (environ 30%) et de la taille de la rate chez les animaux traités par l'OGX-427 comparativement aux animaux CTL.

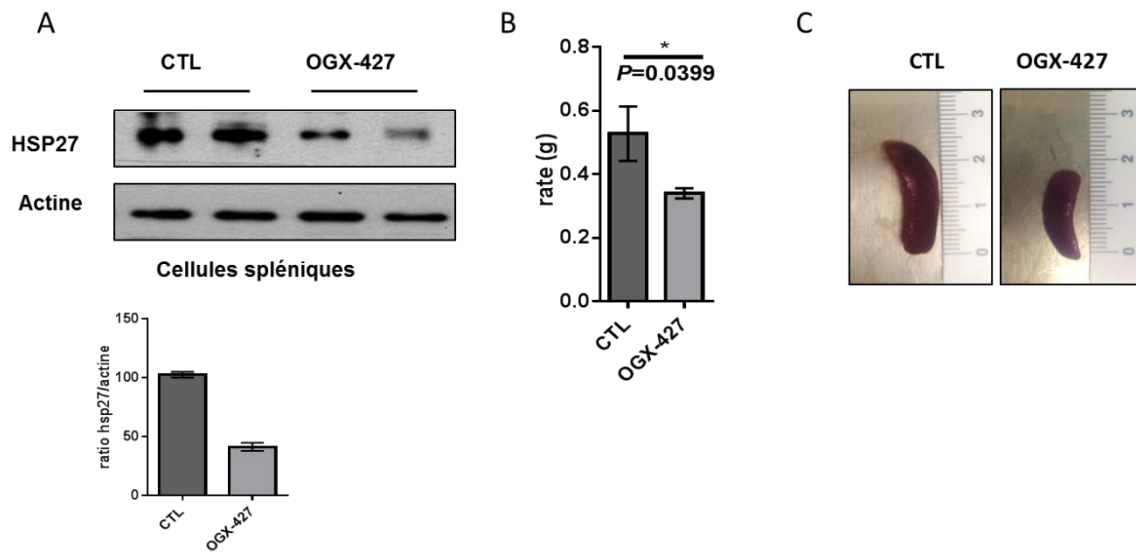


Figure 19 : L'OGX-427 diminue significativement le poids et la taille de la rate chez les souris TPO^{high}

(A) Panel du haut : Analyse par western blot de l'expression de HSP27 dans les splénocytes (lysat total) des souris traitées avec un oligonucléotide contrôlé (CTL) ou l'OGX-427. L'actine a servi de contrôle de charge. **Panel du bas** : Histogramme de quantification du western blot relatif à la quantité d'actine (n=2 par groupe). **(B)** Evaluation du poids de la rate pour chaque souris (n=9 par groupe), Moyenne \pm SEM, $* \leq p=0.05$. **(C)** Images représentatives de la taille des rates des souris traitées par CTL ou OGX-427.

Compte tenu de la diminution de la splénomégalie observée, nous avons étudié le microenvironnement splénique. Pour cela, une étude anatomopathologique des coupes de rates préalablement colorées à l'hématoxyline éosine a été menée en aveugle. Nous avons comparé les caractéristiques de l'hyperplasie splénique des souris TPO^{high} traitées par l'oligonucléotide CTL ou par l'OGX-427.

Les résultats ont montré que 60% des souris TPO^{high} traitées par le CTL présentaient une hématopoïèse de haut grade (grade B) contre seulement 22% des souris TPO^{high} traitées par l'OGX-427. Nous avons également noté une restauration partielle des foyers de la pulpe blanche chez les animaux traités par l'OGX-427 (**Figure 20**).

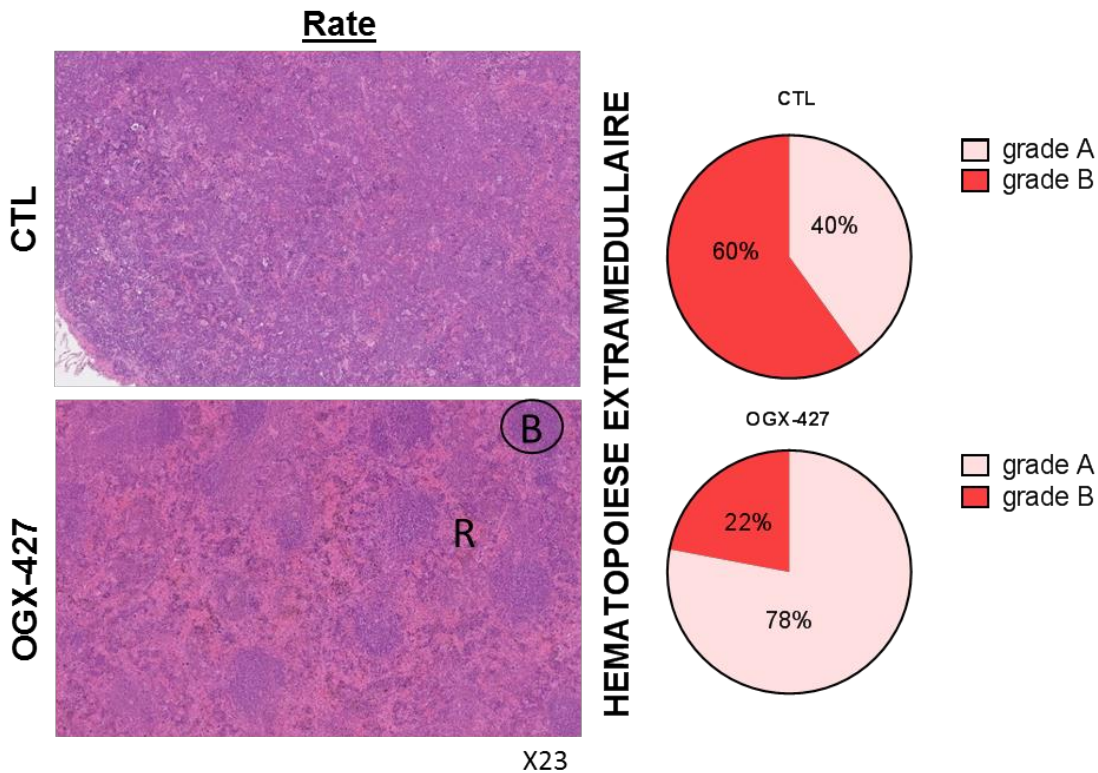


Figure 20 : L'OGX-427 diminue l'hématopoïèse extramédullaire dans la rate des souris TPO^{high}

Panel de gauche : Coupe de rate de souris TPO^{high} montrant une hyperplasie de la pulpe rouge (R) prononcée pour les souris traitées par le CTL et une restauration partielle des foyers de la pulpe blanche (B) des souris traitées à l'OGX-427. Coloration à l'hématoxyline et éosine. Les images ont été obtenues par scanner (Nanozoomer ; X23). **Panel de droite :** Evaluation par grade de l'hématopoïèse extramédullaire (HEM) des 18 animaux euthanasiés. Les diagrammes représentant le pourcentage d'animaux, en rose ayant un grade A (HEM avec invasion diffuse) et en rouge ayant un grade B (HEM avec invasion diffuse et atrophie de la pulpe blanche).

Afin d'étudier l'effet de l'OGX-427 sur hyperplasie médullaire ainsi que sur la fibrose, les coupes ostéomédullaires des souris TPO^{high} ont été colorées à l'hématoxyline éosine et par d'autres colorations histologiques telles que le trichome de Masson pour le visualiser les fibres de collagène et la coloration de Gordon et Sweet pour visualiser les fibres de réticuline. Les lames ont été analysées en aveugle comme précédemment.

Dans le modèle TPO^{high}, nous n'avons pas observé de modifications de la quantité de fibres de collagène et de réticuline (résultats non montrés), ce qui suggérait que le traitement par l'OGX-427 n'avait pas modifié la fibrose médullaire dans ce modèle murin de MF. En revanche et ce de façon très intéressante, nous avons observé une modification de la cellularité médullaire et en particulier des cellules érythroïdes et mégacaryocytaires.

Concernant l'hypoplasie érythrocytaire classiquement observée chez les animaux TPO^{high}, celle-ci était très prononcée dans 45% des souris CTL alors que bien moins marquée chez les animaux traités par l'OGX-427 (Figure 21).

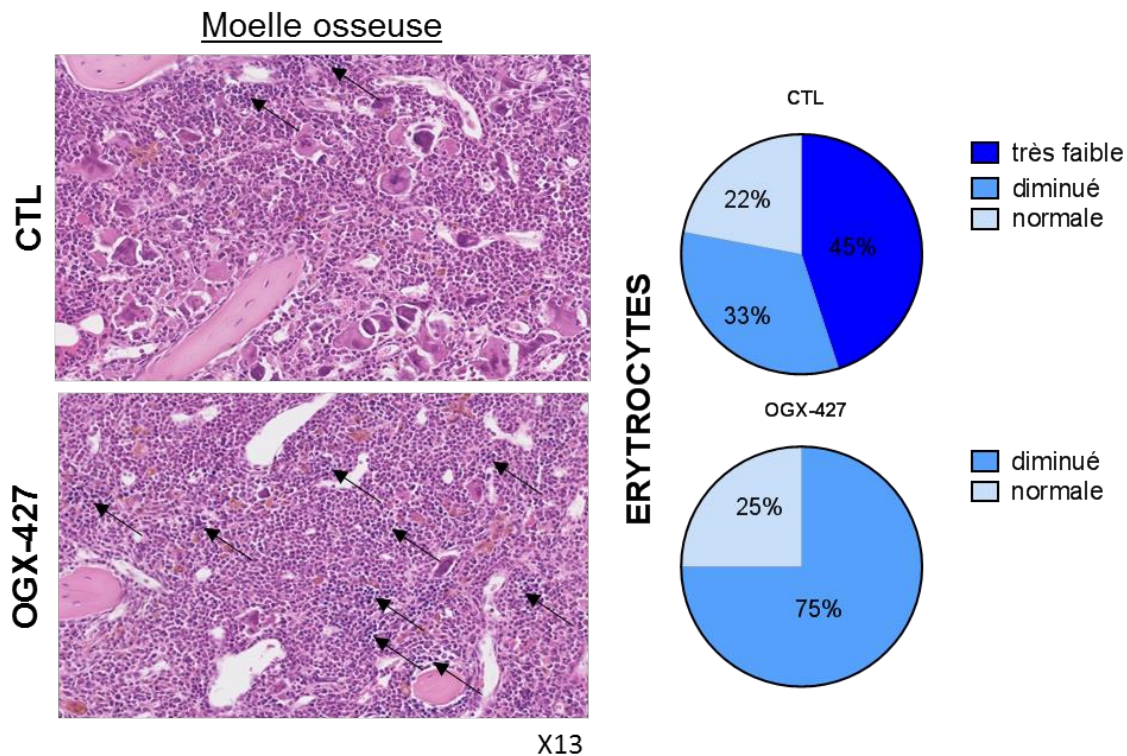


Figure 21 : L'OGX-427 limite l'hypoplasie érythrocytaire dans la moelle osseuse des souris TPO^{high}

Panel de gauche : Coupe ostéoméduillaire de souris TPO^{high} montrant une restauration partielle du nombre d'érythrocytes chez les souris traitées à l'OGX-427 en comparaison avec les souris traitées par le CTL. Coloration à l'hématoxyline et éosine. Les images ont été obtenues par scanner (Nanozoomer ; X13). **Panel de droite :** Evaluation par grade du nombre d'érythrocytes des 18 animaux euthanasiés. Les diagrammes représentant le pourcentage d'animaux, ayant un nombre d'érythrocytes dans la moelle très faible (bleu foncé), diminué (bleu) ou normal (bleu clair).

Concernant l'hyperplasie mégacaryocytaire, elle a été observée chez 89% des animaux traités par le CTL, contre 37% chez les animaux traités par l'OGX-427 (Figure 22). Nos résultats suggèrent que la déplétion de HSP27 par l'OGX-427 ait pour effet une diminution de l'hyperplasie mégacaryocytaire.

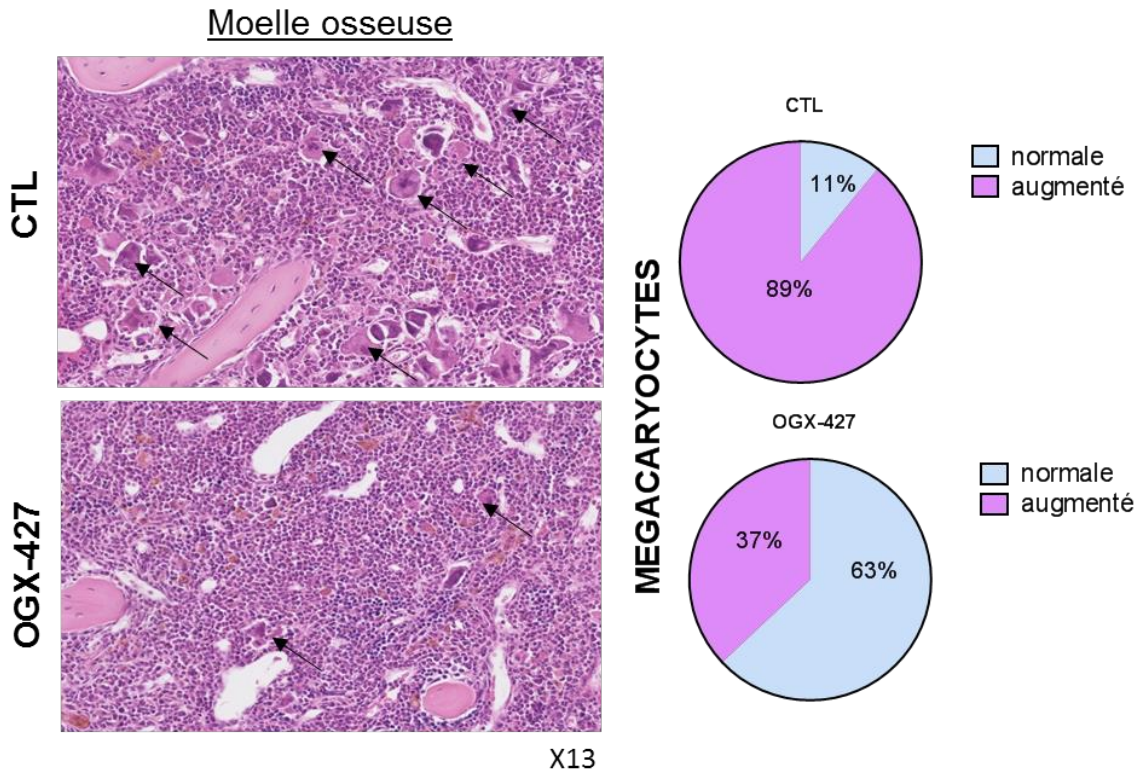


Figure 22 : L'OGX-427 diminue l'hyperplasie mégacaryocytaire dans la moelle osseuse des souris TPO^{high}
Panel de gauche : Coupe ostéomédullaire de souris TPO^{high} montrant une restauration partielle du nombre de mégacaryocytes chez les souris traitées à l'OGX-427 en comparaison avec les souris traitées par le CTL. Coloration à l'hématoxyline et éosine. Les images ont été obtenues par scanner (Nanozoomer ; X13). **Panel de droite :** Evaluation par grade du nombre de mégacaryocytes des 18 animaux euthanasiés. Les diagrammes représentant le pourcentage d'animaux, ayant un nombre de mégacaryocytes dans la moelle normale (bleu clair) et normal (rose).

II.1.5. L'OGX427 semble favoriser la survie des animaux TPO^{high}

L'étude des courbes de survie au cours de l'expérimentation animale nous a permis de définir une tendance en faveur du traitement par l'OGX-427 (**Figure 23**). En revanche, dans les temps impartis, nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux courbes de survie par le test du logrank ($p = 0,32$).

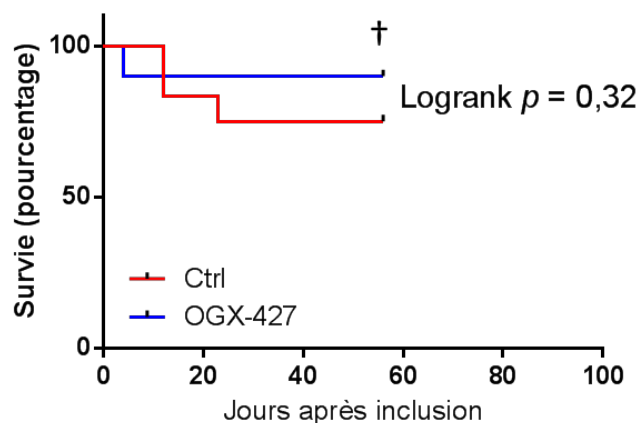


Figure 23 : Le traitement à l'OGX semble stabiliser la mortalité des souris TPO^{high}

Courbe de survie estimée avec la méthode de Kaplan-Meier pour les souris traitées par OGX-427 (n=9) ou l'oligonucléotide contrôle (CTL) (n=9). Le test de logrank a été utilisé pour comparer les deux traitements ($p=0,32$). † Le symbole représentant le jour de l'euthanasie des souris (J56).

II.2. Le modèle murin *JAK2V617F* confirme l'implication de HSP27 dans la physiopathologie de la myélofibrose

En vue d'étudier les étapes de mise en place de la MF et de valider les effets obtenus dans le modèle TPO^{high}, nous avons mené une étude en collaboration avec l'équipe du Pr Radek Skoda (Bale, Suisse) sur un modèle murin de NMP (*JAK2V617F*).

Contrairement au modèle précédent, les souris développent un phénotype de PV, qui après 10 semaines de transplantation, se transforme progressivement en une MF ayant des caractéristiques communes à celle développée chez l'homme (**Figure 24**)[154].

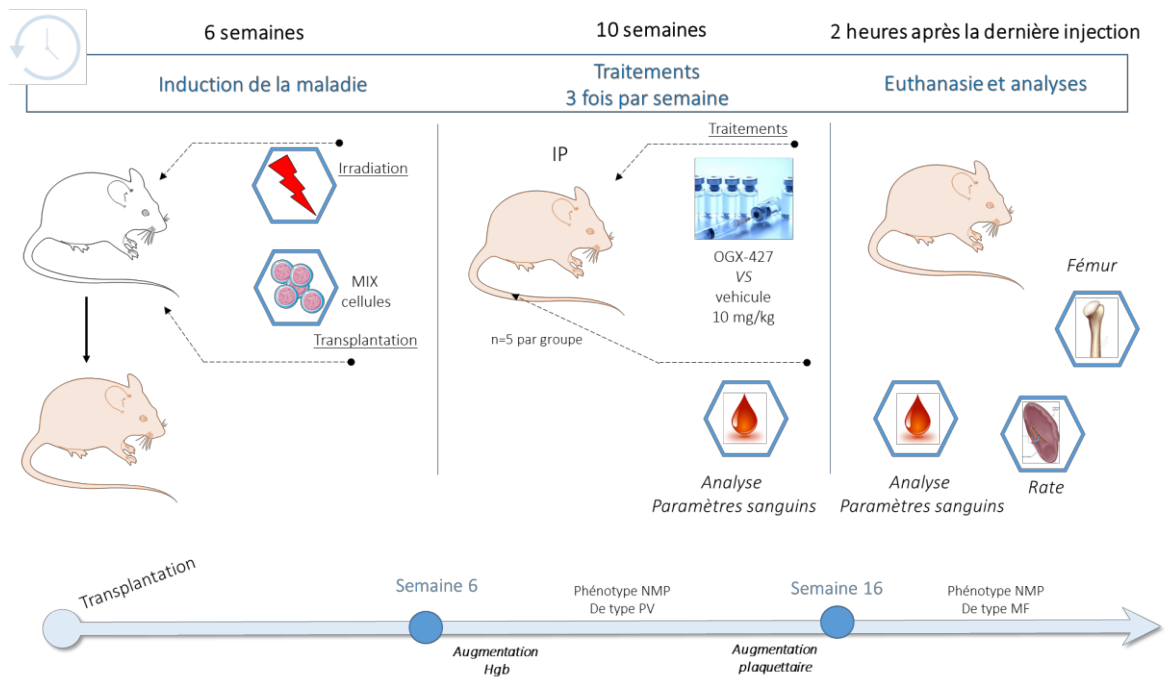


Figure 24 : Stratégie *in vivo* de l'inhibition de HSP27 par l'OGX-427 dans le modèle *JAK2V617F*

Les souris C57BL/6 ont été transplantées par des cellules de moelle osseuse au ratio 1 :1 provenant de souris transgéniques *JAK2V617F* (ScLCre ; FF1 ; GFP) et C57BL/6 sauvage (*JAK2 WT*).

6 semaines après avoir été transplantées, les souris *JAK2V617F* ont été traitées 3 fois par semaines par l'OGX-427 ou le véhicule à la dose de 10mg/kg pendant 10 semaines puis euthanasiées 2 heures après la dernière injection

En accord avec les résultats précédemment obtenus, nous avons observé une diminution significative du poids de la rate ainsi qu'une tendance à la baisse du nombre de progéniteurs mégacaryocytaires (analysé par cytométrie en flux) dans la rate et dans la moelle osseuse des souris *JAK2V617F* traitées par l'OGX-427 à 16 semaines après la greffe, période où la MF commence à s'installer.

Contrairement à ce qui avait été relevé dans le premier modèle, nous avons pu observer une diminution significative du nombre de plaquettes dans le sang périphérique chez les animaux traités à l'OGX-427 en comparaison avec les animaux contrôles. Il semblerait que la numération leucocytaire suit également la même tendance (**Figure 25**).

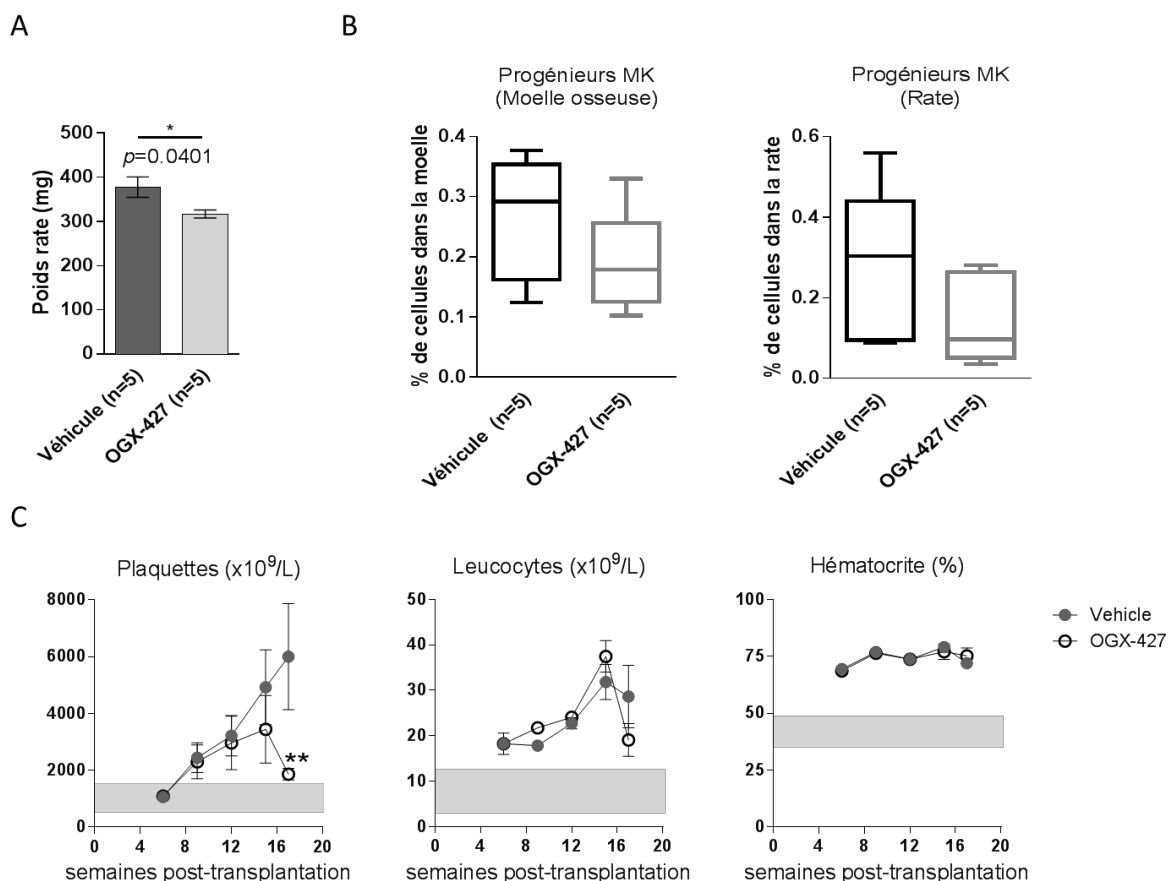


Figure 25 : L'OGX-427 normalise le taux plaquettaire et diminue le poids de la rate de souris *JAK2V617F*
(A) Evaluation du poids de la rate pour chaque souris (n=5 par groupe), Moyenne \pm SEM, * $\leq p=0.05$ **(B)** Evaluation par cytométrie en flux du nombre de progéniteurs des mégacaryocytes par rapport à la population totale dans la moelle osseuse et la rate des souris traitées par le véhicule (PBS) ou par l'OGX-427 (n=5 par groupe). **(C)** Numérations sanguines des souris *JAK2V617F* traitées par OGX-427 et le véhicule, trois fois par semaines, de la sixième semaine suivant la greffe jusqu'à la fin de l'expérimentation. Moyenne \pm SEM, ** $\leq p=0.01$.

II.3. L'OGX-427 n'induit pas d'effet compensatoire *in vivo*

HSP90 étant connu pour être un chaperon de JAK2, des études ont été menées afin d'étudier le potentiel thérapeutique de ses inhibiteurs dans les pathologies impliquant JAK2 [59], [292], [293]. Concernant les syndromes myéloprolifératifs, des inhibiteurs de HSP90 ont franchi les premières phases d'essai clinique pour les NMP, et ce malgré l'induction compensatoire d'autres HSPs, probablement dû à une importante toxicité [304].

Au vu des résultats encourageants que nous avons observés *in vivo*, nous avons cherché à savoir s'il existait un effet compensatoire avec induction des autres HSPs sous l'effet du traitement à l'OGX-427.

L'effet de la déplétion de HSP27 sur les niveaux protéiques de HSP70 et HSP90 a été déterminé par *western blot* dans les cellules spléniques des souris TPO^{high} traitées par l'OGX-427 ou l'oligonucléotide CTL, ainsi que dans des lignées leucémiques positives (HEL92.1.7 et SET-2) ou négatives (K562) pour la mutation *JAK2V617F*.

Nos résultats montrent que les niveaux des HSPs, HSP70 et HSP90, exprimés dans les différentes lignées cellulaires ainsi que dans les cellules primaires de souris, n'ont pas été affectés par l'OGX-427 comparativement au CTL, alors que la déplétion de HSP27 a été effective (**Figure 26**).

Nos résultats, en accord avec la littérature [301], ont confirmé que la déplétion de HSP27 qui n'active pas HSF1, n'induit pas les autres HSPs.

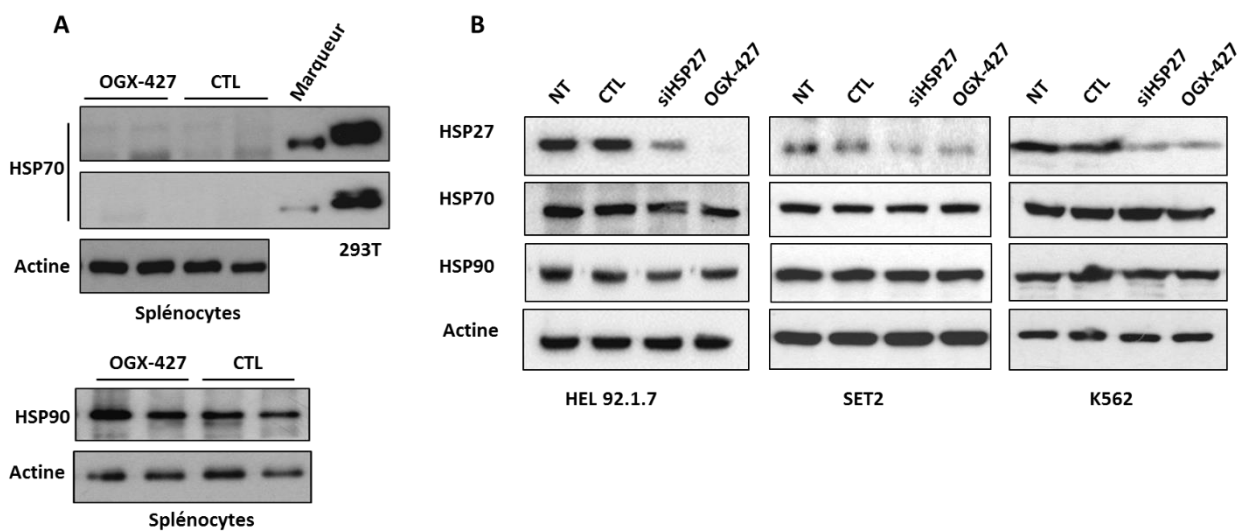


Figure 26 : L'OGX-427 n'induit pas d'expression compensatoire de HSP70 ni de HSP90

(A) Analyse par western blot de l'expression de HSP70 et HSP90 dans les splénocytes (lysats totaux) des souris traitées par l'OGX-427 ou par l'oligonucléotide contrôle (CTL). Les cellules 293T servant de contrôle positif pour l'expression de HSP70. L'actine servait de contrôle de charge. **(B)** Analyse par western blot de l'expression de HSP27, HSP70 et HSP90 dans les lignées leucémiques HEL92.1.7, SET-2 et K562 traitées par l'OGX-427 ou par le CTL. L'actine servait de contrôle de charge.

II.4. HSP27 réduit la prolifération des cellules leucémiques *JAK2V617F* et interagit directement avec JAK2 et STAT5

Compte tenu des effets bénéfiques *in vivo* de l'inhibiteur de HSP27 dans deux modèles murins de MF, nous avons cherché à comprendre le rôle intracellulaire de HSP27 dans des lignées cellulaires exprimant ou non un mutant de JAK2 constitutivement actif (mutation *JAK2V617F* (HEL92.1.7 et SET-2) ou *BCR-ABL* (K562)).

II.4.1. Effet antiprolifératif de l'inhibition de HSP27 dans les cellules leucémiques mutantes pour *JAK2V617F*

Tout d'abord, nous avons évalué l'effet de la déplétion de HSP27 (par deux siRNAs et l'OGX-427) sur la prolifération des cellules leucémiques *JAK2V617F*, HEL92.1.7 (lignée érythroleucémique) et SET-2 (lignée mégacaryoblastique) en comparaison avec des cellules leucémiques négatives pour *JAK2V617F* (K562). Les résultats ont montré que la déplétion de HSP27 affectait spécifiquement la prolifération cellulaire des cellules leucémiques *JAK2V617F* dépendantes (**Figure 27**). L'effet est toutefois plus marqué dans la lignée mégacaryoblastique SET-2 que dans la lignée érythroblastique HEL92.1.7.

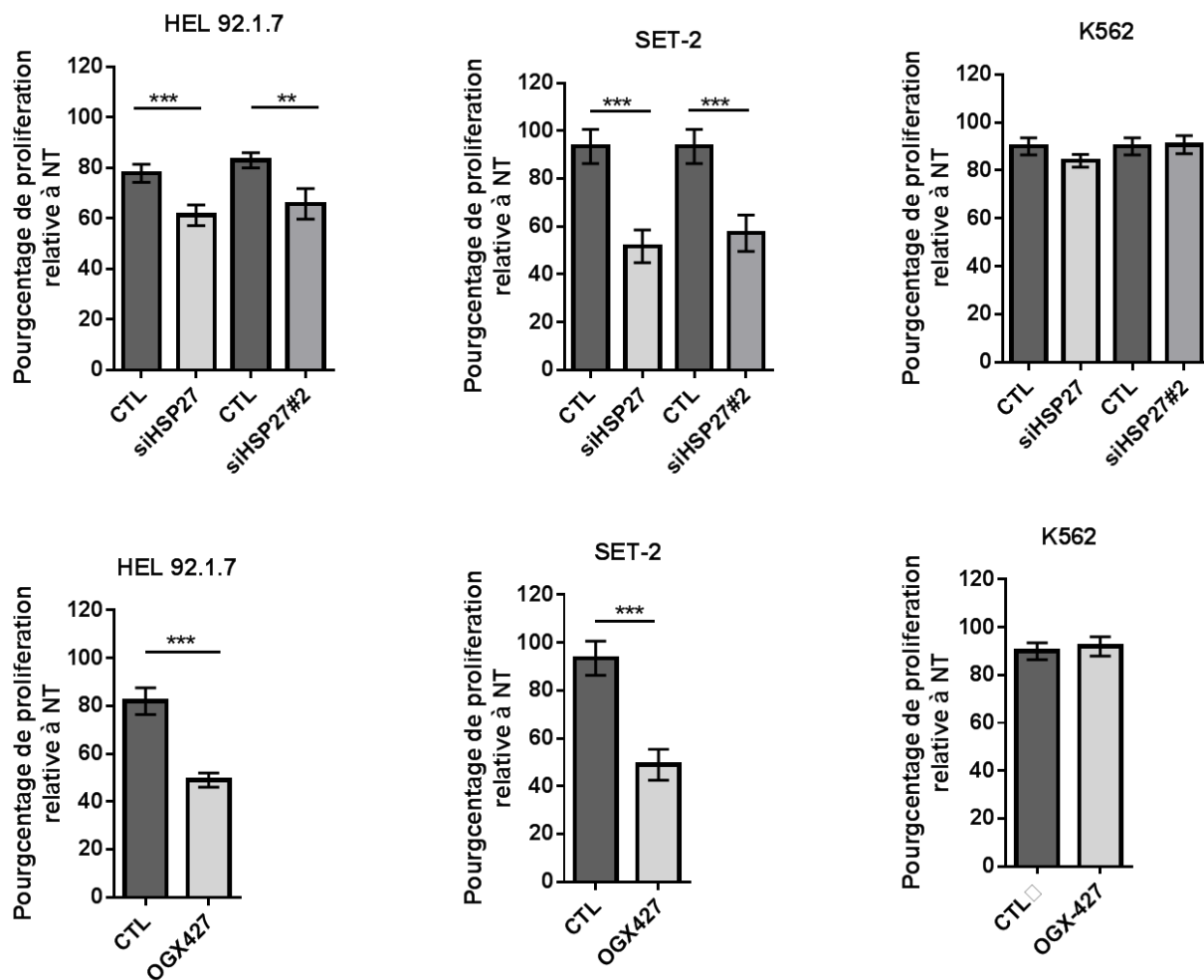


Figure 27 : La prolifération des cellules leucémiques *JAK2V617F* est affectée par la déplétion de HSP27

Les cellules HEL92.1.7, SET-2 et K562 ont été transfectées par un siRNA spécifique de HSP27 (siRNA#1 ou siRNA#2), l'OGX-427 ou un oligonucléotide contrôle (CTL). La prolifération cellulaire a été mesurée par XTT, 48 heures après transfection. Les histogrammes représentant le pourcentage de prolifération cellulaire relative aux cellules non transfectées (NT) de 9 expériences indépendantes. Moyenne ± SEM, ** ≤ $p=0.01$; *** ≤ $p=0.001$

Il est important de noter que le ralentissement de prolifération observé n'était pas dû à une induction de la mort cellulaire (**Figure 28**). Ces résultats suggèrent que la déplétion en HSP27 dans les cellules leucémiques *JAK2V617F* était responsable des effets antiprolifératifs observés.

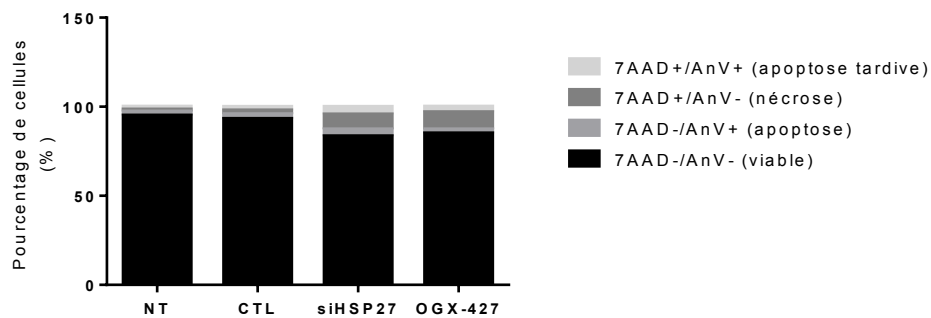


Figure 28 : La déplétion de HSP27 n'induit pas de mort cellulaire dans les cellules leucémiques

Analyse de la viabilité cellulaire des cellules HEL92.1.7 à 48 heures post-transfection par un siRNA spécifique de HSP27 (siRNA#1) ou l'OGX-427 en comparaison avec un siRNA contrôle (CTL). NT étant les cellules non transfectées.

II.4.2. Effet antiprolifératif d'un shRNA-HSP27 par infection rétrovirale sur la lignée HEL92.1.7 et de progéniteurs de patients *JAK2V617F*

En vue d'étudier l'effet de la déplétion de HSP27 sur des cellules de patients *JAK2V617F* positives, un shRNA-HSP27 a été généré par nos soins et l'efficacité a été testée sur les cellules leucémiques HEL92.1.7.

Comme observé avec les siRNA ou le traitement par l'OGX-427 (**Figure 29A**), nous avons noté une diminution significative ($p=0,0012$) de la prolifération des cellules HEL92.1.7 (**Figure 29B**) infectées par le shRNA HSP27 par rapport à l'infection contrôle (shRNA-Ctrl). Confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus.

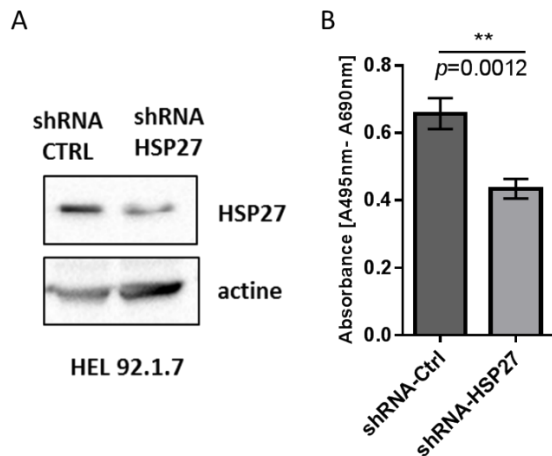


Figure 29 : Le shRNA-HSP27 diminue significativement la prolifération cellulaire des cellules HEL92.1.7

(A) Analyse par western blot de l'expression de HSP27 dans les cellules HEL92.1.7 infectées par les particules virales contenant le plasmide shRNA spécifique de HSP27 ou le vecteur vide shRNA contrôle (CTRL). L'actine a servi de contrôle de charge. (B) Analyse de la prolifération cellulaire par la méthode de XTT correspondant à 3 expérimentations indépendantes. Moyenne \pm SEM, ** $\leq p=0.01$;

Nous avons ensuite évalué l'effet de la déplétion de HSP27 à l'aide du shRNA sur la formation de progéniteurs érythroblastiques (BFU-E) *in vitro* à partir de cellules mononuclées (PBMC) de différents patients porteurs de la mutation *JAK2V617F*.

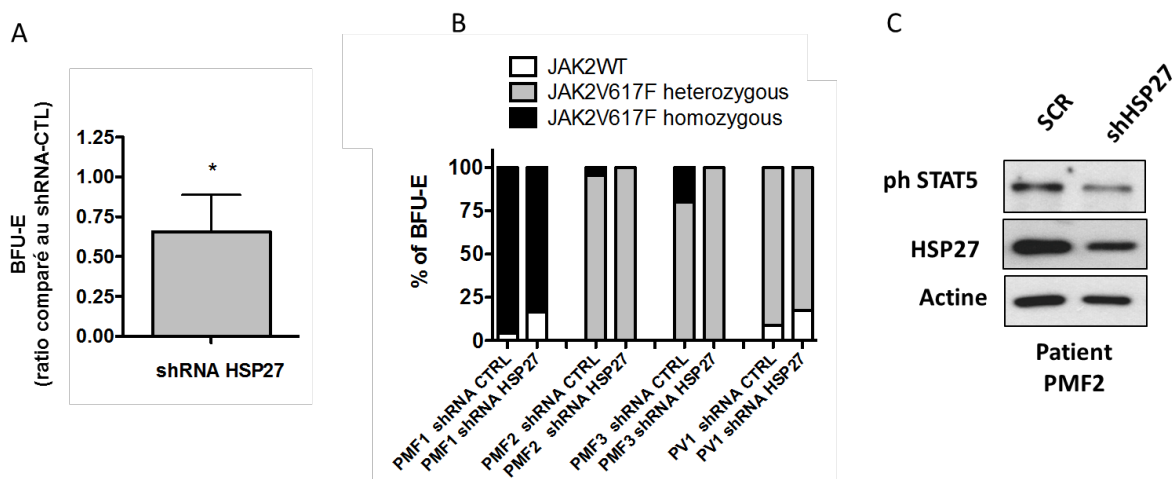


Figure 30 : Le shRNA-HSP27 diminue significativement la prolifération cellulaire des cellules de patients *JAK2V617F* et affecte la clonogénicité

(A) Représentation de l'impact du sh-RNA de HSP27 sur le potentiel clonogénique des cellules CD34+ de patients *JAK2V617F* à former des colonies BFU-E après 15 jours de culture *in vitro* en présence de stem cell factor, IL3 et EPO, en comparaison avec un sh-RNA CTRL. Moyenne \pm SEM, * $\leq p=0,1$ (B) Génotypages *JAK2* sauvage et *JAK2V617F* des colonies BFU-E de patients MFP et PV (C) Analyse par western blot de l'expression de HSP27 et de la forme phosphorylée de STAT5 de cellules primaires d'un patients MFP infectées par les particules virales contenant le plasmide shRNA spécifique de HSP27 ou le vecteur vide shRNA contrôle (CTRL). L'actine a servi de contrôle de charge.

Les résultats ont montré (**Figure 30**) que la déplétion de HSP27 affecte le potentiel clonogénique des progéniteurs érythroïdes (BFU-E) de patients MF (**Figure 30A**) et cible plus particulièrement les clones CD34+ porteurs de la mutation homozygote *JAKV617F* (**Figure 30B**).

II.4.3. La déplétion de HSP27 module la voie JAK2/STAT5/cMYC dans les lignées leucémiques *JAK2V617F*

D'un point de vue moléculaire, nous avons montré que la déplétion de HSP27 par l'OGX-427 ou par un siRNA de HSP27, n'avait pas d'effet sur la protéine JAK2 ni sur son statut de phosphorylation. En revanche, nous avons observé que la déplétion de HSP27 par deux stratégies différentes (siRNA et OGX-427), diminuaient le niveau de phosphorylation de STAT5 dans les cellules leucémiques HEL92.1.7 et SET-2. Nous avons également observé une légère diminution de la forme totale de STAT5 mais seulement dans les cellules mégacaryoblastiques SET-2 traitées à l'OGX-427 (**Figure 31**).

L'expression cellulaire de l'oncogène c-Myc, connu pour être un gène cible du facteur de transcription STAT5 et pour stimuler la prolifération cellulaire [305], a été déterminée dans les différentes lignées. En accord avec la diminution de prolifération observée précédemment, nous avons relevé une diminution de la protéine c-MYC dans les cellules HEL92.1.7 et SET-2 (**Figure 31**).

Concernant la lignée K562 (*JAK2V61F* négative), nous n'avons pas observé de diminution relative aux protéines de la voie JAK2/STAT5/cMYC (**Figure 31**).

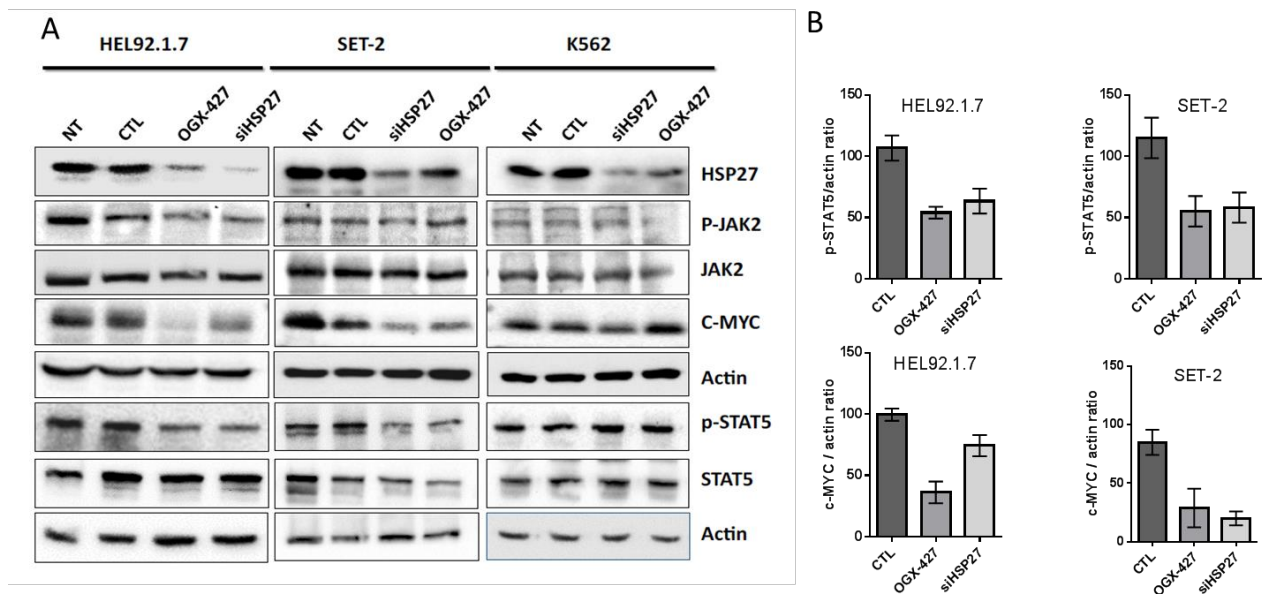
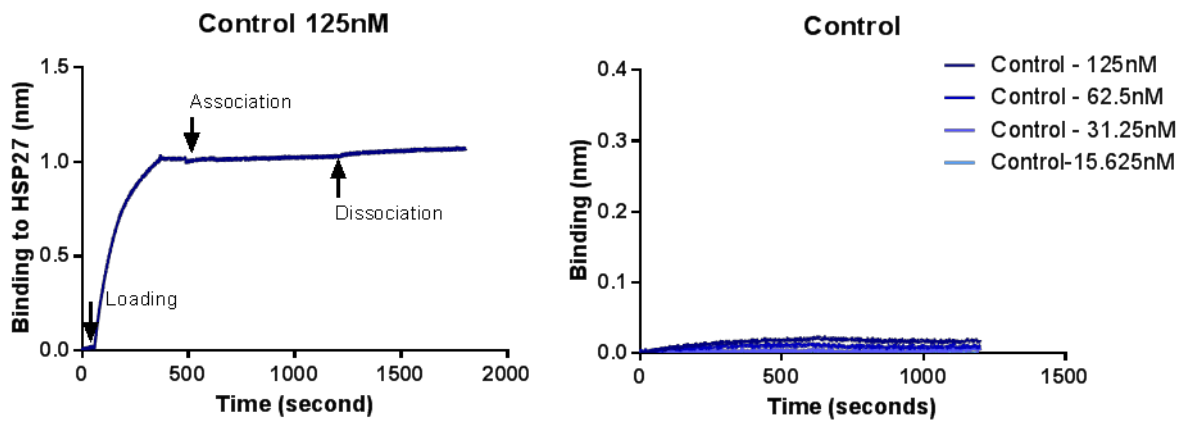


Figure 31 : HSP27 régule la phosphorylation de STAT5 et l'expression de C-Myc dans les cellules *JAK2V617F*
(A) Analyse par western blot de l'expression de HSP27, JAK2, STAT5, C-Myc et des formes phosphorylées de JAK2 (p-JAK2) et STAT5 (p-STAT5) dans les cellules HEL92.1.7, SET-2 et K562, 48 heures après transfections. L'actine a servi de contrôle de charge. **(B)** Les histogrammes correspondent à la quantification de 3 expériences indépendantes.

Au vu des précédents résultats, nous avons testé par la méthode d'interférométrie optique l'interaction des protéines JAK2 et des isoformes alpha et beta de STAT5 *in vitro*, à un biocapteur sur lequel HSP27 a été immobilisée.

La spécificité du biocapteur HSP27 a été préalablement testé et optimisé à l'aide de protéines contrôles, l'alphaB-cristalline et le domaine Ring de CBP, respectivement capable ou non de se lier à HSP27 (**Figure 32**).

A



B

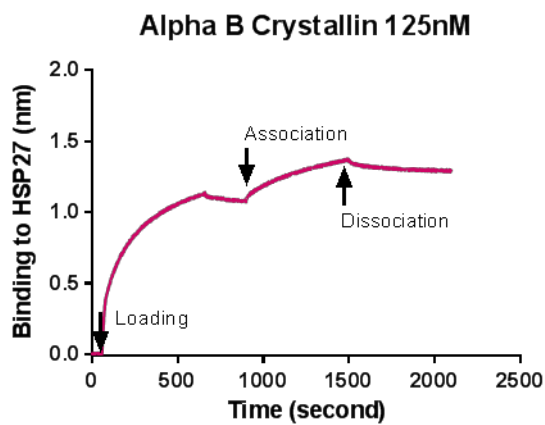


Figure 32 : Validation de la spécificité du capteur HSP27

Courbes représentatives de la fixation (loading) de HSP27 biotinylée sur le capteur strépatatine suivi par les courbes de fixations (association) et dissociations (dissociation) des protéines recombinantes contrôles CBP (domaine ring) et alphaB-cristalline. **(A) Panel de gauche** : Analyse de la fixation du domaine CBP de la protéine Ring au capteur à 125 nM **Panel de droite** : Analyse de la fixation du domaine CBP de la protéine Ring au capteur à différentes concentrations allant de 15.625 à 125 nM. **(B)** Analyse de la fixation alphaB-cristalline au capteur à 125nM. (N=3 expériences indépendantes).

Dans cette étude, nous avons montré que les protéines recombinantes JAK2 et les deux isoformes de STAT5 (alpha et beta), interagissaient directement avec HSP27 (**Figure 33**), et ce avec la même intensité que la protéine alphaB-cristalline connue pour s'associer avec HSP27 [306].

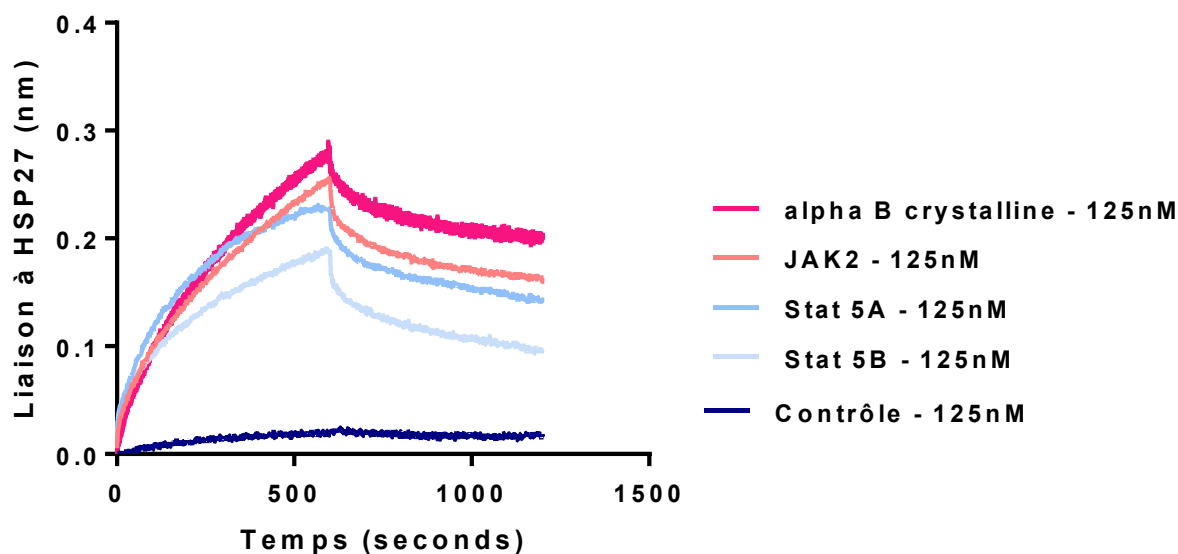


Figure 33 : HSP27 interagit directement avec JAK2 et les isoformes alpha et beta de STAT5

Courbes représentatives de la fixation et la dissociation des protéines recombinantes JAK2 et STAT5 alpha et beta à 125 nM avec HSP27 biotinylée sur un biocapteur. Les mesures ont été réalisées par interférométrie optique. AlphaB-cristalline et le domaine Ring de la protéine CBP étaient respectivement utilisés en contrôle positif et négatif (n=3 expériences indépendantes).

Afin de confirmer les résultats *in vitro*, une co-immunoprécipitation *in cellulo* a été réalisée sur les cellules HEL92.1.7. Pour cela, les cellules ont été cultivées en absence de sérum pendant 16 heures puis stimulées 30 minutes avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) ou par des doses croissantes d'EPO (en comparaison avec du PBS (CTRL)), dans le but de stimuler la signalisation JAK2/STAT5.

Nous avons montré *in cellulo* l'interaction de HSP27 avec JAK2 à l'état basal (CTL) et après stimulation par les cytokines. HSP27 interagissait avec STAT5 et ce, de façon plus importante dans les cellules stimulées à l'EPO (50 U/ml) (**Figure 34A**).

Afin de confirmer les interactions entre HSP27 et la forme mutée de JAK2 ou la protéine STAT5, nous avons surexprimé les protéines taguées (JAK2V617F, STAT5a et HSP27) dans les cellules humaines 293T (**Figure 34B**). Les interactions précédemment observées ont ainsi été validées.

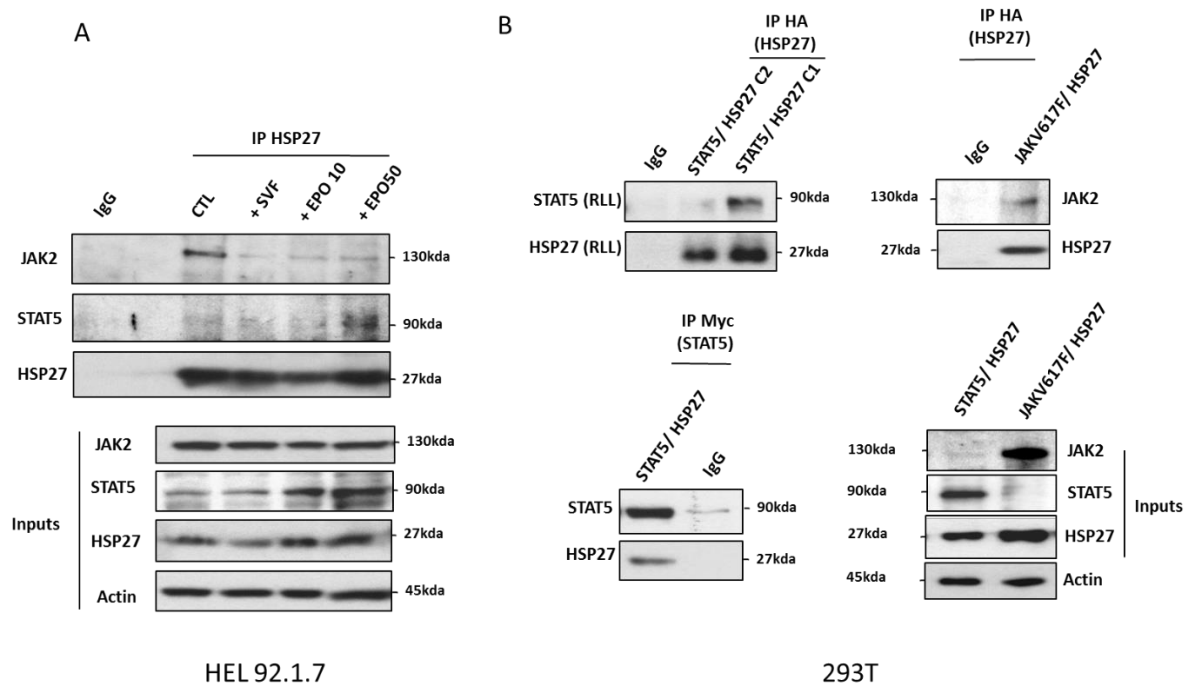


Figure 34 : HSP27 interagit avec JAK2 et STAT5

(A) Immunoprécipitation de HSP27 endogène dans les cellules HEL92.1.7 suivie par une immunodétection de JAK2 ou STAT5. Contrôle Ig : un anticorps non-relevant a été utilisé. Inputs : extraits de cellules non immunoprécipitées (n= 2 expériences indépendantes). **(B)** Les cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur HSP27-HA et le vecteur JAK2V617F ou STAT5a-Myc. L'immunoprécipitation des extraits de 293T a été réalisée 24 heures suivant la transfection avec un anticorps anti-HA ou anti-Myc suivie par une immunodétection de STAT5 ou JAK2. Contrôle Ig : un anticorps non-relevant a été utilisé. Inputs : extraits de cellules non immunoprécipitées (n= 2 expériences indépendantes).

En vue de mieux comprendre le mécanisme d'action, nous avons évalué les interactions de manière endogène, en utilisant la technique d'essai de ligature de proximité dans les cellules HEL92.1.7. Les fluorescences rouges (points) ou foyers rouges, marquant l'interaction entre deux protéines dans les cellules, ont été détectées cellules par cellules.

Nous avons observé une diminution significative du nombre de foyer d'interaction dans les cellules transfectées par le siRNA de HSP27, confirmant ainsi l'association endogène de HSP27 avec JAK2V617F et STAT5 dans les cellules HEL92.1.7 (**Figure 35**).

En utilisant cette même approche, nous avons pu montrer que le siRNA de HSP27 affectait significativement la proximité de JAK2V617F avec STAT5 dans les cellules leucémiques (**Figure 35**).

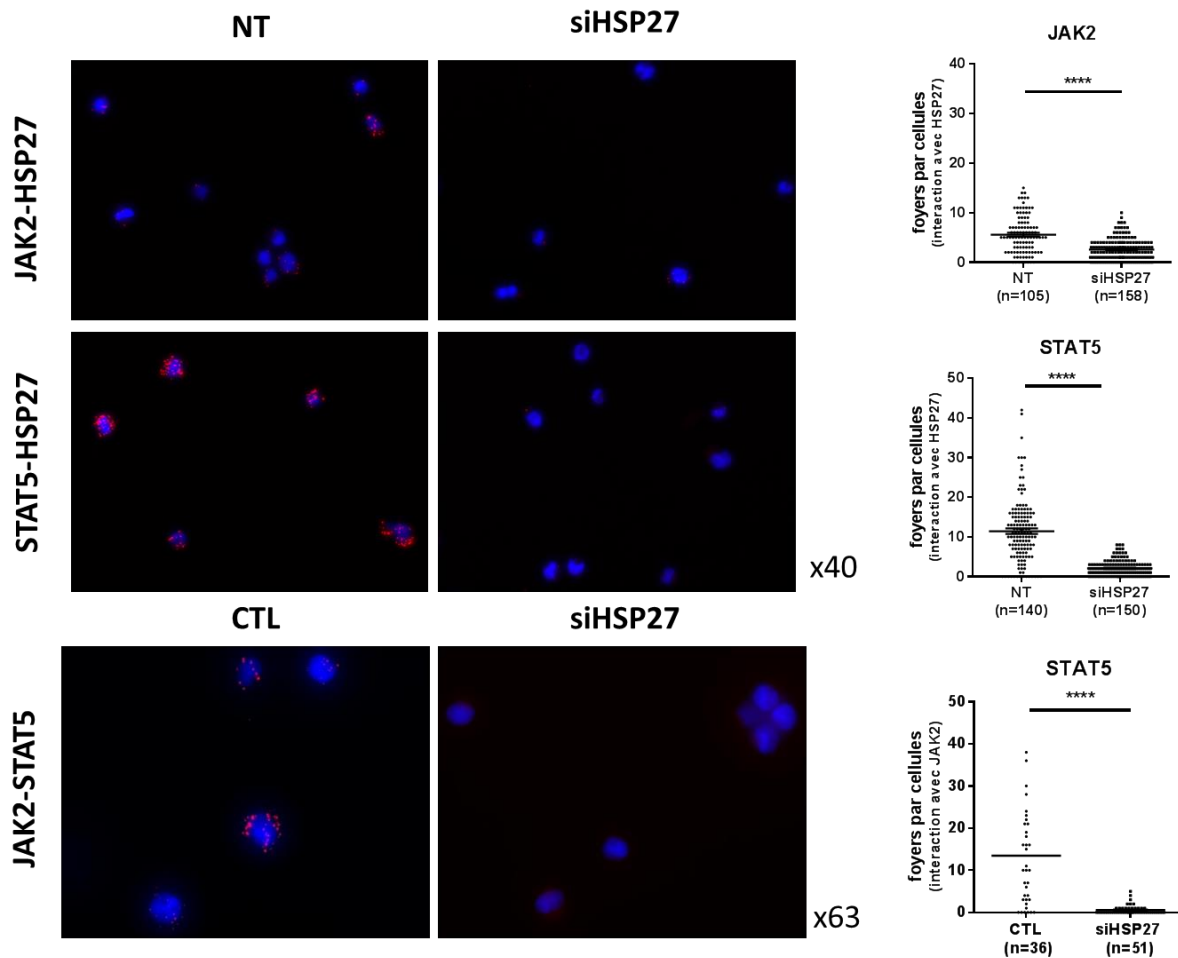


Figure 35 : HSP27 permet la stabilité du complexe JAK2/STAT5

Panel du haut : Analyse par immunofluorescence des interactions endogènes (foyers rouge) de JAK2 ou STAT5 avec HSP27, visualisées par la technique d'essai de ligature de proximité, dans les cellules HEL92.1.7 non transfectées (NT) ou transfectées avec le siRNA spécifique de HSP27 (siRNA#1). Les noyaux ont été colorés par le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). A droite sont représentées les quantifications des foyers rouges (interactions endogènes de HSP27 avec STAT5 ou JAK2) par cellule, préalablement analysées par le logiciel ICY.

Panel du bas : Analyse par immunofluorescence des interactions endogènes (foyers rouge) de JAK2 et STAT5 visualisées par la technique d'essai de ligature de proximité dans les cellules HEL92.1.7 transfectées avec le siRNA contrôle (CTL) ou spécifique de HSP27 (siRNA#1). Les noyaux ont été colorés par le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). A droite sont représentés les quantifications des foyers rouges (interactions endogènes de JAK2 avec STAT5) par cellule, préalablement analysées par le logiciel ICY.

II.5. L'expression de HSP27 est augmentée dans les cellules de patients atteints de MF

Sur la base de nos résultats *in vivo* et *in vitro*, et sur le fait que l'expression des HSPs est souvent augmentée dans les cancers [208][232], nous avons cherché à mesurer l'expression intracellulaire et extracellulaire de HSP27 chez les patients atteints d'une MF.

Les patients présentant les mutations *JAK2V617F*, *CALR* ou *MPL* ont été inclus conjointement dans l'étude sachant que l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT est indépendante du type de mutation « drivers ».

II.5.1. HSP27 est surexprimée dans les cellules souches circulantes de patients MF

La population de cellules souches circulantes (CSC) CD34⁺ ; CD45^{faible}, isolée à partir du sang de patients MF, a été analysée par cytométrie en flux. Nous avons observé un taux intracellulaire de HSP27 dans les CSC significativement plus élevé ($p=0,0032$) chez les patients MF, en comparaison avec des cellules souches de donneurs sains (CD34⁺ ; CD45^{faible}) isolées à partir de sang de cordon (**Figure 36**). *A contrario*, les niveaux intracellulaires de HSP70 et HSP90 dans les cellules CD34⁺ de patients restaient inchangés par rapport aux donneurs sains (**Figure 36**).

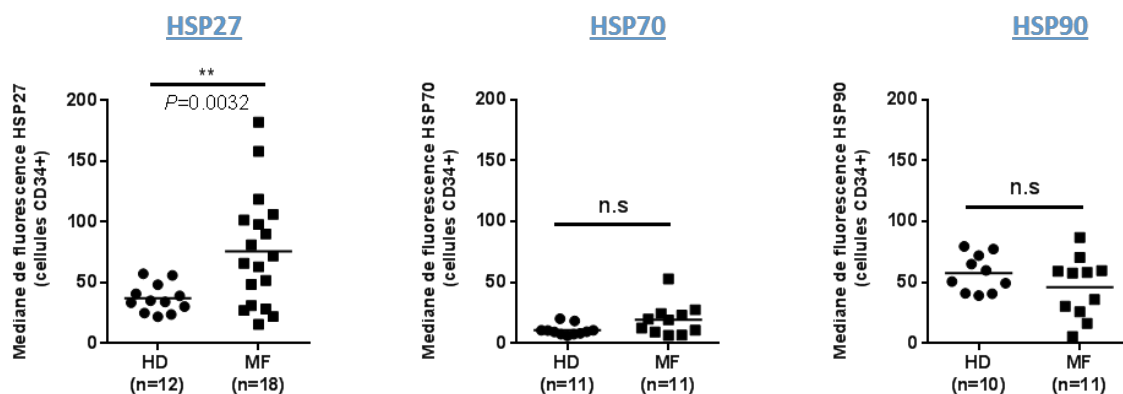


Figure 36 : HSP27 est surexprimée dans les cellules CD34⁺ ; CD45^{faible} des patients MF

Analyse par cytométrie en flux des médianes de fluorescence de HSP27, HSP70 et HSP90 intracellulaires dans les cellules souches circulantes de patients (MF) et de cellules souches de donneurs sains (HD). Les populations analysées ont été fenêtrées CD34⁺ ; CD45^{faible}. Moyenne \pm SEM. $** \leq P = 0.001$

De façon intéressante, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'intensité de fluorescence de HSP27 et le type de mutation (*JAK2V617F*, *CALR* ou *MPL*). En revanche, il semblerait qu'il puisse y avoir une corrélation entre le type de myélofibrose et l'intensité de fluorescence de HSP27 dans les CSC (**Figure 37**). De fait, le niveau d'expression intracellulaire de HSP27 est plus significativement augmenté ($\leq P = 0,001$) dans les MF primaires comparativement au MF secondaires.

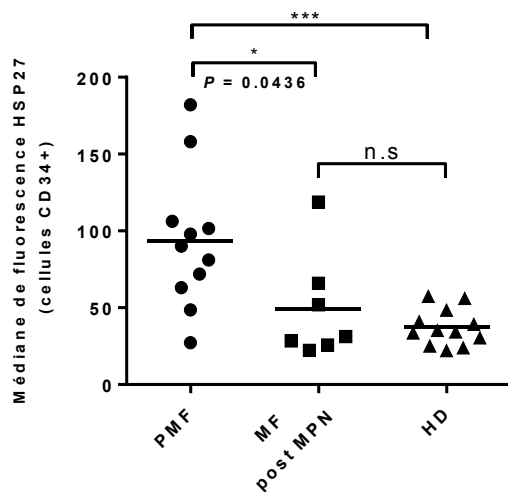


Figure 37 : HSP27 est surexprimée chez les patients atteints de PMF

Analyse par cytométrie des médianes de fluorescence des HSPs intracellulaires de patients en fonction du statut primitif ou secondaire à une NMP. Les populations analysées étaient fenêtrées CD34+ ; CD45^{faible}. Moyenne \pm SEM. * $\leq P = 0.05$, *** $\leq P = 0.001$

II.5.2. HSP27 et HSP90 sont augmentées dans le sérum de patients atteints de MF

Sachant que les HSPs et plus particulièrement HSP27/70/90 peuvent être secrétées dans le milieu extracellulaire, leur taux sérique a été évalué chez des patients MF comparativement aux donneurs sains par la méthode de dosage ELISA.

Deux différentes cohortes ont été évaluées, la première cohorte provenant de patients inclus dans l'étude par l'Institut Gustave Roussy et la deuxième provenant de patients inclus dans l'étude par l'Hôpital Universitaire de Dijon.

Les résultats ont révélé dans les deux cohortes et ce, de manière équivalente, un taux sérique de HSP27 significativement plus élevé chez les patients MF (9,171 ng/ml et 13,99 ng/ml) que chez les donneurs sains (2,105 ng/ml) (**Figure 38**). Nous avons aussi observé un taux plus élevé de HSP90 alpha dans les cohortes de patients MF (239,8 ng/ml et 173,1 ng/ml) comparativement aux donneurs sains (42,83 ng/ml) (**Figure 38**). En ce qui concerne HSP70, les

taux évalués pour les deux cohortes testées n'étaient significativement pas différents de la population contrôle (Figure 38).

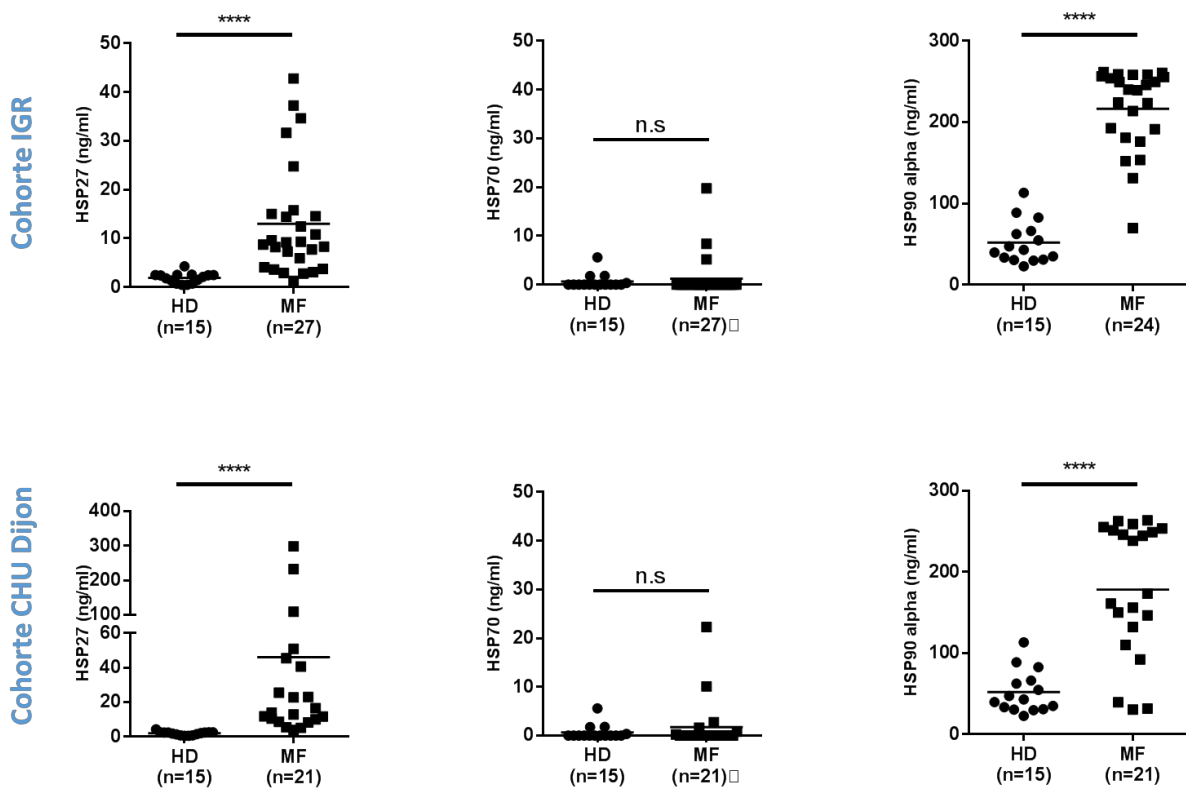


Figure 38 : HSP27 et HSP90 sont fortement exprimées dans les sérums de patients MF comparativement aux donneurs sains

Quantification de HSP27, HSP70 et HSP90 en ng/ml par la méthode ELISA dans deux cohortes de patients (MF) en comparaison avec des donneurs sains (HD). Moyenne \pm SEM. **** $\leq P = 0.0001$

II.5.3. HSP27 est fortement exprimée sur les coupes histologiques des biopsies osseuses de patients avec myélofibrose

Nous avons finalement analysé la distribution cellulaire des HSPs dans des coupes ostéomédullaires de patients atteints de MF.

Nous avons observé que HSP27 était très fortement exprimée sur les coupes de biopsie osseuse des patients MF. Plus précisément, le marquage positif était observé dans les cellules endothéliales et dans les mégacaryocytes, renforçant les données obtenues *in vivo*. En ce qui

concerne HSP90 et HSP70, les cellules myéloïdes présentaient un marquage positif à HSP90, *à contrario* aucun marquage positif n'était détecté pour HSP70 (Figure 39).

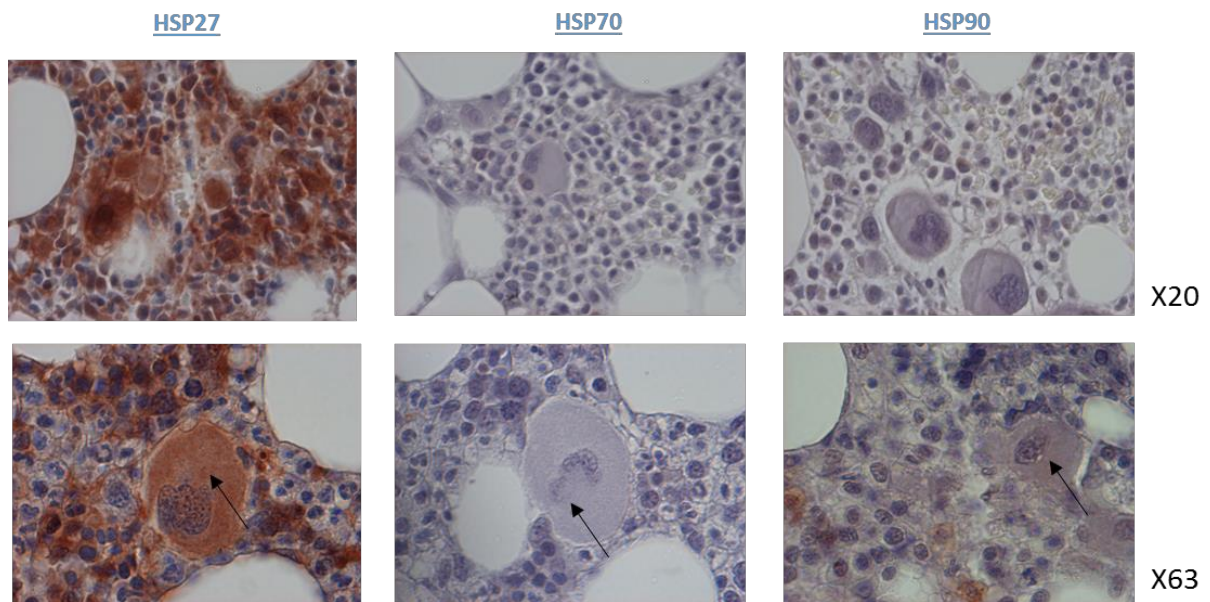


Figure 39 : Les patients MF ont une forte expression de HSP27 dans la moelle osseuse

Coupes ostéomédullaires représentatives de patients MF. Coloration à l'hématoxyline et par un anticorps primaire spécifique de HSP27, HSP70 ou HSP90 (x20 panels du haut ; x63 panels du bas). La flèche marquant un mégacaryocyte.

Discussions et perspectives

Mes travaux de thèse ont permis d'identifier **HSP27 comme un nouvel acteur** de la pathogenèse de la MF et ont montré que ce chaperon moléculaire, bien connu en oncologie, interagissait directement avec des protéines clés de la MF, à savoir JAK2 et STAT5.

Nous avons également montré l'impact positif d'un inhibiteur spécifique de HSP27, l'**OGX-427**, sur l'hématopoïèse extramédullaire et la réduction de la splénomégalie, et ce dans deux modèles murins de MF ayant des caractéristiques communes avec la pathogenèse humaine que sont les modèles TPO^{high} et *JAK2V617F*.

Nos résultats ont ainsi mis en avant le potentiel **intérêt thérapeutique** de l'inhibition de HSP27 et nous proposons aujourd'hui un **nouvel axe complémentaire dans l'arsenal thérapeutique** dans la MF.

✓ Rôle des HSPs extracellulaire dans la myélofibrose

Nous avons pu identifier pour la première fois à notre connaissance, une augmentation extracellulaire des HSP90 α et HSP27 dans les sérums des patients MF et des souris développant une MF avancée (**Figure 38 et 16**).

○ HSP90 extracellulaire

La protéine HSP90 a déjà été identifiée comme impliquée dans les NMP et plus particulièrement pour son rôle de chaperon moléculaire envers le mutant de JAK2 (*JAK2V617F*) [59], [307]. De plus, les études précliniques ont montré que l'inhibition de HSP90 seule ou en combinaison avec celle de JAK2 était bénéfique dans le contexte des NPM dépendantes de JAK2 [162], [167]. En revanche, l'expression extracellulaire de HSP90 (eHSP90) dans la MF n'a pour lors jamais été examinée alors que sa fonction extracellulaire est décrite pour participer à la cancérogenèse [197][198].

De façon intéressante, une étude a montré que l'inhibition d'eHSP90 réduisait la synthèse de collagène des fibroblastes cardiaques stimulés au TGF- β . De plus, dans le contexte de la fibrose

cardiaque, les souris KO HSP90 α ont montré une diminution drastique de la production de collagène en réponse à la stimulation par le TGF- β [308]. Il a ainsi été démontré qu'eHSP90 était capable de se fixer à la partie extracellulaire du récepteur I du TGF β (TGF β R1) des fibroblastes cardiaques et que la fixation au récepteur induisait la voie canonique de la production du collagène.

Ces résultats soulignent l'existence d'une relation étroite entre la forme extracellulaire de HSP90 et les processus fibrotiques. Dans le contexte de la MF, nos résultats semblent également aller dans ce sens. En effet, nous avons observé une très nette augmentation des taux sériques de HSP90 chez les patients MF. Il reste néanmoins à déterminer si cette augmentation d'eHSP90 est à l'origine ou est consécutive au processus fibrotique sachant que HSP90 n'est sécrétée qu'en conditions de stress.

L'utilisation d'inhibiteurs non perméables et spécifiques d'eHSP90 pourrait aider à la compréhension du rôle d'eHSP90 dans la MF. De fait, ces inhibiteurs ont déjà fait leur preuve en oncologie et en particulier, le STA-12-7191, un dérivé de la ganetespib. L'utilisation de cet inhibiteur a permis de réduire la migration des cellules cancéreuses dans le contexte du cancer du sein [309]. Il serait ainsi très intéressant, d'étudier les effets d'inhibiteurs d'eHSP90 non perméants *in vivo* dans différents modèles murins de MF. Une étude spécifiquement dédiée au rôle de la forme extracellulaire de HSP90 dans le contexte de la MF pourrait apporter de nouveaux éléments de réponse sur le rôle de HSP90 dans la pathogenèse de la MF et en conséquence de nouvelles perspectives thérapeutiques.

o HSP27 extracellulaire

Nous avons montré une augmentation significative du taux sérique de HSP27 dans les souris TPO^{high} et dans le modèle *JAK2V617F* présentant les symptômes avancés d'une MF (90 jours et 22 semaines suivant la greffe, respectivement).

Ces données ont pu être validées chez l'homme grâce à une étude montrant l'élévation sérique de HSP27 chez les patients MF (**Figure 38**). Pour cela, nous avons utilisé deux cohortes différentes d'une vingtaine de patients PMF, inclus dans deux centres hospitaliers géographiquement différents (CHU de Dijon et IGR de Villejuif). Le caractère bicentrique de notre étude, nous a permis de renforcer considérablement la pertinence de nos données. Au

vu de nos résultats, nous pensons que la forme extracellulaire de HSP27 pourrait être impliquée dans la MF.

L'augmentation extracellulaire de HSP27 a déjà été observée dans des conditions pathologiques comme la pancréatite chronique, le cancer du pancréas ou le cancer du sein par exemple [281], [310], [311]. En revanche, concernant les pathologies fibrotiques où HSP27 a clairement été identifiée comme dans la fibrose pulmonaire et rénale, les taux sériques de HSP27 chez les patients n'ont pas été explorés [275], [278], [312].

De façon générale, il est admis que le taux de HSP27 dans le milieu extracellulaire est en corrélation avec une augmentation de sa concentration intracellulaire [266]. Cette augmentation peut-être due à des conditions extrêmes comme un effort physique très intense [313] ou à une sécrétion pathologique des cellules cancéreuses [314]–[316].

Dans le contexte de la MF, les cellules responsables de la sécrétion extracellulaire de HSP27 restent à être identifiées. Toutefois, nous avons pu observer que l'augmentation de la concentration sérique de HSP27 dans des patients MF (**Figure 38**) est associée à un taux intracellulaire de HSP27 élevé dans les mégacaryocytes, les cellules de la trame endothéliale et les cellules CD34 positives des patients MF (**Figure 36 et 39**).

Par ailleurs, il a déjà été montré que HSP27 était libérée par les plaquettes humaines en conditions normales [317]. Il se pourrait donc que la lignée plaquettaire, connue pour être dérégulée dans la MF, soit en partie responsable de l'élévation sérique de HSP27 dans la MF. En revanche, nous n'excluons pas que d'autres cellules puissent être impliquées dans la libération de HSP27 dans le milieu extracellulaire.

✓ HSP27 est-elle un nouvel acteur de la lignée mégacaryocytaire ?

Comme nous nous avons pu le voir HSP27 est décrite pour être sécrétée par les plaquettes sanguines [317] et nos résultats montrent que (i) HSP27 est fortement exprimée dans les mégacaryocytes de patients MF (**Figure 39**) et (ii) qu'*in vivo* la déplétion de HSP27 par l'OGX-427 limitait l'hyperplasie mégacaryocytaire dans la moelle des souris TPO^{high} (**Figure 22**). La moelle et la rate des souris *JAK2V617F* traitées à l'OGX-427 pendant 10 semaines à partir de la 6^{ème} semaine post-greffe, semblaient également suivre cette tendance puisque nous avons

relevé une diminution du taux plaquettaire en fin de traitement (**Figure 25**). Ces résultats en adéquation dans nos deux modèles de MF, nous interrogent quant au rôle de HSP27 dans la lignée mégacaryocytaire.

HSP27 a déjà été identifié dans le compartiment hématopoïétique pour son rôle dans la différenciation érythroïde. En effet, des études sur la différenciation hématopoïétique ont montré que l'expression et le niveau de phosphorylation de HSP27 étaient augmentés au cours du processus de différenciation érythroïde des cellules leucémiques K562 stimulées à l'hémine (un agent utilisé pour induire la différenciation érythroïde *in vitro*) [318]. En revanche, les études *in cellulo* n'ont pas observé de modification de l'expression/phosphorylation de HSP27 lors de la différenciation en mégacaryocytes des cellules K562 par le TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, un agent utilisé pour induire la différenciation MK *in vitro*) [318]. Ces résultats restent encore contestables puisqu'ils ont été obtenus dans des conditions de stimulation non physiologiques d'une lignée cancéreuse qui exprime un taux d'HSP27 déjà très élevée et en partie sous forme phosphorylée (données du laboratoire).

Les résultats de l'équipe ont précédemment confirmé une partie de ces résultats à partir de cellules souches CD34⁺ de donneurs sains et démontré l'implication de HSP27 dans la phase terminale de la différenciation normale érythroïde [264]. Nous avons pu démontrer l'interaction de HSP27 avec le facteur de transcription GATA-1. Dans le noyau, HSP27 phosphorylée provoque l'ubiquitination et la dégradation par le système du protéasome de GATA-1, ce qui permet la différenciation érythroïde terminale. GATA-1 est un facteur de transcription très important pour la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire [319]. L'implication de HSP27 dans la régulation de l'expression de GATA-1 au cours des processus de différenciation érythroïde étant déjà établie, nous nous demandons si HSP27 ne pourrait pas également jouer un rôle dans la différenciation des mégacaryocytes. De façon intéressante, HSP27 a été identifiée pour être phosphorylée à des niveaux élevés dans les MK anormaux de patients MF par rapport aux donneurs sains [299].

Par ailleurs, une étude clinique a montré que les patients MF présentent un défaut d'expression de GATA-1, en particulier dans les MK [320]. Ces résultats permettent de mieux comprendre le phénotype des souris exprimant faiblement le facteur de transcription GATA-1 (souris GATA-1^{low}). En effet, le modèle murin GATA-1^{low} est connu pour développer une anémie associée à des caractéristiques de MF comme l'augmentation du nombre de progéniteurs dans le sang

périphérique, une fibrose collagène médullaire et splénique ainsi qu'une hématopoïèse extramédullaire [124].

Au vu de ces résultats, un lien entre HSP27 et le facteur de transcription GATA-1 pourrait être établi, au cours de la mégacaryopoïèse normale et pathologique. Dans ce but, nous pourrions étudier dans le modèle murin GATA^{low} l'expression extracellulaire et intracellulaire de HSP27 et évaluer ainsi les effets de l'OGX-427 dans un modèle non dépendant de la voie JAK/STAT.

✓ HSP27 et le trafic des cellules souches de la moelle vers la rate

L'augmentation dans le sang périphérique des CSC étant une des caractéristiques cliniques de la MF, nous avons étudié par cytométrie en flux l'expression intracellulaire des HSPs au sein des cellules circulantes CD34⁺; CD45^{faible} de patients MF. Nous avons observé une augmentation significative du taux de HSP27 dans cette population cellulaire (**Figure 36**), nous laissant penser que HSP27 aurait un rôle au sein de ce compartiment cellulaire.

Le trafic anormal de CSC a été identifié dans la MF comme participant à l'établissement de l'HEM [109], [110]. Nous avons montré dans deux modèles murins de MF que l'utilisation d'un inhibiteur de HSP27, l'OGX-427, avait des effets bénéfiques sur la splénomégalie ainsi que sur l'HEM pour le modèle TPO^{high} (**Figure 19 et 25**). L'ensemble de ses données convergent vers une probable implication de HSP27 dans la migration des CSC de la niche médullaire vers les foyers extramédullaires.

Récemment, il a été montré que l'axe CXCL12/CXCR4 jouait un rôle dans la migration pathologique des cellules CD34⁺ et ce à travers la signalisation JAK2 [109]. En ce qui concerne HSP27, de nombreuses études rapportent son implication dans la migration cellulaire et/ou la formation de métastases [290], [321], [322]. Plus particulièrement, une étude réalisée dans le contexte du cancer du sein, rapportait que la déplétion de HSP27 impactait la migration des cellules cancéreuses *via* l'axe CXCL12/CXCR4 [323]. HSP27 pourrait donc être impliquée dans la migration cellulaire dans le contexte de la MF, ce qui expliquerait sa forte expression dans les CSC des patients.

Nous venons d'obtenir des résultats supplémentaires qui pourraient renforcer cette hypothèse. En effet, nous avons poursuivi nos études dans le modèle murin *JAK2V617F*. Dans

cette nouvelle étude, les souris ont été traitées pendant 10 semaines avec l'OGX-427 (n=5 par groupe) à partir de la 12^{ème} semaine suivant la greffe avant d'être euthanasiées. Ainsi, nous avons évalué l'impact d'un traitement à l'OGX-427 au cours du développement de la MF du modèle *JAK2V617F* contrairement à l'ancien protocole de traitement où nous avons arrêté l'expérimentation peu de temps après les premiers symptômes de la MF (16^{ème} semaine).

Nous avons observé une réduction de la taille de la rate associée à la diminution significative du nombre de cellules souches CD34+ sh-HSC et des progéniteurs multipotents MPP (sans capacité d'auto-renouvellement) dans la rate des souris traitées à l'OGX-427 en comparaison avec les souris traitées au PBS (**Figure 40**).

Ces nouveaux résultats confortent l'hypothèse quant à la participation de HSP27 dans le processus de migration des cellules souches de la moelle osseuse vers les foyers extramédullaires.

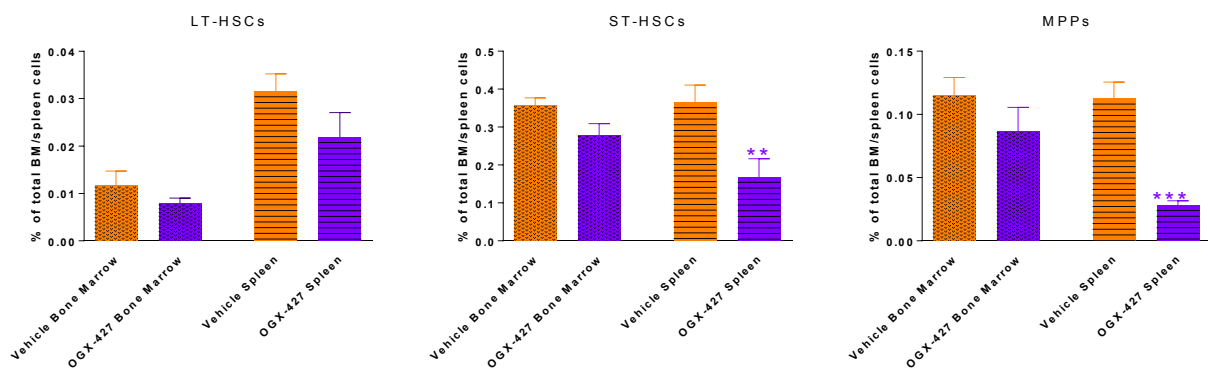


Figure 40 : L'OGX-427 modifie le pourcentage de cellules souches et progénitrices dans la rate à 22 semaines post greffe

Histogramme du pourcentage de cellules souches hématologiques (HSC) long-term (LT-HSC) ou short-term (ST-HSC) et de progéniteurs mutipotents (MPP) dans la moelle osseuse et la rate des souris *JAK2V617F* après 10 semaines de traitements avec l'OGX-427 ou du PBS.

✓ HSP27 et son rôle dans la fibrose

HSP27 a été identifiée comme étant surexprimée lors de pathologies fibrotiques comme la fibrose pulmonaire ou rénale [275], [278], [312]. L'équipe a précédemment mis en évidence une surexpression de HSP27 dans la plèvre de patients atteints de fibroses pulmonaires ainsi que dans deux modèles murins de fibrose pulmonaire idiopathique [277]. L'identification dans mes travaux de thèse de la surexpression de HSP27 dans le sérum et les cellules CD34+ de

patients MF (**Figure 36 et 38**) ainsi que dans les modèles murins de MF (**Figures 16**), semble confirmer à nouveau la corrélation entre HSP27 et les pathologies associées à ce processus de fibrose.

Nous pensons que l'augmentation de l'expression de HSP27 pourrait soit être associée à l'établissement de la fibrose comme nous avons pu le montrer dans la fibrose pulmonaire [277] soit *a contrario*, avoir un effet protecteur comme il a déjà été montré dans les travaux de Vidyasagar dans le contexte de la fibrose rénale [278].

En effet, les études sur l'implication HSP27 dans la fibrose sont assez contradictoires. Dans le cas de la fibrose pulmonaire, HSP27 est décrite pour son rôle protecteur envers le facteur de transcription SNAIL, indispensable à l'induction du processus d'EMT qui favorise l'apparition de la fibrose pulmonaire. A l'inverse, HSP27 inhibe l'expression de SNAIL et protège de l'EMT dans la fibrose rénale. Ainsi, la surexpression de HSP27 est envisagée comme thérapie dans le cas de la fibrose rénale alors que dans le cas de la fibrose pulmonaire son inhibition par l'OGX-427 protège les animaux de la fibrose induite par le TGF- β . Ces deux études montrent le rôle ambivalent que pourrait avoir HSP27 dans les fibroses, il est donc nécessaire d'étudier au cas par cas l'implication de HSP27 dans les processus fibrosants.

Dans le contexte de la MF, aucun lien n'a pour l'instant été établi entre la fibrose et HSP27. Pourtant, certaines données de la littérature suggèrent qu'il puisse en exister. Par exemple, il a été reporté que la stimulation par le collagène des plaquettes conduisait à la phosphorylation de HSP27 et à la libération de PDGF, un facteur de croissance déjà identifié pour participer à la pathogénèse de la MF [324]. De plus, une expression aberrante de PDGF et de son récepteur (*PDGF receptor alpha*) a été identifié dans les cellules de la moelle osseuse de patients atteints de MF idiopathique pour les stades avancés de la maladie [325]. Ces données soulignent l'existence d'une relation probable entre HSP27 et les processus fibrotiques.

Lors de nos premiers travaux nous n'avions pas observé d'effet bénéfique ou délétère de l'OGX-427 sur la fibrose réticulinique et collagénique dans le modèle murin TPO^{high}. De fait, ces résultats reproduisent ce qui avait été précédemment observé avec un inhibiteur de JAK2 (fedratinib) dans ce modèle murin [131]. Le fedratinib induisait une diminution de la splénomégalie sans pour autant agir sur la fibrose [134]. Ce modèle nous a toutefois permis de

mettre en évidence l'efficacité de l'OGX-427 non seulement sur la splénomégalie mais également sur l'HEM.

Nous avons obtenu ces derniers jours de nouvelles données dans le modèle murin *JAK2V617F* traité lors de la phase MF (12 semaines post greffe) nous permettant aujourd'hui de répondre plus clairement à l'implication de HSP27 dans la fibrose médullaire. En effet, après 10 semaines de traitement à l'OGX-427, nous avons observé une diminution de la fibrose réticulinique médullaire des souris traitées à l'OGX-427 en comparaison avec les souris contrôles (**Figure 41**). De plus, nous avons observé une diminution de l'hyperleucocytose et de la thrombocytose accompagnée d'une diminution de la splénomégalie (résultats non montrés). L'ensemble de ces données confirme ainsi le bénéfice potentiel de l'inhibition de HSP27 dans le processus fibrotique de la MF comme dans la fibrose pulmonaire idiopathique où elle est une cible thérapeutique intéressante. Ces résultats obtenus à partir d'une cohorte de petite taille de souris (n=5 dans chaque groupe) doivent néanmoins être confirmés sur de plus grands échantillons.

Au vu des données de la littérature et de l'ensemble de nos résultats, nous pensons que HSP27 est directement impliquée dans les mécanismes conduisant à l'établissement d'une fibrose médullaire, notamment de par son rôle au sein de la lignée mégacaryocytaire. De plus, nous suggérons que la fibrose, puisse renforcer ce mécanisme par l'intermédiaire de HSP27, en provoquant la libération de facteurs de croissance pro-fibrosant dans le milieu extracellulaire comme par exemple le PGDF par les plaquettes. Pour confirmer ses hypothèses, une étude approfondie du rôle de HSP27 dans les processus de fibrose dans le contexte de la MF devrait être prochainement engagée dans l'équipe. Même si le processus fibrotique est un composant très important de l'évolution de la pathologie, aucun inhibiteur ciblant directement la fibrose n'a pu, à l'heure actuelle, obtenir d'autorisation de mise sur le marché. En ce sens, l'OGX 427 pourrait représenter une nouvelle opportunité thérapeutique.

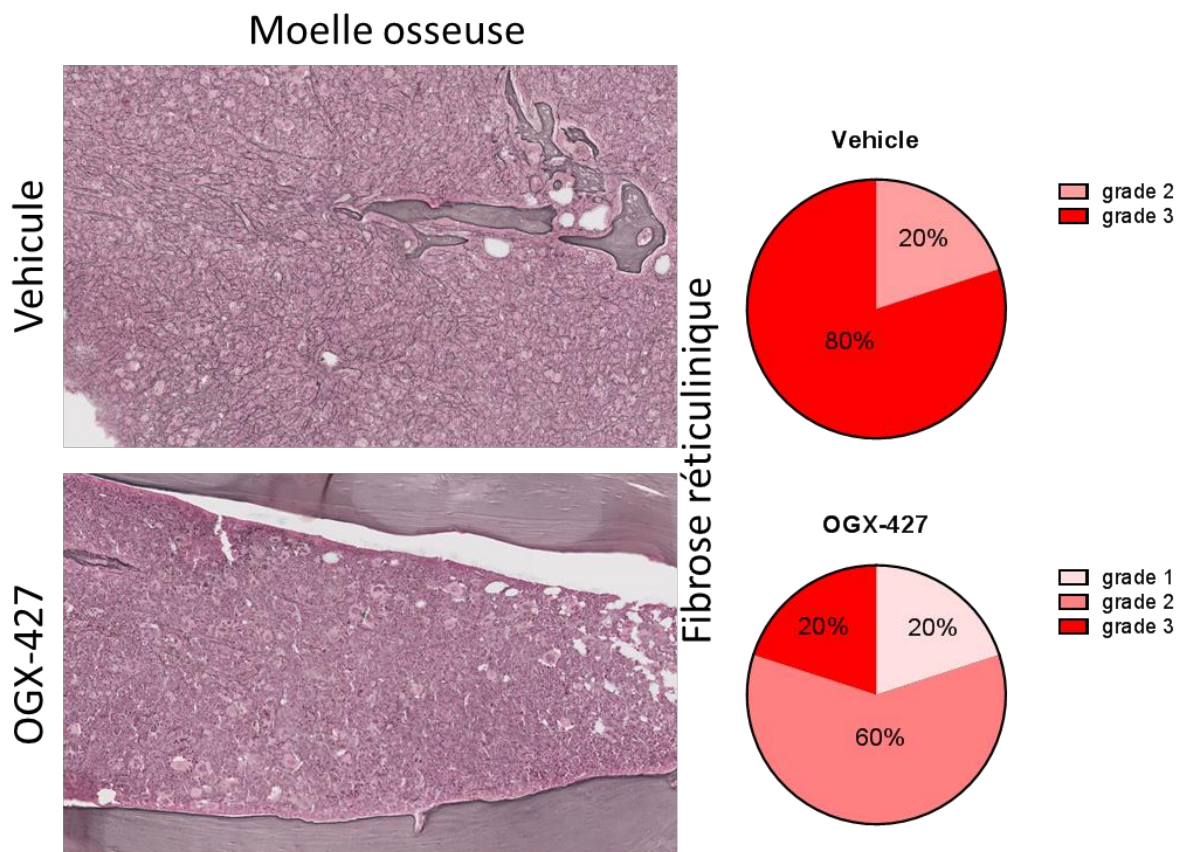


Figure 41 : l'OGX-427 diminue la fibrose réticulinique dans la moelle des souris *JAK2V617F*

Panel de Gauche Coupe de moelle osseuse de souris *JAK2V617F* montrant diminution de quantité de fibres de réticulines pour les souris traitées par l'OGX-427. Coloration au trichrome de Masson. Les images ont été obtenues par scanner. **Panel de droite** : Evaluation par grade de la fibrose des 10 animaux euthanasiés. Les diagrammes représentant le pourcentage d'animaux, en rose ayant un grade 1 (Quelques fibres fines isolées et/ou foyers de fibres fines en réseau), en rose foncé ayant un grade 2 (réseau diffus de fibres fines) et en rouge ayant un grade 3 (réseau diffus de fibres fines et épaisses).

✓ **HSP27 est un nouvel acteur de la signalisation JAK2/STAT5**

HSP27 est un chaperon moléculaire dynamique, ATP indépendant et acteur de nombreux processus physio-pathologiques tels que la survie, la différenciation, la prolifération des cellules normales ou cancéreuses ainsi que l'apoptose cellulaire [252], [326]–[328].

Mes travaux de thèse ont montré la capacité de HSP27 à interférer sur la prolifération (**Figure 27**) des cellules leucémiques mutées pour *JAK2V617F*. D'un point de vue mécanistique, nous montrons que HSP27 interagit avec deux protéines clés de la physiopathologie des NMP que sont JAK2 et STAT5 et ce, par trois différentes techniques (**Figure 33-35**) ainsi que la diminution de l'expression de HSP27 impacte la phosphorylation de STAT5 et l'interaction de JAK2 et STAT5 dans les cellules *JAK2V617F* (**Figures 31 et 35**).

HSP27 a déjà été identifiée pour interagir avec des facteurs de transcription STATs tels que STAT3 et STAT2 dans les contextes du cancer de la vessie, de la prostate et du sein [285], [329]. Nos résultats confirment donc la possibilité de HSP27 à interagir avec une protéine STAT dans le contexte de la signalisation *JAK2V617F* et montrent que la déplétion de HSP27 affecte la phosphorylation de STAT5.

Dans les cellules cancéreuses de l'utérus (HeLa), la déplétion constitutive de HSP27 a été identifiée pour avoir un rôle sur la diminution de la phosphorylation des STATs et plus particulièrement de STAT3 et STAT2 [329]. Dans les cellules leucémiques *JAK2V617F* déplétées pour HSP27, nous n'avons pas observé de modification de la phosphorylation ni de l'expression de STAT3, un facteur de transcription également important pour la pathogenèse de la MF. En revanche, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de STAT5. STAT3 n'étant pas modulé par HSP27, ces résultats pourraient expliquer pourquoi la déplétion de HSP27 n'affecte pas totalement la prolifération des cellules *JAK2V617F* (**Figure 27**).

De plus, nous supposons que HSP27 qui est majoritairement sous forme phosphorylée (données du laboratoire) dans les lignées *JAK2V617F*, pourrait privilégier une interaction avec STAT5 plutôt qu'avec STAT3. Ces résultats, concordant avec les données de la littérature concernant sa capacité à moduler son interactome, confirment que HSP27 agit comme un censeur intracellulaire afin d'adapter sa structure tridimensionnelle pour interagir avec des partenaires appropriés [244].

Les mécanismes de régulation de la formation/stabilisation de JAK2 et STAT5 sont encore mal compris. On peut tout de même noter que l'interaction de JAK2 avec les STATs nécessite l'intervention de protéines adaptatrices tels que RACK1 et STIP1 (le co-chaperon de HSP70 et HSP90) pour faciliter le recrutement des protéines au récepteur et l'amorçage de la voie de signalisation [38], [39]. D'après nos expériences d'essai de proximité en absence de HSP27, nous pensons que HSP27 pourrait aussi être un chaperon moléculaire du complexe JAK2 et STAT5 en favorisant sa stabilité et/ou sa formation (**Figure 35**).

L'ensemble de ses données montre que HSP27 est un nouvel acteur de la signalisation JAK2/STAT5 et explique en partie les bénéfices obtenus quant à l'utilisation de l'OGX-427 dans les modèles murins de MF.

✓ HSP27 et l'inflammation dans la MF

Récemment, il a été montré que l'inflammation chronique avait des conséquences importantes dans la physiopathologie de la MF, où la production des ROS jouerait un rôle central dans le développement et la progression de la pathologie [330]. Marty et ses collaborateurs ont montré que la kinase JAK2 mutée *JAK2V617F* était majoritairement responsable de la production de ROS dans les cellules de NMP ce qui favoriserait la prolifération cellulaire [121]. De plus, les cellules de patients MF présentent un taux élevé de ROS, suggérant que l'élimination de ces dérivés n'est pas optimale dans ces cellules mutantes.

HSP27 est connue pour avoir un rôle antioxydant. Cette fonction est dépendante de son statut de phosphorylation [331]. En effet, il a été montré que HSP27 diminuait la production et la quantité intracellulaire de ROS en modulant entre autre l'activité d'enzymes anti-oxydantes comme la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et en augmentant la quantité de glutathion intracellulaire, lorsque HSP27 est sous forme de gros oligomères [246][258]. A l'inverse, la forme phosphorylée de la protéine perd sa capacité anti-oxydante.

D'après les données de notre laboratoire, HSP27 est majoritairement phosphorylée dans les lignées mutées pour *JAK2V617F* en comparaison avec d'autres lignées leucémiques (données non montrées). En accord avec ces résultats, une augmentation de la phosphorylation de HSP27 a déjà été observée dans les MK de patients MF secondairement à l'activation de la voie de signalisation des MAPKs [299]. Sachant que l'activation constitutive de la voie de JAK2 est connue pour induire la signalisation des MAPKs dont la kinase p38, nous supposons que l'activation de cette signalisation pourrait être, comme dans les MK de patients, responsable de la phosphorylation de HSP27 dans les lignées *JAK2V617F*. Pour cause, la principale voie de phosphorylation de HSP27 n'est autre que la voie de la p38 MAPK et plus particulièrement de la MAPKAP Kinase 2/3 [241]. Hormis l'activation des voies de phosphorylation, il se pourrait que la déphosphorylation de HSP27 soit également altérée dans les lignées *JAK2V617F*. En effet, une étude a identifié la phosphatase privilégiée de HSP27 nommée PP2A, comme étant réprimée dans les cellules *JAK2V617F* [332].

Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'activation constitutive de JAK2 favorise la phosphorylation de HSP27 (via la voie p38MAPK et l'inhibition de PP2A) empêchant ainsi HSP27 « non phosphorylée » de pallier au stress oxydant. Ce qui permettrait d'expliquer en partie le

taux élevé de ROS dans cellules mutantes pour *JAK2V617F* malgré un taux intracellulaire élevé de HSP27.

Une étude des effets de la déplétion de HSP27 et de l'inhibition de la voie p38MAPK sur le niveau de la production des ROS dans les cellules *JAK2V617F* ainsi que les effets d'agents anti et pro-oxydants sur la phosphorylation de HSP27 permettrait de mieux caractériser l'implication de HSP27 dans ce contexte inflammatoire. Nous avons débuté cette étude pour laquelle nous avons obtenus des données encourageantes. Cependant, nous n'avons pas pu approfondir ce travail dans les temps impartis de la thèse (**voir résultats en annexe 4**).

L'ensemble de ces données converge vers une implication de HSP27 dans l'inflammation chronique, classiquement observée dans les NMP, et suggère une nouvelle piste thérapeutique pour la MF, qui prendrait en compte la modulation du statut de phosphorylation de HSP27.

✓ OGX-427, un bon candidat thérapeutique pour la MF ?

En ce qui concerne la thérapie de la MF, il n'existe aujourd'hui aucun traitement curatif hormis l'allogreffe de moelle osseuse [150]. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de JAK2, bien que bénéfiques sur les symptômes, n'a eu que peu d'effet sur le cours de la maladie puisqu'il n'y a pas de modification significative de la MF, et que la survie n'est pas améliorée.

Plus récemment, des inhibiteurs de la protéine de choc thermique HSP90 - connue pour stabiliser JAK2- ont été étudiés et sont actuellement en cours d'essai clinique de phase II pour les NMP. Si l'inhibition de HSP90 en combinaison avec des inhibiteurs de JAK2 a permis d'améliorer leur efficacité, une augmentation compensatoire d'autres HSPs a été observée [333] ce qui pourrait provoquer des phénomènes de résistance et conduire à un échec thérapeutique. De façon très intéressante, nous montrons ici que l'OGX-427 n'induisait pas d'expression compensatoire des autres HSP70 et HSP90 (**Figure 26**) dans les lignées leucémiques humaines mutantes ou non pour JAK2 ainsi qu'*in vivo* contrairement aux inhibiteurs de HSP90 [59].

Concernant son efficacité *in vivo*, une étude de la balance toxicité/efficacité de l'OGX-427 avait été réalisée dans le modèle TPO^{high} en première instance. Nous avons relevé qu'à des doses élevées en inhibiteur (20mg/kg), une mortalité était observée dans le modèle TPO^{high} (résultats

non montrés). Au vu de ces premières données, nous avons choisi de diminuer les concentrations administrées chez les animaux. Nos résultats ont montré dans le modèle TPO^{high} qu'à 10 mg/kg pendant 4 semaines, le traitement à l'OGX-427 n'induisait pas de toxicité *in vivo* et garantissait une efficacité d'inhibition de HSP27. Nous avons ainsi pu étudier l'effet de la déplétion de HSP27 chez l'animal.

Dans ce contexte, nous avons pu démontrer les effets à long terme d'un traitement à l'OGX-427. Nous n'avons pas observé d'effet rebond du traitement ni de toxicité à la posologie administrée, ce qui semble très encourageant si une future utilisation chez le patient était envisagée. Les effets bénéfiques du traitement ont pu être confirmés dans un second modèle murin de souris *JAK2V617F*, renforçant considérablement la pertinence de nos résultats.

Grâce à nos récentes données, nous observons que l'OGX-427 induit la diminution de la splénomégalie, corrige la thrombocytose et la hyperleucocytose chez l'animal, et ce de manière concomitante avec une diminution de la fibrose médullaire. Ces résultats sont très encourageants et demandent à être reproduits et confirmés sur un plus grand nombre de souris, voire dans d'autres modèles de MF, par exemple liés aux mutations de MPL.

Chez l'homme l'OGX-427 n'a pour l'instant pas été évalué dans d'autres cancers non solides mais a montré des effets bénéfiques dans les cancers solides, ce qui lui a permis de passer la barrière des essais cliniques. Les études cliniques d'escalade de doses de phase I, ont pu montrer que le traitement à l'OGX-427, administré quotidiennement, était très bien toléré chez les patients atteints de cancer de la prostate, du sein, de l'ovaire et du poumon et de la vessie et ce même à de fortes doses (1000 mg) [297]. Le composé est actuellement en phase clinique II pour les cancers du poumon, de la prostate et de la vessie (<http://oncogenex.com/apatorsen-ogx-427>).

Nous pensons que l'OGX-427 pour être associé à un autre traitement afin d'optimiser ses effets, comme c'est le cas pour d'autres inhibiteurs. La combinaison de l'OGX-427 avec le ruxolitinib ou le PU-H71 ont déjà été testées par nos soins dans le modèle TPO^{high} et nous n'avons pas observé d'effet synergique de ces deux combinaisons. Il reste néanmoins à les tester dans d'autres modèles et en particulier le modèle *JAK2V617F*. Par ailleurs, d'autres combinaisons pourraient être étudiées.

Conclusions

Dans cette étude, nous avons montré que l'utilisation *in vivo* d'un oligonucléotide anti-sens spécifique de HSP27 (OGX-427), limitait la progression de la myélofibrose dans deux modèles murins de MF ayant en commun l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK2.

Nous avons démontré que l'administration d'un traitement à l'OGX-427 chez les souris qui développent une MF, était associée à la **réduction du poids de la rate et de l'hyperplasie mégacaryocytaire** de la rate et la moelle, deux caractéristiques de la maladie chez l'homme.

D'un point de vue moléculaire, nous montrons que HSP27, de par son rôle de chaperon moléculaire, **régulerait la signalisation JAK2/STAT5**, une voie de signalisation constitutivement activée et connue pour conduire à l'excès de prolifération des cellules clonales dans la MF.

D'un point de vue clinique, nous avons montré l'augmentation d'expression de HSP27 dans le sérum des patients ainsi que dans les cellules CD34⁺ circulantes de patients atteints de MF suggérant **l'intérêt de HSP27 en clinique pour la MF**.

En conclusion, nous mettons en évidence et ce pour la première fois, l'implication d'une petite protéine de choc thermique, HSP27, dans **la physiopathologie de la myélofibrose et son intérêt potentiel en thérapeutique** (schéma récapitulatif). L'OGX-427 déjà utilisé dans les études cliniques concernant le cancer de la prostate, du poumon et du pancréas, nous semble être un potentiel candidat pour le traitement de la MF et éventuellement chez les patients MF résistants aux thérapies conventionnelles [162], [334].

Schéma récapitulatif

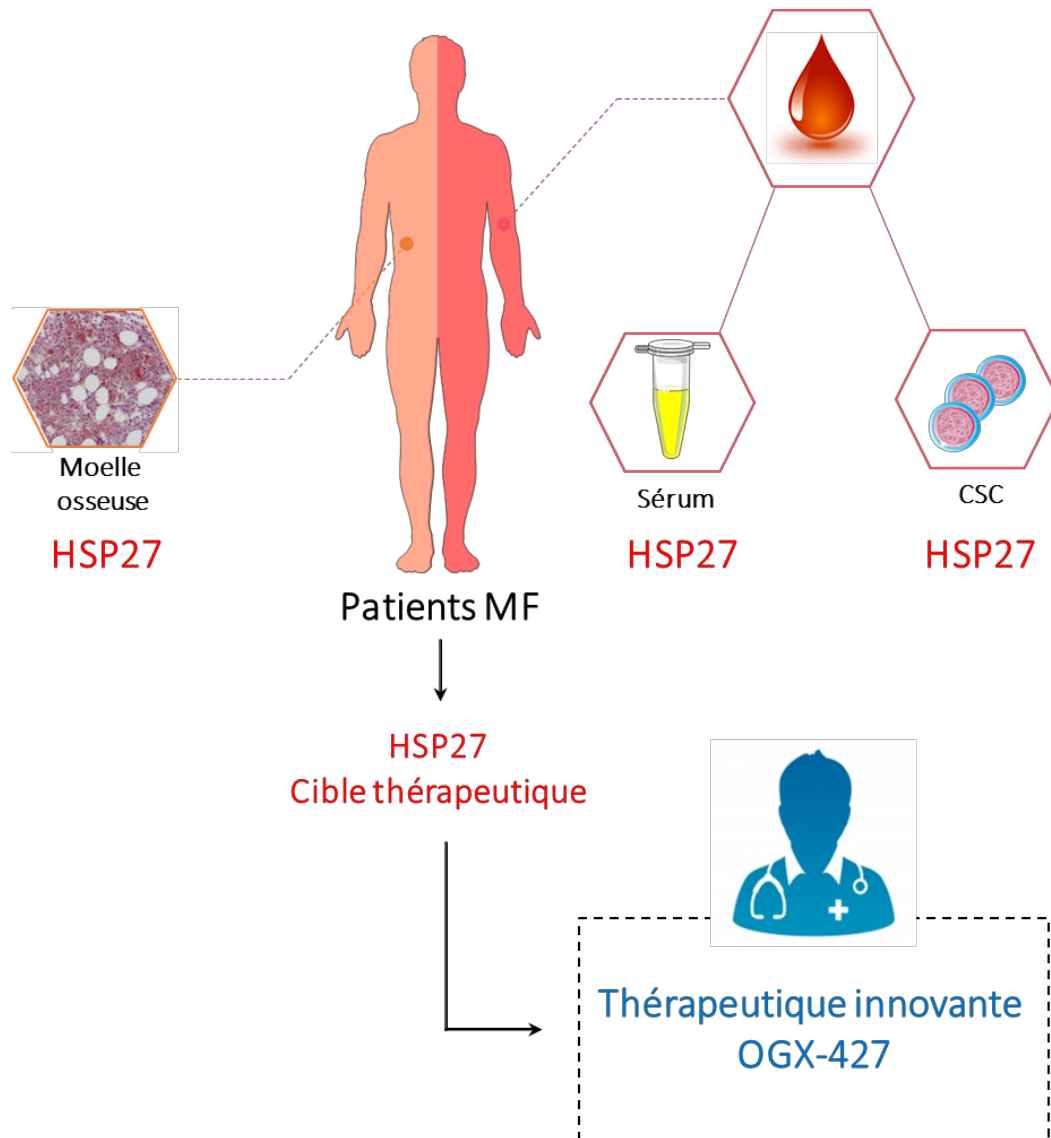


Figure 42 : HSP27 est une cible thérapeutique dans la MF

Les patients atteints de MF présentent une augmentation du taux de HSP27 dans la moelle osseuse et le sang périphérique (sérum et cellules souches circulantes CD34+ (CSC)). L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de HSP27 comme un oligonucléotide anti-sens ou OGX-427, présente aujourd'hui une nouvelle piste thérapeutique innovante.

Bibliographie

- [1] William Dameshek, "Some speculations on the myeloproliferative syndromes.," *Blood*, vol. 6, no. 4, pp. 372–5, 1951.
- [2] A. Tefferi and J. W. Vardiman, "Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms.," *Leukemia*, vol. 22, no. 1, pp. 14–22, 2008.
- [3] A. Tefferi, J. Thiele, and J. W. Vardiman, "The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: Order out of chaos," *Cancer*, vol. 115, no. 17, pp. 3842–3847, 2009.
- [4] J. W. Vardiman, "Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1+," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 132, no. 2, pp. 250–260, 2009.
- [5] P. J. Fialkow, R. J. Jacobson, and T. Papayannopoulou, "Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage," *Am. J. Med.*, vol. 63, no. 1, pp. 125–130, 1977.
- [6] J. D. Rowley, "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.," *Nature*, vol. 243, no. 5405, pp. 290–3, 1973.
- [7] J. Groffen, J. R. Stephenson, N. Heisterkamp, A. de Klein, C. R. Bartram, and G. Grosveld, "Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22," *Cell*, vol. 36, no. 1, pp. 93–99, 1984.
- [8] W. Vainchenker and R. Kralovics, "Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms," *Blood*, vol. 129, no. 6, p. blood-2016-10-695940, 2016.
- [9] R. Kralovics and R. C. Skoda, "Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders," *Blood Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–13, 2005.
- [10] E. Rumi and M. Cazzola, "Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms," *Blood*, vol. 129, no. 6, p. blood-2016-10-695957, 2016.
- [11] O. Moulard, J. Mehta, J. Fryzek, R. Olivares, U. Iqbal, and R. A. Mesa, "Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union," *Eur. J. Haematol.*, vol. 92, no. 4, pp. 289–297, 2014.
- [12] R. L. Levine and D. G. Gilliland, "ASH 50th anniversary review Myeloproliferative disorders Early investigation," *Hematology*, vol. 112, no. 6, pp. 2190–2198, 2008.
- [13] F. Passamonti and M. Maffioli, "Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual," *ASH Educ. Progr. B.*, vol. 2016, no. 1, pp. 534–542, 2016.
- [14] F. Passamonti, B. Mora, and M. Maffioli, "New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms," *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 23, no. 2, pp. 137–143, 2016.

- [15] F. Passamonti, M. Maffioli, M. Merli, and A. Ferrario, "Clinical predictors of outcome in MPN," *Hematol. Clin. NA*, vol. 26, no. 5, pp. 1101–1116, 2012.
- [16] G. Bonicelli, K. Abdulkarim, M. Mounier, P. Johansson, C. Rossi, V. Jooste, B. Andreasson, M. Maynadié, and F. Girodon, "Leucocytosis and thrombosis at diagnosis are associated with poor survival in polycythaemia vera: A population-based study of 327 patients," *Br. J. Haematol.*, vol. 160, no. 2, pp. 251–254, 2013.
- [17] L. Boiocchi, S. Mathew, U. Gianelli, A. Iurlo, T. Radice, S. Barouk-Fox, D. M. Knowles, and A. Orazi, "Morphologic and cytogenetic differences between post-polycythemic myelofibrosis and primary myelofibrosis in fibrotic stage," *Mod Pathol*, vol. 26, no. 12, pp. 1577–1585, 2013.
- [18] F. Passamonti, B. Mora, T. Giorgino, P. Guglielmelli, M. Cazzola, M. Maffioli, A. Rambaldi, M. Caramella, R. Komrokji, J. Gotlib, J. J. Kiladjan, F. Cervantes, T. Devos, F. Palandri, V. De Stefano, M. Ruggeri, R. Silver, G. Benevolo, F. Albano, D. Caramazza, E. Rumi, M. Merli, D. Pietra, R. Casalone, T. Barbui, L. Pieri, and A. M. Vannucchi, "Driver mutations' effect in secondary myelofibrosis: an international multicenter study based on 781 patients," *Leukemia*, vol. 5, no. November 2016, pp. 1–4, 2016.
- [19] M. Yogarajah and A. Tefferi, "Leukemic Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: A Literature Review on Risk, Characteristics, and Outcome," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 92, no. 7, pp. 1118–1128, 2017.
- [20] K. Abdulkarim, F. Girodon, P. Johansson, M. Maynadié, J. Kutti, P. M. Carli, E. Bovet, and B. Andréasson, "AML transformation in 56 patients with Ph- MPD in two well defined populations," *Eur. J. Haematol.*, vol. 82, no. 2, pp. 106–111, 2009.
- [21] C. S. Tam, R. M. Nussenzveig, U. Popat, C. E. Bueso-ramos, D. A. Thomas, J. A. Cortes, R. E. Champlin, S. E. Ciurea, T. Manshouri, S. M. Pierce, and M. Hagop, "The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms," *Blood*, vol. 112, no. 5, pp. 1628–1638, 2011.
- [22] A. Tefferi, E. Rumi, G. Finazzi, H. Gisslinger, A. M. Vannucchi, F. Rodeghiero, M. L. Randi, R. Vaidya, M. Cazzola, A. Rambaldi, B. Gisslinger, L. Pieri, M. Ruggeri, I. Bertozzi, N. H. Sulai, I. Casetti, A. Carobbio, G. Jeryczynski, D. R. Larson, L. Müllauer, A. Pardanani, J. Thiele, F. Passamonti, and T. Barbui, "Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study," *Leukemia*, vol. 27, no. 9, pp. 1874–1881, 2013.
- [23] A. D. E. A. Vardiman JW, Thiele J, "The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.," *Blood*, vol. 114, no. 5, pp. 937–952, 2008.
- [24] A. Iurlo, U. Gianelli, D. Cattaneo, J. Thiele, and A. Orazi, "Impact of the 2016 revised who criteria for myeloproliferative neoplasms, unclassifiable: Comparison with the 2008 version," *Am. J. Hematol.*, pp. 48–51, 2017.
- [25] G. Barosi, R. A. Mesa, J. Thiele, F. Cervantes, P. J. Campbell, S. Verstovsek, B. Dupriez, R. L. Levine, F. Passamonti, J. Gotlib, J. T. Reilly, a M. Vannucchi, C. a Hanson, L. a Solberg, A. Orazi, and A. Tefferi, "Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the

- International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment.,” *Leukemia*, vol. 22, pp. 437–438, 2008.
- [26] R. Kralovics, F. Passamonti, A. S. Buser, S.-S. Teo, R. Tiedt, J. R. Passweg, A. Tichelli, M. Cazzola, and R. C. Skoda, “A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.,” *N Engl J Med*, vol. 352, no. 17, pp. 1779–1790, 2005.
- [27] J. E. Baxter, L. M. Scott, P. J. Campbell, C. East, N. Fourouclas, S. Swanton, G. S. Vassiliou, A. J. Bench, E. M. Boyd, N. Curtin, M. a Scott, W. N. Erber, and A. R. Green, “Mechanisms of Disease Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders,” *Lancet*, vol. 365, no. 9464, pp. 1054–1061, 2005.
- [28] Y. Pikman, B. H. Lee, T. Mercher, E. McDowell, B. L. Ebert, M. Gozo, A. Cuker, G. Wernig, S. Moore, I. Galinsky, D. J. DeAngelo, J. J. Clark, S. J. Lee, T. R. Golub, M. Wadleigh, D. G. Gilliland, and R. L. Levine, “MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia,” *PLoS Med.*, vol. 3, no. 7, pp. 1140–1151, 2006.
- [29] T. Klampfl, H. Gisslinger, A. S. Harutyunyan, H. Nivarthi, E. Rumi, J. D. Milosevic, N. C. C. Them, T. Berg, B. Gisslinger, D. Pietra, D. Chen, G. I. Vladimer, K. Bagienski, C. Milanese, I. C. Casetti, E. Sant’Antonio, V. Ferretti, C. Elena, F. Schischlik, C. Cleary, M. Six, M. Schalling, A. Schönegger, C. Bock, L. Malcovati, C. Pascutto, G. Superti-Furga, M. Cazzola, and R. Kralovics, “Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 25, pp. 2379–90, Dec. 2013.
- [30] J. Nangalia, C. E. Massie, E. J. Baxter, F. L. Nice, G. Gundem, D. C. Wedge, E. Avezov, J. Li, K. Kollmann, D. G. Kent, a Aziz, a L. Godfrey, J. Hinton, I. Martincorena, P. Van Loo, a V Jones, P. Guglielmelli, P. Tarpey, H. P. Harding, J. D. Fitzpatrick, C. T. Goudie, C. a Ortmann, S. J. Loughran, K. Raine, D. R. Jones, a P. Butler, J. W. Teague, S. O’Meara, S. McLaren, M. Bianchi, Y. Silber, D. Dimitropoulou, D. Bloxham, L. Mudie, M. Maddison, B. Robinson, C. Keohane, C. Maclean, K. Hill, K. Orchard, S. Tauro, M.-Q. Du, M. Greaves, D. Bowen, B. J. P. Huntly, C. N. Harrison, N. C. P. Cross, D. Ron, a M. Vannucchi, E. Papaemmanuil, P. J. Campbell, and a R. Green, “Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 25, pp. 2391–405, Dec. 2013.
- [31] E. Rumi, D. Pietra, C. Pascutto, P. Guglielmelli, A. Martínez-Trillos, I. Casetti, D. Colomer, L. Pieri, M. Pratorona, G. Rotunno, E. Sant’Antonio, M. Bellini, C. Cavalloni, C. Mannarelli, C. Milanese, E. Boveri, V. Ferretti, C. Astori, V. Rosti, F. Cervantes, G. Barosi, A. M. Vannucchi, and M. Cazzola, “Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis,” *Blood*, vol. 124, no. 7, pp. 1062–1069, 2014.
- [32] K. Yamaoka, P. Saharinen, M. Pesu, V. E. T. Holt, O. Silvennoinen, and J. J. O’Shea, “The Janus kinases (Jaks).,” *Genome Biol.*, vol. 5, no. 12, p. 253, 2004.
- [33] A. V Villarino, Y. Kanno, and J. J. O. Shea, “Mechanisms and consequences of Jak – STAT signaling in the immune system,” *Nat Immunol*, vol. 18, no. 4, 2017.
- [34] W. Vainchenker, A. Dusa, and S. N. Constantinescu, “JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 19, no. 4, pp. 385–393, 2008.
- [35] W. Vainchenker and S. N. Constantinescu, “JAK/STAT signaling in hematological

- malignancies," *Oncogene*, vol. 32, pp. 2601–2613, 2013.
- [36] S. S. Watowich, H. Wu, M. Socolovsky, U. Klingmuller, S. N., and H. F. Lodish, "Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development," *Biomed. Res.*, pp. 91–128, 1996.
- [37] D. E. Levy and J. E. J. Darnell, "Stats: transcriptional control and biological impact.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 9, pp. 651–662, 2002.
- [38] R. G. Collum, S. Brutsaert, G. Lee, and C. Schindler, "A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 18, pp. 10120–5, 2000.
- [39] A. Usacheva, R. Smith, R. Minshall, G. Baida, S. Seng, E. Croze, and O. Colamonici, "The WD Motif-containing Protein Receptor for Activated Protein Kinase C (RACK1) is Required for Recruitment and Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 through the Type I Interferon Receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 25, pp. 22948–22953, 2001.
- [40] A. Harpur, A. Andres, A. Ziemiecki, R. Aston, and A. Wilks, "JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases.," *Oncogene*, vol. 7, no. 7, pp. 1347–1353, 1992.
- [41] H. Neubauer, A. Cumano, M. Müller, H. Wu, U. Huffstadt, and K. Pfeffer, "Jak2 Deficiency Defines an Essential Developmental Checkpoint in Definitive Hematopoiesis," *Cell*, vol. 93, no. 3, pp. 397–409, 1998.
- [42] J. Grisouard, H. Hao-Shen, S. Dirnhofer, K. U. Wagner, and R. C. Skoda, "Selective deletion of Jak2 in adult mouse hematopoietic cells leads to lethal anemia and thrombocytopenia," *Haematologica*, vol. 99, no. 4, pp. 1–3, 2014.
- [43] S. C. Meyer, M. D. Keller, B. A. Woods, L. M. Lafave, L. Bastian, M. Kleppe, N. Bhagwat, S. Marubayashi, and R. L. Levine, "Genetic studies reveal an unexpected negative regulatory role for Jak2 in thrombopoiesis," *Blood*, vol. 124, no. 14, pp. 2280–2285, 2014.
- [44] H. Akada, S. Akada, R. E. Hutchison, K. Sakamoto, K. U. Wagner, and G. Mohi, "Critical role of Jak2 in the maintenance and function of adult hematopoietic stem cells," *Stem Cells*, vol. 32, no. 7, pp. 1878–1889, 2014.
- [45] E. Rumi, D. Pietra, V. Ferretti, T. Klampfl, A. S. Harutyunyan, D. Jelena, N. C. C. Them, T. Berg, C. Elena, I. C. Casetti, C. Milanesi, S. Antonio, M. Bellini, E. Fugazza, M. C. Renna, E. Boveri, C. Astori, C. Pascutto, R. Kralovics, M. Cazzola, and E. S. Antonio, "JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes," *Blood*, vol. 123, no. 10, pp. 1544–1551, 2014.
- [46] L. Shang and T. B. Tomasi, "The heat shock protein 90-CDC37 chaperone complex is required for signaling by types I and II interferons.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 4, pp. 1876–84, Jan. 2006.
- [47] C.-L. Tsai, A. Chao, S.-M. Jung, C.-N. Tsai, C.-Y. Lin, S.-H. Chen, S.-C. Sue, T.-H. Wang, H.-S. Wang, and C.-H. Lai, "Stress-induced phosphoprotein-1 maintains the stability of JAK2 in cancer cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 31, 2016.

- [48] U. Klingmüller, U. Lorenz, L. C. Cantley, B. G. Neel, and H. F. Lodish, "Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals," *Cell*, vol. 80, no. 5, pp. 729–738, 1995.
- [49] Y. Chen, R. Wen, S. Yang, J. Schuman, E. E. Zhang, T. Yi, G. S. Feng, and D. Wang, "Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 19, pp. 16520–16527, 2003.
- [50] J. Chen, W.-M. Yu, K. D. Bunting, and C.-K. Qu, "A negative role of SHP-2 tyrosine phosphatase in growth factor-dependent hematopoietic cell survival.," *Oncogene*, vol. 23, no. 20, pp. 3659–3669, 2004.
- [51] K. Shuai and B. Liu, "Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 11, pp. 900–911, 2003.
- [52] W. Tong and H. F. Lodish, "Lnk Inhibits Tpo–mpl Signaling and Tpo-mediated Megakaryocytopoiesis," *J. Exp. Med. J. Exp. Med*, vol. 95691200, no. 5, pp. 569–580, 2004.
- [53] W. Tong, J. Zhang, and H. F. Lodish, "Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways," *Blood*, vol. 105, no. 12, pp. 4604–4612, 2005.
- [54] S. J. Saur, V. Sangkhae, A. E. Geddis, K. Kaushansky, and I. S. Hitchcock, "Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl," *Blood*, vol. 115, pp. 1254–1263, 2010.
- [55] R. L. Levine, M. Loriaux, B. J. P. Huntly, M. L. Loh, M. Beran, E. Stoffregen, R. Berger, J. J. Clark, S. G. Willis, K. T. Nguyen, N. J. Flores, E. Estey, N. Gattermann, S. Armstrong, a T. Look, J. D. Griffin, O. a Bernard, M. C. Heinrich, D. G. Gilliland, B. Druker, and M. W. N. Deininger, "The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia , but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, vol. 106, no. 10, pp. 3377–3379, 2005.
- [56] C. James, V. Ugo, J.-P. Le Couédic, J. Staerk, F. Delhommeau, C. Lacout, L. Garçon, H. Raslova, R. Berger, A. Bennaceur-Griscelli, J. L. Villeval, S. N. Constantinescu, N. Casadevall, and W. Vainchenker, "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera.," *Nature*, vol. 434, no. 7037, pp. 1144–1148, 2005.
- [57] S. Oku, K. Takenaka, T. Kuriyama, K. Shide, T. Kumano, Y. Kikushige, S. Urata, T. Yamauchi, C. Iwamoto, H. K. Shimoda, T. Miyamoto, K. Nagafuji, J. Kishimoto, K. Shimoda, and K. Akashi, "JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation.," *Br. J. Haematol.*, vol. 150, no. 3, pp. 334–44, 2010.
- [58] M. Hookham, J. Elliott, Y. Suessmuth, J. Staerk, a Ward, W. Vainchenker, M. Percy, M. McMullin, S. Constantinescu, and J. Johnston, "The myeloproliferative disorder associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3," *Blood*, vol. 109, no. 11, pp. 4924–4929, 2007.
- [59] S. Marubayashi, P. Koppikar, T. Taldone, O. Abdel-wahab, N. West, N. Bhagwat, E. Caldas-ropes, K. N. Ross, M. Gönen, A. Gozman, J. H. Ahn, A. Rodina, O. Ouerfelli, G. Yang, C. Hedvat, J. E. Bradner, G. Chiosis, and R. L. Levine, "HSP90 is a therapeutic target in JAK2-

- dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 10, pp. 3578–3593, 2010.
- [60] F. J. de Sauvage, J. L. Villeval, and R. a Shivdasani, "Regulation of megakaryocytopoiesis and platelet production: lessons from animal models.," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 131, no. 6, pp. 496–501, Jul. 1998.
- [61] K. Kaushansky, S. Lok, R. D. Holly, V. C. Broudy, N. Lin, M. C. Bailey, J. W. Forstrom, M. M. Buddle, P. J. Oort, and F. S. Hagen, "Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin.," *Nature*, vol. 369, pp. 568–571, 1994.
- [62] B. P. J. Fielder, A. L. Gurney, E. Stefanich, M. Marian, M. W. Moore, K. Carver-moore, and F. J. De Sauvage, "Regulation of Thrombopoietin Levels by c-mpl-Mediated Binding to Platelets," *Blood*, vol. 87, no. 6, pp. 2154–2161, 1996.
- [63] C. Cleyrat, A. Darehshouri, M. P. Steinkamp, M. Vilaine, B. Daniela, M. H. Ellisman, S. Hermouet, and B. S. Wilson, "Mpl traffics to the cell surface through conventional and unconventional routes," *Traffics*, vol. 15, no. 9, pp. 961–982, 2014.
- [64] J. G. Drachman and K. Kaushansky, "Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 6, pp. 2350–2355, 1997.
- [65] C. Marty, R. Chaligné, C. Lacout, S. N. Constantinescu, W. Vainchenker, and J. L. Villeval, "Ligand-independent thrombopoietin mutant receptor requires cell surface localization for endogenous activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 18, pp. 11781–11791, 2009.
- [66] J. Villeval, K. Cohen-solal, M. Tulliez, S. Giraudier, J. Guichard, A. Burstein, E. M. Cramer, W. Vainchenker, and F. Wendling, "High Thrombopoietin Production by Hematopoietic Cells Induces a Fatal Myeloproliferative Syndrome in Mice," *Blood*, vol. 90, no. 11, pp. 4369–4383, 1997.
- [67] M. Michalak, J. Groenendyk, E. Szabo, L. I. Gold, and M. Opas, "Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum," *Biochem J*, vol. 417, no. 3, pp. 651–666, 2009.
- [68] C. Marty, C. Pecquet, H. Nivarthi, M. El-Khoury, I. Chachoua, M. Tulliez, J. L. Villeval, H. Raslova, R. Kralovics, S. N. Constantinescu, I. Plo, and W. Vainchenker, "Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis," *Blood*, vol. 127, no. 10, pp. 1317–1324, 2016.
- [69] I. Chachoua, C. Pecquet, M. El-Khoury, H. Nivarthi, R. I. Albu, C. Marty, V. Gryshkova, J. P. Defour, G. Vertenoel, A. Ngo, A. Koay, H. Raslova, P. J. Courtoy, M. L. Choong, I. Plo, W. Vainchenker, R. Kralovics, and S. N. Constantinescu, "Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants," *Blood*, vol. 127, no. 10, pp. 1325–1335, 2016.
- [70] M. Garbati, C. A. Welgan, S. H. Landefeld, L. F. Newell, A. Agarwal, J. B. Dunlap, T. K. Chourasia, L. Hyunjung, E. T. Elferich, R. Rattray, M. J. Cascio, R. D. Press, G. Bagby, J. W. Tyner, B. J. Druker, and K.-H. T. Dao, "Mutant calreticulin-expressing cells induce monocyte hyperreactivity through a paracrine mechanism," *Am. J. Hematol.*, vol. 91, no.

2, pp. 211–219, 2016.

- [71] A. M. Vannucchi, T. L. Lasho, P. Guglielmelli, F. Biamonte, A. Pardanani, A. Pereira, C. Finke, J. Score, N. Gangat, C. Mannarelli, R. P. Ketterling, G. Rotunno, R. A. Knudson, M. C. Susini, R. R. Laborde, A. Spolverini, A. Pancrazzi, L. Pieri, R. Manfredini, E. Tagliafico, R. Zini, A. Jones, K. Zoi, A. Reiter, A. Duncombe, D. Pietra, E. Rumi, F. Cervantes, G. Barosi, M. Cazzola, N. C. P. Cross, and A. Tefferi, “Mutations and prognosis in primary myelofibrosis,” *Leukemia*, vol. 27, no. 9, pp. 1861–1869, 2013.
- [72] R. Hoffman and D. Rondelli, “Myeloproliferative Disorders Biology and Treatment of Primary Myelofibrosis,” *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, pp. 346–354, 2007.
- [73] A. Agarwal, K. Morrone, M. Bartenstein, Z. J. Zhao, A. Verma, and S. Goel, “Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis pathogenic mechanisms and the role of TGF- β ,” *Stem Cell Investig.*, vol. 3, p. 5, 2016.
- [74] C. Nielsen, H. S. Birgens, B. G. Nordestgaard, L. Kjaer, and S. E. Bojesen, “The JAK2 V617F somatic mutation, mortality and cancer risk in the general population.,” *Haematologica*, vol. 96, no. 3, pp. 450–3, 2011.
- [75] S. Koschmieder, T. I. Mughal, H. C. Hasselbalch, G. Barosi, P. Valent, J.-J. Kiladjan, G. Jerczynski, H. Gisslinger, J. S. Jutzi, H. L. Pahl, R. Hehlmann, A. Maria Vannucchi, F. Cervantes, R. T. Silver, and T. Barbui, “Myeloproliferative neoplasms and inflammation: whether to target the malignant clone or the inflammatory process or both.,” *Leukemia*, vol. 30, no. 5, pp. 1018–24, 2016.
- [76] C. Desterke, C. Martinaud, N. Ruzehaji, and M. C. Le Bousse-Kerdilès, “Inflammation as a keystone of bone marrow stroma alterations in primary myelofibrosis,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015.
- [77] A. Tefferi, “Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 33, pp. 8520–8530, 2005.
- [78] A. Tefferi, “Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management,” *Am. J. Hematol.*, vol. 88, pp. 141–150, 2013.
- [79] J. E. Noll, S. A. Williams, L. E. Purton, and A. C. W. Zannettino, “Tug of war in the haematopoietic stem cell niche: do myeloma plasma cells compete for the HSC niche?,” *Blood Cancer J.*, vol. 2, no. 9, p. e91, 2012.
- [80] L.-L. Mu, F. Ke, X.-L. Guo, J.-J. Cai, and D.-L. Hong, “Neoplasms in the bone marrow niches: disturbance of the microecosystem,” *Int. J. Hematol.*, pp. 1–8, 2017.
- [81] J. Lataillade, O. Pierre-louis, H. C. Hasselbalch, G. Uzan, J. Lataillade, O. Pierre-louis, H. C. Hasselbalch, G. Uzan, and C. Jasmin, “Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche ? From concept to evidence,” *Blood*, vol. 112, no. 8, pp. 3026–3035, 2008.
- [82] O. Leiva, S. Ng, S. Chitalia, A. Balduini, S. Matsuura, and K. Ravid, “The role of the extracellular matrix in primary myelofibrosis,” *Blood Cancer J*, vol. 7, 2017.
- [83] D. Bluteau, L. Lordier, A. Di Stefano, Y. Chang, H. Raslova, N. Debili, and W. Vainchenker,

- “Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7, no. SUPPL. 1, pp. 227–234, 2009.
- [84] G. Szalai, a. C. LaRue, and D. K. Watson, “Molecular mechanisms of megakaryopoiesis,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 63, no. 21, pp. 2460–2476, 2006.
- [85] S. O. Ciurea, D. Merchant, N. Mahmud, T. Ishii, Y. Zhao, W. Hu, E. Bruno, G. Barosi, M. Xu, R. Hoffman, and 1University, “Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 110, no. 9, pp. 986–993, 2007.
- [86] L. Centurione, A. Di Baldassarre, M. Zingariello, D. Bosco, V. Gatta, R. A. Rana, V. Langella, A. Di Virgilio, A. M. Vannucchi, and A. R. Migliaccio, “Increased and pathologic emperipoiesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1^{low} mice,” *Blood*, vol. 104, no. 12, pp. 3573–3580, 2004.
- [87] a Schmitt, H. Jouault, J. Guichard, F. Wendling, a Drouin, and E. M. Cramer, “Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis,” *Blood*, vol. 96, no. 4, pp. 1342–1347, 2000.
- [88] A. Nazha, J. D. Khoury, R. K. Rampal, and N. Daver, “Fibrogenesis in primary myelofibrosis: Diagnostic, clinical, and therapeutic implications,” *Oncologist*, vol. 20, no. 10, pp. 1154–1160, 2015.
- [89] J. P. Wallis and M. M. Reid, “Bone marrow fibrosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 42, no. 12, pp. 1253–4, 1989.
- [90] D. P. O’Malley, J. Sen, B. E. Juliar, and A. Orazi, “Evaluation of stroma in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome-affected bone marrows and correlation with CD4 counts,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 129, no. 9, pp. 1137–1140, 2005.
- [91] D. J. Kuter, B. Bain, G. Mufti, A. Bagg, and R. P. Hasserjian, “Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres,” *Br. J. Haematol.*, vol. 139, no. 3, pp. 351–362, 2007.
- [92] G. Hoermann, G. Greiner, and P. Valent, “Cytokine Regulation of Microenvironmental Cells in Myeloproliferative Neoplasms,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015.
- [93] H. Castro-Malaspina and S. Jhanwar, “Properties of myelofibrosis-derived fibroblasts,” *Prog Clin Biol Res.*, vol. 154, pp. 307–322, 1984.
- [94] C. Tomuleasa, S. Selicean, G. Gafencu, B. Petrushev, L. Pop, C. Berce, A. Jurj, A. Trifa, A. M. Rosu, S. Pasca, L. Magdo, M. Zdrenghea, D. Dima, A. Tanase, I. Frinc, A. Bojan, I. Berindan-Neagoe, G. Ghiaur, and S. O. Ciurea, “Fibroblast dynamics as an in vitro screening platform for anti-fibrotic drugs in primary myelofibrosis,” *J. Cell. Physiol.*, no. March, pp. 1–12, 2017.
- [95] S. Badalucco, C. A. Di Buduo, R. Campanelli, I. Pallotta, P. Catarsi, V. Rosti, D. L. Kaplan, G. Barosi, M. Massa, and A. Balduini, “Involvement of TGF β 1 in autocrine regulation of proplatelet formation in healthy subjects and patients with primary myelofibrosis,” *Haematologica*, vol. 98, no. 4, pp. 514–517, 2013.
- [96] H. Chagraoui, E. Komura, M. Tulliez, S. Giraudier, W. Vainchenker, and F. Wendung,

- "Prominent role of TGF- β 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice," *Blood*, vol. 100, no. 10, pp. 3495–3503, 2002.
- [97] D. Lekovic, M. Gotic, R. Skoda, B. Beleslin-Cokic, N. Milic, O. Mitrovic-Ajtic, R. Nienhold, D. Sefer, T. Suboticki, M. Buac, D. Markovic, M. Diklic, and V. P. Cokic, "Bone marrow microvessel density and plasma angiogenic factors in myeloproliferative neoplasms: clinicopathological and molecular correlations," *Ann. Hematol.*, vol. 96, no. 3, pp. 393–404, 2017.
- [98] T. Yamamoto, O. Kozawa, K. Tanabe, S. Akamatsu, H. Matsuno, S. Dohi, and T. Uematsu, "Involvement of p38 MAP kinase in TGF-beta-stimulated VEGF synthesis in aortic smooth muscle cells.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 82, no. 4, pp. 591–598, 2001.
- [99] M. Steurer, H. Zoller, F. Augustin, D. Fong, S. Heiss, K. Strasser-Weippl, G. Gastl, and A. Tzankov, "Increased angiogenesis in chronic idiopathic myelofibrosis: vascular endothelial growth factor as a prominent angiogenic factor," *Hum. Pathol.*, vol. 38, no. 7, pp. 1057–1064, 2007.
- [100] U. Gianelli, C. Vener, P. R. Raviele, F. Savi, F. Somalvico, R. Calori, A. Iurlo, F. Radaelli, E. Fermo, P. Bucciarelli, S. Bosari, G. Coggi, and G. L. Deliliers, "VEGF expression correlates with microvessel density in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 128, no. 6, pp. 966–973, 2007.
- [101] H. Ni, G. Barosi, and R. Hoffman, "Quantitative evaluation of bone marrow angiogenesis in idiopathic myelofibrosis," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 126, no. 2, pp. 241–247, 2006.
- [102] O. Bock, G. Loch, U. Schade, G. Büsche, R. Von Wasielewski, B. Wiese, and H. Kreipe, "Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin," *Br. J. Haematol.*, vol. 130, no. 1, pp. 76–82, 2005.
- [103] H. Chagraoui, S. Sabri, C. Capron, J. L. Villeval, W. Vainchenker, and F. Wendling, "Expression of osteoprotegerin mRNA and protein in murine megakaryocytes," *Exp. Hematol.*, vol. 31, no. 11, pp. 1081–1088, 2003.
- [104] M. Massa, V. Rosti, I. Ramajoli, R. Campanelli, A. Pecci, G. Viarengo, V. Meli, M. Marchetti, R. Hoffman, and G. Barosi, "Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 24, pp. 5688–5695, 2005.
- [105] M. Xu, E. Bruno, J. Chao, S. Huang, G. Finazzi, S. M. Fruchtman, U. Popat, J. T. Prchal, G. Barosi, and R. Hoffman, "Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases," *Blood*, vol. 105, no. 11, pp. 4508–4515, 2005.
- [106] F. Passamonti, E. Rumi, D. Pietra, M. G. Della Porta, E. Boveri, C. Pascutto, L. Vanelli, L. Arcaini, S. Burcheri, L. Malcovati, M. Lazzarino, and M. Cazzola, "Relation between JAK2(V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders," *Blood*, vol. 107, no. 9, p. 3676 LP-3682, 2006.
- [107] L. Whitesell and S. L. Lindquist, "HSP90 and the chaperoning of cancer.," *Nat. Rev.*

- Cancer*, vol. 5, no. 10, pp. 761–772, 2005.
- [108] M. C. Yoder, “Embryonic hematopoiesis in mice and humans,” *Acta Paediatr.Suppl*, vol. 91, pp. 5–8, 2002.
- [109] H. Abdelouahab, Y. Zhang, M. Wittner, S. Oishi, E. Solary, W. Vainchenker, G. Barosi, and F. Louache, “CXCL12 / CXCR4 pathway is activated by oncogenic JAK2 in a PI3K-dependent manner,” *Oncotarget*, 2016.
- [110] M. a. Schroeder and J. F. DiPersio, “Mobilization of hematopoietic stem and leukemia cells,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 91, no. January, pp. 47–57, 2012.
- [111] X. Wang, S. Y. , Cho, C. S. Hu, D. Chen, J. Roboz, and R. Hoffman, “CXCL12 Influences the Development of Extramedullary Hematopoiesis in the Spleens of Myelofibrosis Patients,” *Exp Hematol*, vol. 43, no. 2, pp. 100–109, 2015.
- [112] C. Bogani, V. Ponziani, P. Guglielmelli, C. Desterke, V. Rosti, A. Bosi, M.-C. Le Bousse-Kerdilès, G. Barosi, and A. M. Vannucchi, “Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis.,” *Stem Cells*, vol. 26, no. 8, pp. 1920–30, 2008.
- [113] S. Hermouet, “Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms,” *Exp. Hematol.*, vol. 43, no. 8, pp. 599–608, 2015.
- [114] K. N. Thiele J, Kvasnicka HM, Dietrich H, Stein G, Hann M, Kaminski A, Rathjen N, Metz KA, Beelen DW, Ditschkowski M, Zander A, “Dynamics of bone marrow changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation.,” *Histol. Histopathol.*, vol. 20, no. 3, pp. 879–889, 2005.
- [115] F. Lussana and A. Rambaldi, “Inflammation and myeloproliferative neoplasms,” *J. Autoimmun.*, pp. 6–11, 2017.
- [116] H. C. Hasselbalch, “Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia , polycythemia vera and myelofibrosis . A human inflammation model for cancer development ?,” *Leuk. Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 214–220, 2013.
- [117] H. C. Hasselbalch, “Idiopathic myelofibrosis. Clinical aspects and studies on extracellular matrix metabolism.,” *Danish Medival Bull.*, vol. 40, no. 1, pp. 39–55, 1993.
- [118] A. Tefferi, R. Vaidya, D. Caramazza, C. Finke, T. Lasho, and A. Pardanani, “Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: A comprehensive cytokine profiling study,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 10, pp. 1356–1363, 2011.
- [119] O. Bock, J. Höftmann, K. Theophile, K. Hussein, B. Wiese, J. Schlué, and H. Kreipe, “Bone morphogenetic proteins are overexpressed in the bone marrow of primary myelofibrosis and are apparently induced by fibrogenic cytokines.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 172, no. 4, pp. 951–60, 2008.
- [120] F. P. S. Santos, “T h e r a p y w i t h J A K 2 I n h i b i t o r s f o r M y e l o p r o l i f e r a t i v e N e o p l a s m s,” *Hematol. Clin. NA*, vol. 26, no. 5, pp. 1083–1099, 2012.
- [121] C. Marty, C. Lacout, N. Droin, J.-P. Le Couédic, V. Ribrag, E. Solary, W. Vainchenker, J.-L. Villevall, and I. Plo, “A role for reactive oxygen species in JAK2(V617F) myeloproliferative

- neoplasm progression.," *Leukemia*, no. April, pp. 1–9, Apr. 2013.
- [122] M. E. Bjørn and H. C. Hasselbalch, "The Role of Reactive Oxygen Species in Myelofibrosis and Related Neoplasms," *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015.
- [123] S. Hermouet, E. Bigot-Corbel, and B. Gardie, "Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Role and Mechanisms of Chronic Inflammation," *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015.
- [124] A. M. Vannucchi, L. Bianchi, C. Cellai, F. Paoletti, R. A. Rana, R. Lorenzini, G. Migliaccio, and A. R. Migliaccio, "Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice).," *Blood*, vol. 100, no. 4, pp. 1123–32, Aug. 2002.
- [125] P. Koppikar, O. Abdel-Wahab, C. Hedvat, S. Marubayashi, J. Patel, A. Goel, N. Kucine, J. R. Gardner, A. P. Combs, K. Vaddi, P. J. Haley, T. C. Burn, M. Rupa, J. F. Bromberg, M. L. Heaney, E. De Stanchina, J. S. Fridman, and R. L. Levine, "Efficacy of the JAK2 inhibitor INCB16562 in a murine model of MPLW515L-induced thrombocytosis and myelofibrosis," *Blood*, vol. 115, no. 14, pp. 2919–2927, 2010.
- [126] M. H. Tomasson, D. W. Sternberg, I. R. Williams, M. Carroll, D. Cain, J. C. Aster, R. L. Ilaria, R. a Van Etten, and D. G. Gilliland, "Fatal myeloproliferation, induced in mice by TEL/PDGFBetaR expression, depends on PDGFBetaR tyrosines 579/581.," *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 4, pp. 423–32, 2000.
- [127] J. Schwaller, E. Parganas, D. Wang, D. Cain, J. C. Aster, I. R. Williams, C. K. Lee, R. Gerthner, T. Kitamura, J. Frantsve, E. Anastasiadou, M. L. Loh, D. E. Levy, J. N. Ihle, and D. G. Gilliland, "Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2.," *Mol. Cell*, vol. 6, no. 3, pp. 693–704, 2000.
- [128] L. M. Kelly, Q. Liu, J. L. Kutok, I. R. Williams, C. L. Boulton, and D. G. Gilliland, "FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model," *Blood*, vol. 99, no. 1, pp. 310–318, 2002.
- [129] T. Toki, F. Katsuoka, R. Kanazaki, G. Xu, H. Kurotaki, J. Sun, T. Kamio, S. Watanabe, S. Tandai, K. Terui, S. Yagihashi, N. Komatsu, K. Igarashi, M. Yamamoto, and E. Ito, "Transgenic expression of BACH1 transcription factor results in megakaryocytic impairment," *Blood*, vol. 105, no. 8, pp. 3100–3108, 2005.
- [130] K. Kaushansky, "The molecular mechanisms that control thrombopoiesis," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 12, pp. 3339–3347, 2005.
- [131] L. Varricchio, A. R. Migliaccio, and A. Mancini, "Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis.," *Expert Rev Hematol*, vol. 2, no. 3, pp. 315–334, 2010.
- [132] X. Q. Yan, D. Lacey, F. Fletcher, C. Hartley, P. McElroy, Y. Sun, M. Xia, S. Mu, C. Saris, D. Hill, R. G. Hawley, and I. K. McNiece, "Chronic exposure to retroviral vector encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice.," *Blood*, vol. 86, no. 11, pp. 4025–33, 1995.
- [133] H. Chagraoui, M. Tulliez, T. Smayra, E. Komura, S. Giraudier, T. Yun, N. Lassau, W. Vainchenker, and F. Wendling, "Stimulation of osteoprotegerin production is responsible

- for osteosclerosis in mice overexpressing TPO,” *Blood*, vol. 101, no. 8, pp. 2983–2989, 2003.
- [134] F. Debeurme, C. Lacout, C. Moratal, R. G. Bagley, W. Vainchenker, F. Adrian, and J.-L. Villeval, “JAK2 inhibition has different therapeutic effects according to myeloproliferative neoplasm development in mice,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 19, no. 11, pp. 2564–2574, 2015.
- [135] G. Wernig, T. Mercher, R. Okabe, R. L. Levine, B. H. Lee, and D. G. Gilliland, “Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model Expression of Jak2V617F causes a Polycythemia Vera-like Disease with associated Myelofibrosis in a Murine Bone Marrow Tr,” *Blood*, vol. 107, no. 11, pp. 4274–4282, 2006.
- [136] C. Lacout, D. F. Pisani, M. Tulliez, and F. M. Gachelin, “JAK2 V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis JAK2 V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis,” *Blood*, vol. 108, no. 5, pp. 1652–1660, 2006.
- [137] V. M. Zaleskas, D. S. Krause, K. Lazarides, N. Patel, Y. Hu, S. Li, and R. A. Van Etten, “Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F,” *PLoS One*, vol. 1, no. 1, 2006.
- [138] T. G. P. Bumm, C. Elsea, A. S. Corbin, M. Loriaux, D. Sherbenou, L. Wood, J. Deininger, R. T. Silver, B. J. Druker, and M. W. N. Deininger, “Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 23, pp. 11156–11165, 2006.
- [139] K. Shide, H. K. Shimoda, T. Kumano, K. Karube, T. Kameda, K. Takenaka, S. Oku, H. Abe, K. S. Katayose, Y. Kubuki, K. Kusumoto, S. Hasuike, Y. Tahara, K. Nagata, T. Matsuda, K. Ohshima, M. Harada, and K. Shimoda, “Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F,” *Leukemia*, vol. 22, no. 1, pp. 87–95, 2008.
- [140] S. Xing, T. H. Wanting, W. Zhao, J. Ma, S. Wang, X. Xu, Q. Li, X. Fu, M. Xu, and Z. J. Zhao, “Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice,” *Blood*, vol. 111, no. 10, pp. 5109–5117, 2008.
- [141] R. Tiedt, H. Hao-Shen, M. A. Sobas, R. Looser, S. Dirnhofer, J. Schwaller, and R. C. Skoda, “Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice,” *Blood*, vol. 111, no. 8, pp. 3931–3940, 2008.
- [142] H. Akada, D. Yan, H. Zou, S. Fiering, R. E. Hutchison, and M. G. Mohi, “Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease,” *Blood*, vol. 115, no. 17, pp. 3589–3597, 2010.
- [143] C. Marty, C. Lacout, A. Martin, S. Hasan, S. Jacquot, M.-C. Birling, W. Vainchenker, and J.-L. Villeval, “Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice,” *Blood*, vol. 116, no. 5, pp. 783–7, Aug. 2010.
- [144] A. Mullally, S. Lane, B. Ball, C. Megerdichian, R. Okabe, F. Al-Shahrour, M. Paktinat, J. Haydu, E. Housman, A. Lord, G. Wernig, M. Kharas, T. Mercher, J. Kutok, D. Gilliland, and B. Ebert, “Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative

- neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells," *Cancer Cell*, vol. 17, no. 6, pp. 584–596, 2010.
- [145] J. Li, D. Spensberger, J. S. Ahn, S. Anand, P. A. Beer, C. Ghevaert, E. Chen, A. Forrai, L. M. Scott, R. Ferreira, J. Peter, S. P. Watson, P. Liu, W. N. Erber, B. J. P. Huntly, and A. R. Green, "JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F – positive essential thrombocythemia," *Blood*, vol. 116, no. 9, pp. 1528–1538, 2010.
- [146] S. Ogilvy, D. Metcalf, L. Gibson, M. L. Bath, A. W. Harris, J. M. Adams, and B. S. Ogilvy, "Promoter elements of vav drive transgene expression in vivo throughout the hematopoietic compartment," *Blood*, vol. 94, no. 6, pp. 1855–63, 1999.
- [147] R. Kuhn, F. Schwenk, M. Aguet, and K. Rajewsky, "Inducible gene targeting in mice," *Science (80-.)*, vol. 269, no. 5229, pp. 1427–1429, 1995.
- [148] K. Shide, T. Kameda, T. Yamaji, M. Sekine, N. Inada, A. Kamiunten, K. Akizuki, K. Nakamura, T. Hidaka, Y. Kubuki, H. Shimoda, A. Kitanaka, A. Honda, A. Sawaguchi, H. Abe, T. Miike, H. Iwakiri, Y. Tahara, M. Sueta, S. Hasuike, S. Yamamoto, K. Nagata, and K. Shimoda, "Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib," *Leukemia*, vol. 31, no. 5, pp. 1136–1144, 2017.
- [149] S. Elf, N. S. Abdelfattah, E. Chen, J. Perales-Patòn, E. A. Rosen, A. Ko, F. Peisker, N. Florescu, S. Giannini, O. Wolach, E. A. Morgan, Z. Tothova, J.-A. Losman, R. K. Schneider, F. Al-Shahrour, and A. Mullally, "Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation," *Cancer Discov.*, vol. 6, no. 4, pp. 368–381, 2016.
- [150] B. L. S. Kroger N, Toni Giorgino, "Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis," *Blood*, vol. 125, no. 21, pp. 3347–3351, 2015.
- [151] D. M. B. Kerbauy, T. A. Gooley, G. E. Sale, M. E. D. Flowers, K. C. Doney, G. E. Georges, J. E. Greene, M. Linenberger, E. Petersdorf, B. M. Sandmaier, B. L. Scott, M. Sorrow, D. L. Stirewalt, F. M. Stewart, R. P. Witherspoon, R. Storb, F. R. Appelbaum, and H. J. Deeg, "Hematopoietic Cell Transplantation as Curative Therapy for Idiopathic Myelofibrosis, Advanced Polycythemia Vera, and Essential Thrombocythemia," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 13, no. 3, pp. 355–365, 2007.
- [152] Q. Lin, D. Meloni, Y. Pan, M. Xia, J. Rodgers, S. Shepard, M. Li, L. Galya, B. Metcalf, T. N. Yue, P. Liu, and J. Zhou, "Enantioselective synthesis of janus kinase inhibitor INCB018424 via an organocatalytic aza-michael reaction," *Org. Lett.*, vol. 11, no. 9, pp. 1999–2002, 2009.
- [153] A. Quintás-cardama, K. Vaddi, P. Liu, T. Manshour, J. Li, P. a Scherle, X. Wen, Y. Li, P. Waeltz, M. Rugar, T. Burn, Y. Lo, M. Covington, S. Shepard, J. D. Rodgers, P. Haley, H. Kantarjian, J. S. Fridman, S. Verstovsek, E. Caulder, and J. Kelley, "INCB018424 : therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms Preclinical characterization of the selective JAK1 / 2 inhibitor INCB018424 : therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms," *Blood*, vol. 115, no. 15, pp. 3109–

3117, 2010.

- [154] L. Kubovcakova, P. Lundberg, J. Grisouard, H. Hao-Shen, V. Romanet, R. Andraos, M. Murakami, S. Dirnhofer, K. U. Wagner, T. Radimerski, and R. C. Skoda, "Differential effects of hydroxyurea and INC424 on mutant allele burden and myeloproliferative phenotype in a JAK2-V617F polycythemia vera mouse model," *Blood*, vol. 121, no. 7, pp. 1188–1199, 2013.
- [155] S. Verstovsek, R. A. Mesa, J. Gotlib, R. S. Levy, V. Gupta, J. F. DiPersio, J. V Catalano, M. Deininger, C. Miller, R. T. Silver, M. Talpaz, E. F. Winton, J. H. Harvey, M. O. Arcasoy, E. Hexner, R. M. Lyons, R. Paquette, A. Raza, K. Vaddi, S. Erickson-Viitanen, I. L. Koumenis, W. Sun, V. Sandor, and H. M. Kantarjian, "A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 9, pp. 799–807, Mar. 2012.
- [156] C. Harrison, J.-J. Kiladjian, H. K. Al-Ali, H. Gisslinger, R. Waltzman, V. Stalbovskaya, M. McQuitty, D. S. Hunter, R. Levy, L. Knoops, F. Cervantes, T. B. Alessandro M. Vannucchi, and G. Barosi, "JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis," *New Engl. Journal Med.*, vol. 366, no. 9, pp. 787–798, 2012.
- [157] R. M. Emanuel, A. C. Dueck, H. L. Geyer, J. J. Kiladjian, S. Slot, S. Zweegman, P. A. W. Te Boekhorst, S. Commandeur, H. C. Schouten, F. Sackmann, A. K. Fuentes, D. Hernández-Maraver, H. L. Pahl, M. Griesshammer, F. Stegelmann, K. Doehner, T. Lehmann, K. Bonatz, A. Reiter, F. Boyer, G. Etienne, J. C. Ianotto, D. Ranta, L. Roy, J. Y. Cahn, C. N. Harrison, D. Radia, P. Muxi, N. Maldonado, C. Besses, F. Cervantes, P. L. Johansson, T. Barbui, G. Barosi, A. M. Vannucchi, F. Passamonti, B. Andreasson, M. L. Ferarri, A. Rambaldi, J. Samuelsson, G. Birgegard, A. Tefferi, and R. A. Mesa, "Myeloproliferative neoplasm (MPN) symptom assessment form total symptom score: Prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs," *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 33, pp. 4098–4103, 2012.
- [158] D. Tremblay, B. Marcellino, and J. Mascarenhas, "Pharmacotherapy of Myelofibrosis," *Drugs*, pp. 1–15, 2017.
- [159] A. M. Vannucchi, H. M. Kantarjian, J. J. Kiladjian, J. Gotlib, F. Cervantes, R. A. Mesa, N. J. Sarlis, W. Peng, V. Sandor, P. Gopalakrishna, A. Hmissi, V. Stalbovskaya, V. Gupta, C. Harrison, and S. Verstovsek, "A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase III trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis," *Haematologica*, vol. 100, no. 9, pp. 1139–1145, 2015.
- [160] C. N. Harrison, N. Schaap, A. M. Vannucchi, J. J. Kiladjian, R. V. Tiu, P. Zachee, E. Jourdan, E. Winton, R. T. Silver, H. C. Schouten, F. Passamonti, S. Zweegman, M. Talpaz, J. Lager, Z. Shun, and R. A. Mesa, "Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study," *Lancet Haematol.*, vol. 4, no. 7, pp. e317–e324, 2017.
- [161] A. Pardanani, J. R. Gotlib, C. Jamieson, J. E. Cortes, M. Talpaz, R. M. Stone, M. H. Silverman, D. G. Gilliland, J. Shorr, and A. Tefferi, "Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis," *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 7, pp. 789–796, 2011.

- [162] O. Weigert, A. a Lane, L. Bird, N. Kopp, B. Chapuy, D. van Bodegom, A. V Toms, S. Marubayashi, A. L. Christie, M. McKeown, R. M. Paranal, J. E. Bradner, A. Yoda, C. Gaul, E. Vangrevelinghe, V. Romanet, M. Murakami, R. Tiedt, N. Ebel, E. Evrot, A. De Pover, C. H. Régnier, D. Erdmann, F. Hofmann, M. J. Eck, S. E. Sallan, R. L. Levine, A. L. Kung, F. Baffert, T. Radimerski, and D. M. Weinstock, "Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition.," *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 2, pp. 259–73, Feb. 2012.
- [163] M. Zingariello, F. Martelli, F. Ciaffoni, F. Masiello, B. Ghinassi, E. D. Amore, M. Massa, G. Barosi, L. Sancillo, X. Li, J. D. Goldberg, R. A. Rana, and A. R. Migliaccio, "Characterization of the TGF- β 1 signaling abnormalities in the Gata1 low mouse model of myelo fibrosis," *Blood*, vol. 121, no. 17, pp. 3345–3363, 2013.
- [164] a M. Florena, C. Tripodo, a Di Bernardo, E. Iannitto, C. Guarnotta, R. Porcasi, S. Ingraio, V. Abbadessa, and V. Franco, "Different immunophenotypical apoptotic profiles characterise megakaryocytes of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis.," *J. Clin. Pathol.*, vol. 62, no. 4, pp. 331–8, 2009.
- [165] J. C. Wang, W. Chen, S. Nallusamy, C. Chen, and A. D. Novetsky, "Hypermethylation of the p15INK4b and p16INK4a in agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and AMM in leukaemic transformation," *Br. J. Haematol.*, vol. 116, no. 3, pp. 582–586, 2002.
- [166] Y. Wang, W. Fiskus, D. G. Chong, K. M. Buckley, K. Natarajan, R. Rao, A. Joshi, R. Balusu, S. Koul, J. Chen, A. Savoie, C. Ustun, A. P. Jillella, P. Atadja, R. L. Levine, and K. N. Bhalla, "Cotreatment with panobinostat and JAK2 inhibitor TG101209 attenuates JAK2V617F levels and signaling and exerts synergistic cytotoxic effects against human myeloproliferative neoplastic cells," *Blood*, vol. 114, no. 24, pp. 5024–5033, 2009.
- [167] W. Fiskus, S. Verstovsek, T. Manshouri, R. Rao, R. Balusu, S. Venkannagari, N. N. Rao, K. Ha, J. E. Smith, S. L. Hembruff, S. Abhyankar, J. McGuirk, and K. N. Bhalla, "Heat shock protein 90 inhibitor is synergistic with JAK2 inhibitor and overcomes resistance to JAK2-TKI in human myeloproliferative neoplasm cells.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 23, pp. 7347–58, Dec. 2011.
- [168] F. Ritossa, "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*," *Experientia*, pp. 571–573, 1962.
- [169] F. Ritossa, "Discovery of the heat shock response," *Cell stress & chaperones*, vol. 1, no. 2, pp. 97–98, 1996.
- [170] A. Tissières, H. K. Mitchell, and U. M. Tracy, "Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs," *J. Mol. Biol.*, vol. 84, no. 3, pp. 389–398, 1974.
- [171] M. J. Miller, N. H. Xuong, and E. P. Geiduschek, "A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, no. 10, pp. 5222–5225, 1979.
- [172] L. Pirkkala, P. Nykänen, and L. E. A. Sistonen, "Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond," *FASEB J.*, vol. 15, no. 7, pp. 1118–1131, 2001.

- [173] R. I. Morimoto, "Regulation of the heat-shock transcriptional response: cross talk between a family of heat-shock factors, molecular chaperones, and negative regulators," *Genes Dev*, vol. 12, pp. 3788–3796, 1998.
- [174] P. K. Sorger and H. R. B. Pelham, "Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation.," *Cell*, vol. 54, no. 6, pp. 855–864, 1988.
- [175] J. Clos, J. T. Westwood, P. B. Becker, S. Wilson, K. Lambert, and C. Wu, "Molecular cloning and expression of a hexameric Drosophila heat shock factor subject to negative regulation," *Cell*, vol. 63, no. 5, pp. 1085–1097, 1990.
- [176] S. Dayalan Naidu and A. T. Dinkova-Kostova, "Regulation of the mammalian heat shock factor 1," *FEBS J.*, pp. 1–22, 2017.
- [177] M. Kallio, Y. Chang, M. Manuel, T. P. Alastalo, M. Rallu, Y. Gitton, L. Pirkkala, M. T. Loones, L. Paslaru, S. Larney, S. Hiard, M. Morange, L. Sistonen, and V. Mezger, "Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice," *EMBO J.*, vol. 21, no. 11, pp. 2591–2601, 2002.
- [178] P. Östling, J. K. Björk, P. Roos-Mattjus, V. Mezger, and L. Sistonen, "Heat Shock Factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 10, pp. 7077–7086, 2007.
- [179] M. Fujimoto, K. Oshima, T. Shinkawa, B. W. Bei, S. Inouye, N. Hayashida, R. Takii, and A. Nakai, "Analysis of HSF4 binding regions reveals its necessity for gene regulation during development and heat shock response in mouse lenses," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 44, pp. 29961–29970, 2008.
- [180] M. Fujimoto, H. Izu, K. Seki, K. Fukuda, T. Nishida, S. Yamada, K. Kato, S. Yonemura, S. Inouye, and A. Nakai, "HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development," *EMBO J.*, vol. 23, no. 21, pp. 4297–4306, 2004.
- [181] D. N. Trinklein, J. I. Murray, S. J. Hartman, D. Botstein, and M. Richard M., "The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response," *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, no. 3, pp. 1254–1261, 2004.
- [182] H. H. Kampinga, J. Hageman, M. J. Vos, H. Kubota, R. M. Tanguay, E. A. Bruford, M. E. Cheetham, B. Chen, and L. E. Hightower, "Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins," *Cell Stress Chaperones*, vol. 14, no. 1, pp. 105–111, 2009.
- [183] S. E. Jackson, "Hsp90: Structure and Function," *Top Curr Chem*, vol. 11, no. 1, p. 155, 2013.
- [184] J. Radons, "The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?," *Cell Stress Chaperones*, vol. 21, no. 3, pp. 379–404, 2016.
- [185] M. Daugaard, M. Rohde, and M. Jäättelä, "The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions," *FEBS Lett.*, vol. 581, no. 19, pp. 3702–3710, 2007.
- [186] H. H. Kampinga and C. Garrido, "HSPBs: Small proteins with big implications in human disease," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 44, no. 10, pp. 1706–1710, 2012.

- [187] T. Langer, S. Rosmus, and H. Fasold, "Intracellular localization of the 90 kDA heat shock protein (HSP90 α) determined by expression of a EGFP-HSP90 α -fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells.," *Cell Biol Int*, vol. 27, no. 1, pp. 47–52, 2003.
- [188] L. H. Pearl, C. Prodromou, and P. Workman, "The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment.," *Biochem. J.*, vol. 410, no. 3, pp. 439–453, 2008.
- [189] K. Richter and J. Buchner, "Hsp90: Chaperoning signal transduction," *J. Cell. Physiol.*, vol. 188, no. 3, pp. 281–290, 2001.
- [190] A. J. McClellan, Y. Xia, A. M. Deutschbauer, R. W. Davis, M. Gerstein, and J. Frydman, "Diverse Cellular Functions of the Hsp90 Molecular Chaperone Uncovered Using Systems Approaches," *Cell*, vol. 131, no. 1, pp. 121–135, 2007.
- [191] L. Whitesell and S. L. Lindquist, "HSP90 and the chaperoning of cancer.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 10, pp. 761–72, 2005.
- [192] I. Grad, C. R. Cederroth, J. Walicki, C. Grey, S. Barluenga, N. Winssinger, B. de Massy, S. Nef, and D. Picard, "The molecular chaperone hsp90a is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse," *PLoS One*, vol. 5, no. 12, pp. 1–11, 2010.
- [193] M. Karin and F. R. Greten, "NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 10, pp. 749–759, 2005.
- [194] W. Li, Y. Li, S. Guan, J. Fan, C.-F. Cheng, A. M. Bright, C. Chinn, M. Chen, and D. T. Woodley, "Extracellular heat shock protein-90 α : linking hypoxia to skin cell motility and wound healing.," *EMBO J.*, vol. 26, no. 5, pp. 1221–1233, 2007.
- [195] X. Song, X. Wang, W. Zhuo, H. Shi, D. Feng, Y. Sun, Y. Liang, Y. Fu, D. Zhou, and Y. Luo, "The regulatory mechanism of extracellular Hsp90?? on matrix metalloproteinase-2 processing and tumor angiogenesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 51, pp. 40039–40049, 2010.
- [196] P. Cecchini, R. Tavano, P. Polverino de Laureto, S. Franzoso, C. Mazzon, P. Montanari, and E. Papini, "The soluble recombinant *Neisseria meningitidis* adhesin NadA delta351-405 stimulates human monocytes by binding to extracellular Hsp90," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, 2011.
- [197] B. K. Eustace, T. Sakurai, J. K. Stewart, D. Yimlamai, C. Unger, C. Zehetmeier, B. Lain, C. Torella, S. W. Henning, G. Beste, B. T. Scroggins, L. Neckers, L. L. Ilag, and D. G. Jay, "Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 6, pp. 507–514, 2004.
- [198] S. Tsutsumi, B. Scroggins, F. Koga, M.-J. Lee, J. Trepel, S. Felts, C. Carreras, and L. Neckers, "A small molecule cell-impermeant Hsp90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion.," *Oncogene*, vol. 27, no. 17, pp. 2478–2487, 2008.
- [199] W. Li, F. Tsen, D. Sahu, A. Bhatia, M. Chen, G. Multhoff, and D. T. Woodley, *Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the actual target in clinical trials: intentionally or unintentionally.*, vol. 303. Elsevier, 2013.
- [200] C.-F. Cheng, J. Fan, M. Fedesco, S. Guan, Y. Li, B. Bandyopadhyay, A. M. Bright, D.

- Yerushalmi, M. Liang, M. Chen, Y.-P. Han, D. T. Woodley, and W. Li, "Transforming Growth Factor α (TGF α)-Stimulated Secretion of HSP90 α : Using the Receptor LRP-1/CD91 To Promote Human Skin Cell Migration against a TGF β -Rich Environment during Wound Healing," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 10, pp. 3344–3358, 2008.
- [201] X. Wang, X. Song, W. Zhuo, Y. Fu, H. Shi, Y. Liang, M. Tong, G. Chang, and Y. Luo, "The regulatory mechanism of Hsp90 α secretion and its function in tumor malignancy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 50, pp. 21288–21293, 2009.
- [202] J. S. Chen, Y. M. Hsu, C. C. Chen, L. L. Chen, C. C. Lee, and T. S. Huang, "Secreted heat shock protein 90 α induces colorectal cancer cell invasion through CD91/LRP-1 and NF- κ B-mediated integrin α V expression," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 33, pp. 25458–25466, 2010.
- [203] E. Pick, Y. Kluger, J. M. Giltane, C. Moeder, R. L. Camp, D. L. Rimm, and H. M. Kluger, "High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 7, pp. 2932–2937, 2007.
- [204] H. Reikvam, E. Ersvaer, and O. Bruserud, "Heat shock protein 90 - A potential target in the treatment of human acute myelogenous leukemia.," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 9, no. 6, pp. 761–776, 2009.
- [205] M. Sevin, F. Girodon, C. Garrido, and A. De Thonel, "HSP90 and HSP70 : Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms," *Mediators Inflamm.*, 2015.
- [206] C. Deboer, P. Meulman, R. Wnuk, and D. Peterson, "Geldanamycin, a new antibiotic," *J Antibiot*, pp. 442–447, 1970.
- [207] T. W. Schulte, S. Akinaga, S. Soga, W. Sullivan, B. Stensgard, D. Toft, and L. M. Neckers, "Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin.," *Cell stress & chaperones*, vol. 3, no. 2. pp. 100–108, 1998.
- [208] G. Jegu, A. Hazoume, R. Seigneuric, and C. Garrido, "Targeting heat shock proteins in cancer," *Cancer Lett*, 2010.
- [209] O. G. Best, N. Singh, C. Forsyth, and S. P. Mulligan, "The novel Hsp-90 inhibitor SNX7081 is significantly more potent than 17-AAG against primary CLL cells and a range of haematological cell lines, irrespective of lesions in the TP53 pathway.," *Br. J. Haematol.*, vol. 151, no. 2, pp. 185–8, Oct. 2010.
- [210] J. Zou, Y. Guo, T. Guettouche, D. F. Smith, and R. Voellmy, "Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1.," *Cell*, vol. 94, no. 4, pp. 471–480, 1998.
- [211] L. C. Cerchietti, E. C. Lopes, S. N. Yang, K. Hatzi, K. L. Bunting, L. A. Tsikitas, A. Mallik, A. I. Robles, J. Walling, L. Varticovski, R. Shaknovich, K. N. Bhalla, G. Chiosis, and A. Melnick, "A purine scaffold Hsp90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas.," *Nat. Med.*, vol. 15, no. 12, pp. 1369–76, Dec. 2009.
- [212] F. Cervantes-gomez, R. Nimmanapalli, and V. Gandhi, "Transcription Inhibition of Heat

- Shock Proteins: A Strategy for Combination of 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin and Actinomycin D," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 9, pp. 3947–3954, 2009.
- [213] K. M. Flaherty, C. DeLuca-Flaherty, and D. B. McKay, "Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein," *Nature*, vol. 346, no. 18, p. 623–, 1990.
- [214] F. U. Hartl, "Molecular chaperones in cellular protein folding.," *Nature*, vol. 381, no. 6583. pp. 571–579, 1996.
- [215] Y. Shi and J. O. Thomas, "The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 12, no. 5, pp. 2186–92, 1992.
- [216] 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, 2016.
- [217] A.-L. Joly, G. Wettstein, G. Mignot, F. Ghiringhelli, and C. Garrido, "Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity.," *J. Innate Immun.*, vol. 2, no. 3, pp. 238–247, 2010.
- [218] T. Gotoh, K. Terada, S. Oyadomari, and M. Mori, "hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria.," *Cell Death Differ.*, vol. 11, no. 4, pp. 390–402, 2004.
- [219] L. Ravagnan, S. Gurbuxani, S. a Susin, C. Maisee, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jäättelä, J. M. Penninger, C. Garrido, and G. Kroemer, "Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 9, pp. 839–843, 2001.
- [220] H. M. Beere, B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, a Mahboubi, T. Kuwana, P. Tailor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen, and D. R. Green, "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 8, pp. 469–475, 2000.
- [221] F. Guo, C. Sigua, P. Bali, P. George, W. Fiskus, A. Scuto, S. Annavarapu, and A. Mouttaki, "Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl – mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells," *Apoptosis*, vol. 105, no. 3, pp. 1246–1255, 2005.
- [222] Y. K. Kim, J. Suarez, Y. Hu, P. M. McDonough, C. Boer, D. J. Dix, and W. H. Dillmann, "Deletion of the inducible 70-kDa heat shock protein genes in mice impairs cardiac contractile function and calcium handling associated with hypertrophy," *Circulation*, vol. 113, no. 22, pp. 2589–2597, 2006.
- [223] A. De Maio and D. Vazquez, "Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function.," *Shock*, vol. 40, no. 4, pp. 239–46, Oct. 2013.
- [224] S. K. Calderwood, S. S. Mambula, and P. J. Gray, "Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1113, pp. 28–39, Oct. 2007.
- [225] F. Chalmin, S. Ladoire, G. Mignot, J. Vincent, M. Bruchard, J.-P. Remy-Martin, W. Boireau, A. Rouleau, B. Simon, D. Lanneau, A. De Thonel, G. Multhoff, A. Hamman, F. Martin, B. Chauffert, E. Solary, L. Zitvogel, C. Garrido, B. Ryffel, C. Borg, L. Apetoh, C. Rébé, and F.

- Ghiringhelli, "Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 2, pp. 457–71, Feb. 2010.
- [226] G. Multhoff, C. Botzler, M. Wiesnet, E. Müller, T. Meier, W. Wilmanns, and R. D. Issels, "A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells," *Int. J. Cancer*, vol. 61, no. 2, pp. 272–9, 1995.
- [227] J. Kao, E. C. Ko, A. T. Sikora, S. Fu, and S. Chen, "Targeting Immune Suppressing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Oncology," *Crit. Rev. s Oncol.*, vol. 77, no. 1, pp. 12–19, 2012.
- [228] C. Bayer, M. E. Liebhardt, T. E. Schmid, M. Trajkovic-Arsic, K. Hube, H. M. Specht, D. Schilling, M. Gehrmann, S. Stangl, J. T. Siveke, J. J. Wilkens, and G. Multhoff, "Validation of heat shock protein 70 as a tumor-specific biomarker for monitoring the outcome of radiation therapy in tumor mouse models," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 88, no. 3, pp. 694–700, 2014.
- [229] S. Breuninger and J. Erl, "Quantitative Analysis of Liposomal Heat Shock Protein 70 (Hsp70) in the Blood of Tumor Patients Using a Novel LipHsp70 ELISA," *J. Clin. Cell. Immunol.*, vol. 5, no. 5, pp. 1–10, 2014.
- [230] R. Seigneuric, H. Mjahed, J. Gobbo, A.-L. Joly, K. Berthenet, S. Shirley, and C. Garrido, "Heat shock proteins as danger signals for cancer detection.," *Front. Oncol.*, vol. 1, no. November, p. 37, 2011.
- [231] L. A. Madden, Y. A. Hayman, C. Underwood, R. V Vince, J. Greenman, D. Allsup, and S. Ali, "Increased inducible heat shock protein 72 expression associated with PBMC isolated from patients with haematological tumours.," *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 72, no. 5, pp. 380–386, 2012.
- [232] M. Hajare, G. François, M. Fontenay, and C. Garrido, "Heat shock proteins in hematopoietic malignancies," *Exp. Cell Res.*, 2012.
- [233] E. Schmitt, A. Parcellier, S. Gurbuxani, C. Cande, A. Hammann, M. C. Morales, C. R. Hunt, D. J. Dix, R. T. Kroemer, F. Giordanetto, M. Ja, J. M. Penninger, A. Pance, G. Kroemer, and C. Garrido, "Chemosensitization by a Non-apoptogenic Heat Shock Protein 70-Binding Apoptosis-Inducing Factor Mutant Chemosensitization by a Non-apoptogenic Heat Shock Protein 70-Binding Apoptosis-Inducing Factor Mutant," *Cancer Res.*, no. 29, pp. 8233–8240, 2003.
- [234] J. I.-J. Leu, J. Pimkina, A. Frank, M. E. Murphy, and D. L. George, "A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70.," *Mol. Cell*, vol. 36, no. 1, pp. 15–27, 2009.
- [235] A. J. Steele, A. G. Prentice, A. V. Hoffbrand, B. C. Yogashangary, S. M. Hart, M. W. Lowdell, E. R. Samuel, J. M. North, E. P. Nacheva, A. Chanalaris, P. Kottaridis, K. Cwynarski, and R. G. Wickremasinghe, "2-phenylacetylenesulfonamide (PAS) induces p53-independent apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells," *Blood*, vol. 114, no. 6, pp. 1217–1225, 2009.
- [236] D. S. Williamson, J. Borgognoni, A. Clay, Z. Daniels, P. Dokurno, M. J. Drysdale, N. Foloppe, G. L. Francis, C. J. Graham, R. Howes, A. T. Macias, J. B. Murray, R. Parsons, T. Shaw, A. E.

- Surgenor, L. Terry, Y. Wang, M. Wood, and A. J. Massey, "Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design," *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 6, pp. 1510–1513, 2009.
- [237] A.-L. Rérole, J. Gobbo, A. De Thonel, E. Schmitt, J. P. Pais de Barros, A. Hammann, D. Lanneau, E. Fourmaux, O. Deminoy, O. Micheau, L. Lagrost, P. Colas, G. Kroemer, and C. Garrido, "Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy.," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 2, pp. 484–95, Jan. 2011.
- [238] J. Gobbo, G. Marcion, M. Cordonnier, A. M. M. Dias, N. Pernet, A. Hammann, S. Richaud, H. Mjahed, N. Isambert, V. Clause, C. R??b??, A. Bertaut, V. Gousso, F. Lirussi, F. Ghiringhelli, A. De Thonel, P. Fumoleau, R. Seigneuric, and C. Garrido, "Restoring Anticancer Immune Response by Targeting Tumor-Derived Exosomes with a HSP70 Peptide Aptamer," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 108, no. 3, pp. 1–11, 2016.
- [239] A.-P. Arrigo, "Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell," *Cell Stress Chaperones*, vol. 1, 2017.
- [240] A. P. Arrigo, J. P. Suhan, and W. J. Welch, "Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein," *Mol Cell Biol*, vol. 8, no. 12, pp. 5059–5071, 1988.
- [241] J. Huot, H. Lambert, J. N. Lavoie, A. Guimond, F. Houle, and J. Landry, "Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27," *Eur J Biochem*, vol. 227, no. 1–2, pp. 416–427, 1995.
- [242] E. Butt, D. Immler, H. E. Meyer, A. Kotlyarov, K. Laa, and M. Gaestel, "Heat Shock Protein 27 Is a Substrate of cGMP-dependent Protein Kinase in Intact Human Platelets.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 10, pp. 7108–7113, Nov. 2000.
- [243] C. Paul, S. Simon, B. Gibert, S. Viro, F. Manero, and A. P. Arrigo, "Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27)," *Exp Cell Res*, vol. 316, no. 9, pp. 1535–1552, 2010.
- [244] A.-P. Arrigo and B. Gibert, "HspB1 Dynamic Phospho-Oligomeric Structure Dependent Interactome as Cancer Therapeutic Target," *Current Molecular Medicine*. 2012.
- [245] J. Landry, P. Chretien, H. Lambert, E. Hickey, and L. A. Weber, "Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells," *J. Cell Biol.*, vol. 109, no. 1, pp. 7–15, 1989.
- [246] A.-P. Arrigo, W. J. J. Firdaus, G. Mellier, M. Moulin, C. Paul, C. Diaz-latoud, and C. Kretzremy, "Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression.," *Methods*, vol. 35, pp. 126–138, 2005.
- [247] A. Parcellier, E. Schmitt, S. Gurbuxani, A. Pance, S. Khochbin, E. Solary, and C. Garrido, "HSP27 Is a Ubiquitin-Binding Protein Involved in I--kappaBalpha Proteasomal Degradation," *Mol Cell Biol*, vol. 23, no. 16, pp. 5790–5802, 2003.
- [248] P. Mehlem, K. Schulze-Osthoff, and a Arrigo, "Small Stress Proteins as Novel Regulators of Apoptosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 28, pp. 16510–16514, 1996.

- [249] C. Garrido, P. Mehlen, a Fromentin, a Hammann, M. Assem, a P. Arrigo, and B. Chauffert, "Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 237, no. 3, pp. 653–659, 1996.
- [250] M. A. Liebert, A. Parcellier, E. Schmitt, M. Brunet, A. Hammann, E. Solary, and C. Garrido, "Small Heat Shock Proteins HSP27 and alphaB-Crystallin: Cytoprotective and Oncogenic Functions," *Antioxid Redox Signal*, vol. 7, no. 3–4, pp. 404–413, 2005.
- [251] B. M. Doshi, L. E. Hightower, and J. Lee, "The role of Hsp27 and actin in the regulation of movement in human cancer cells responding to heat shock.," *Cell Stress Chaperones*, vol. 14, no. 5, pp. 445–57, Sep. 2009.
- [252] C. Garrido, P. Ottavi, A. Fromentin, A. Hammann, A. P. Arrigo, B. Chauffert, and P. Mehlen, "HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs," *Cancer Res*, vol. 57, no. 13, pp. 2661–2667, 1997.
- [253] J. Landry, P. Chretien, A. Laszlo, and H. Lambert, "Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells," *J Cell Physiol*, vol. 147, no. 1, pp. 93–101, 1991.
- [254] S. Lindquist and E. A. Craig, "The heat-shock proteins," *Annu Rev Genet*, vol. 22, pp. 631–677, 1988.
- [255] M. Ehrnsperger, S. Gräber, M. Gaestel, and J. Buchner, "Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation," *EMBO J.*, vol. 16, no. 2, pp. 221–229, 1997.
- [256] J. Ojha, G. Masilamoni, D. Dunlap, R. A. Udoff, and A. G. Cashikar, "Sequestration of toxic oligomers by HspB1 as a cytoprotective mechanism.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 15, pp. 3146–57, 2011.
- [257] A.-P. Arrigo, "Hsp27: Novel Regulator of Intracellular Redox State," *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)*, vol. 52, no. 6, pp. 303–307, 2001.
- [258] P. Mehlen, C. Kretz-Remy, X. Prévaille, and A. P. Arrigo, "Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death.," *EMBO J.*, vol. 15, no. 11, pp. 2695–706, 1996.
- [259] J. Crowe, A. Aubareda, K. McNamee, P. M. Przybycien, X. Lu, R. O. Williams, G. Bou-Gharios, J. Saklatvala, and J. L. E. Dean, "Heat Shock Protein B1-Deficient Mice Display Impaired Wound Healing," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, 2013.
- [260] N. L. Spector, P. Mehlen, C. Ryan, L. Hardy, W. Samson, H. Levine, L. M. Nadler, N. Fabre, and A. P. Arrigo, "Regulation of the 28 kDa heat shock protein by retinoic acid during differentiation of human leukemic HL-60 cells," *FEBS Lett*, vol. 337, no. 2, pp. 184–188, 1994.
- [261] S. M. Davidson and M. Morange, "Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes," *Dev. Biol.*, vol. 218, no. 2, pp. 146–160, 2000.
- [262] A. P. Arrigo and C. Ducasse, "Expression of the anti-apoptotic protein Hsp27 during both

- the keratinocyte differentiation and dedifferentiation of HaCat cells: Expression linked to changes in intracellular protein organization?," *Exp. Gerontol.*, vol. 37, no. 10–11, pp. 1247–1255, 2002.
- [263] A. P. Arrigo, "In search of the molecular mechanism by which small stress proteins counteract apoptosis during cellular differentiation," *J. Cell. Biochem.*, vol. 94, no. 2, pp. 241–246, 2005.
- [264] A. de Thonel, J. Vandekerckhove, D. Lanneau, S. Selvakumar, G. Courtois, A. Hazoume, M. Brunet, S. Maurel, A. Hammann, J. A. Ribeil, Y. Zermati, A. S. Gabet, J. Boyes, E. Solary, O. Hermine, and C. Garrido, "HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation.," *Blood*, vol. 116, no. 1, pp. 85–96, Jul. 2010.
- [265] K. Rayner, Y. X. Chen, M. McNulty, T. Simard, X. Zhao, D. J. Wells, J. De Belleruche, and E. R. O'Brien, "Extracellular release of the atheroprotective heat shock protein 27 is mediated by estrogen and competitively inhibits acLDL binding to scavenger receptor-a," *Circ. Res.*, vol. 103, no. 2, pp. 133–141, 2008.
- [266] M. B. Stope, G. Klinkmann, K. Diesing, D. Koensgen, M. Burchardt, and A. Mustea, "Heat Shock Protein HSP27 Secretion by Ovarian Cancer Cells Is Linked to Intracellular Expression Levels, Occurs Independently of the Endoplasmic Reticulum Pathway and HSP27's Phosphorylation Status, and Is Mediated by Exosome Liberation," *Dis. Markers*, vol. 2017, p. 1575374, 2017.
- [267] asit K. De, K. M. Kodys, B. S. Yeh, and C. Miller-Graziano, "Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF-alpha induction by heat-shock protein 27 (Hsp27) suggests Hsp27 is primarily an antiinflammatory stimulus.," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 7, pp. 3951–3958, 2000.
- [268] K. Laudanski, A. De, and C. Miller-Graziano, "Exogenous heat shock protein 27 uniquely blocks differentiation of monocytes to dendritic cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 10, pp. 2812–2824, 2007.
- [269] Z. Batulan, V. K. Pulakazhi Venu, Y. Li, G. Koumbadinga, D. G. Alvarez-Olmedo, C. Shi, and E. R. O'Brien, "Extracellular release and signaling by heat shock protein 27: Role in modifying vascular inflammation," *Front. Immunol.*, vol. 7, no. JUL, pp. 1–16, 2016.
- [270] S. Banerjee, C. L. Lin, K. A. Skinner, L. M. Schiffhauer, J. Peacock, D. G. Hicks, E. M. Redmond, D. Morrow, A. Huston, M. Shayne, H. N. Langstein, C. L. Miller-graziano, J. Strickland, L. O. Donoghue, and A. K. De, "Heat Shock Protein 27 Differentiates Tolerogenic Macrophages That May Support Human Breast Cancer Progression," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 2, pp. 318–327, 2011.
- [271] J. Skrzeczynska-Moncznik, M. Bzowska, A. Nogiec, A. Sroka, M. Zarebski, L. Vallieres, and K. Guzik, "Rapid externalization of 27-kDa heat shock protein (HSP27) and atypical cell death in neutrophils treated with the sphingolipid analog drug FTY720.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 98, no. 4, pp. 591–599, 2015.
- [272] I. Kardys, N. Rifai, O. Meilhac, J. Michel, and J. L. Martin-ventura, "Plasma Concentration of Heat Shock Protein 27 and Risk of Cardiovascular Disease : A Prospective , Nested Case-Control Study BACKGROUND :," *Clin. Chem.*, vol. 146, pp. 139–146, 2008.

- [273] C. Jin, J. C. Cleveland, L. Ao, J. Li, Q. Zeng, and D. A. Fullerton, "Human Myocardium Releases Heat Shock Protein 27 (HSP27) after Global Ischemia : The Proinflammatory Effect of Extracellular HSP27 through Toll-like Receptor (TLR) -2 and TLR4," *Mol. Med.*, vol. 20, pp. 280–289, 2014.
- [274] S. Salari, T. Seibert, Y. Chen, and E. R. O. Brien, "Extracellular HSP27 acts as a signaling molecule to activate NF- κ B in macrophages," *Cell Stress Chaperones*, vol. 18, pp. 53–63, 2013.
- [275] D. Thuringer, G. Jego, G. Wettstein, O. Terrier, L. Cronier, N. Yousfi, S. Hébrard, A. Bouchot, A. Hazoumé, A. Joly, M. Gleave, M. Rosa-calatrava, E. Solary, and C. Garrido, "Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3," *FASEB J*, vol. 27, pp. 4169–4183, 2013.
- [276] G. Gruden, P. Carucci, V. Lolli, L. Cosso, E. Dellavalle, E. Rolle, A. Cantamessa, S. Pinach, M. L. Abate, D. Campra, F. Brunello, G. Bruno, M. Rizzetto, and P. C. Perin, "Serum heat shock protein 27 levels in patients with hepatocellular carcinoma.," *Cell Stress Chaperones*, vol. 18, no. 2, pp. 235–41, 2013.
- [277] G. Wettstein, P. Bellaye, M. Kolb, A. Hammann, B. Crestani, P. Soler, J. Marchal-somme, A. Hazoume, J. Gauldie, A. Gunther, O. Micheau, M. Gleave, P. Camus, C. Garrido, and P. Bonniaud, "Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation," *FASEB J*, vol. 27, no. 4, pp. 1549–1560, 2013.
- [278] A. Vidyasagar, S. Reese, Z. Acun, D. Hullett, and A. Djamali, "HSP27 is involved in the pathogenesis of kidney tubulointerstitial fibrosis," *Am J Physiol Ren. Physiol*, vol. 295, no. 3, pp. 707–716, 2008.
- [279] D. R. Ciocca, S. Green, R. M. Elledge, G. M. Clark, R. Pugh, P. Ravdin, D. Lew, S. Martino, and C. K. Osborne, "Heat shock proteins hsp27 and hsp70: lack of correlation with response to tamoxifen and clinical course of disease in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer (a Southwest Oncology Group Study).," *Clin. Cancer Res.*, vol. 4, no. 5, pp. 1263–6, May 1998.
- [280] D. H. Choi, J. S. Ha, W. H. Lee, J. K. Song, G. Y. Kim, J. H. Park, H. J. Cha, B. J. Lee, and J. W. Park, "Heat shock protein 27 is associated with irinotecan resistance in human colorectal cancer cells," *FEBS Lett*, vol. 581, no. 8, pp. 1649–1656, 2007.
- [281] C. Melle, G. Ernst, N. Escher, D. Hartmann, B. Schimmel, A. Bleul, H. Thieme, R. Kaufmann, K. Felix, H. M. Friess, U. Settmacher, M. Hommann, K. K. Richter, W. Daffner, H. Täubig, T. Manger, U. Claussen, and F. Von Eggeling, "Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker," *Clin. Chem.*, vol. 53, no. 4, pp. 629–635, 2007.
- [282] H. Schepers, M. Geugien, M. van der Toorn, A. L. Bryantsev, H. H. Kampinga, B. J. Eggen, and E. Vellenga, "HSP27 protects AML cells against VP-16-induced apoptosis through modulation of p38 and c-Jun," *Exp Hematol*, vol. 33, no. 6, pp. 660–670, 2005.
- [283] E. Schmitt, M. Gehrman, M. Brunet, G. Multhoff, and C. Garrido, "Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 81, no. 1, pp. 15–27, Jan. 2007.

- [284] A. J. C. Heinrich, S. Donakonda, V. J. Haupt, and P. Lennig, "New HSP27 inhibitors efficiently down-regulate resistance development in cancer cells," *Oncotarget*, vol. submitted, 2016.
- [285] P. Rocchi, E. Beraldi, S. Ettinger, L. Fazli, R. L. Vessella, C. Nelson, and M. Gleave, "Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 23, pp. 11083–11093, 2005.
- [286] M. Kamada, A. So, M. Muramaki, P. Rocchi, E. Beraldi, and M. Gleave, "Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 6, no. 1, pp. 299–308, Jan. 2007.
- [287] V. Baylot, C. Andrieu, M. Katsogiannou, D. Taieb, S. Garcia, S. Giusiano, J. Acunzo, J. Iovanna, M. Gleave, C. Garrido, and P. Rocchi, "OGX-427 inhibits tumor progression and enhances gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer.," *Cell Death Dis.*, vol. 2, no. 10, p. e221, Jan. 2011.
- [288] B. Lelj-Garolla, M. Kumano, E. Beraldi, L. Nappi, P. Rocchi, D. N. Ionescu, L. Fazli, a. Zoubeydi, and M. E. Gleave, "Hsp27 inhibition with OGX-427 sensitizes non-small cell lung cancer cells to erlotinib and chemotherapy," *Mol. Cancer Ther.*, pp. 1107–1117, 2015.
- [289] J. Heinrich, A. Tuukkanen, M. Schroeder, T. Fahrig, and R. Fahrig, "RP101 (brivudine) binds to heat shock protein HSP27 (HSPB1) and enhances survival in animals and pancreatic cancer patients," *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 137, pp. 1349–1361, 2011.
- [290] K. D. Shin, M.-Y. Lee, D.-S. Shin, S. Lee, K.-H. Son, S. Koh, Y.-K. Paik, B.-M. Kwon, and D. C. Han, "Blocking tumor cell migration and invasion with biphenyl isoxazole derivative KRIBB3, a synthetic molecule that inhibits Hsp27 phosphorylation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 50, pp. 41439–48, Dec. 2005.
- [291] B. Gibert, E. Hadchity, A. Czekalla, M. T. Aloy, P. Colas, C. Rodriguez-Lafrasse, A. P. Arrigo, and C. Diaz-Latoud, "Inhibition of heat shock protein 27 (HspB1) tumorigenic functions by peptide aptamers," *Oncogene*, vol. 30, no. 34, pp. 3672–3681, 2011.
- [292] J. Bareng, I. Jilani, M. Gorre, H. Kantarjian, F. Giles, A. Hannah, and M. Albitar, "A potential role for HSP90 inhibitors in the treatment of JAK2 mutant-positive diseases as demonstrated using quantitative flow cytometry.," *Leuk. Lymphoma*, vol. 48, no. 11, pp. 2189–95, Nov. 2007.
- [293] N. Bhagwat, P. Koppikar, M. Keller, S. Marubayashi, K. Shank, R. Rampal, J. Qi, M. Kleppe, H. J. Patel, S. K. Shah, T. Taldone, J. E. Bradner, G. Chiosis, and R. L. Levine, "Improved targeting of JAK2 leads to increased therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms.," *Blood*, vol. 123, no. 13, pp. 2075–83, Mar. 2014.
- [294] M. Gallardo, S. Barrio, M. Fernandez, A. Paradela, A. Arenas, O. Toldos, R. Ayala, E. Albizua, A. Jimenez, S. Redondo, R. M. Garcia-Martin, F. Gilsanz, J. P. Albar, and J. Martinez-Lopez, "Proteomic analysis reveals heat shock protein 70 has a key role in polycythemia Vera.," *Mol. Cancer*, vol. 12, p. 142, Jan. 2013.
- [295] S. Yokota, M. Kitahara, and K. Nagata, "Benzylidene Lactam Compound , KNK437 , a Novel Inhibitor of Acquisition of Thermotolerance and Heat Shock Protein Induction in

- Human Colon Carcinoma Cells," *Cancer Res.*, vol. 60, pp. 2942–2948, 2000.
- [296] S. Barrio, M. Gallardo, A. Arenas, R. Ayala, I. Rapado, D. Rueda, A. Jimenez, E. Albizua, C. Burgaleta, F. Gilsanz, and J. Martinez-Lopez, "Inhibition of related JAK/STAT pathways with molecular targeted drugs shows strong synergy with ruxolitinib in chronic myeloproliferative neoplasm.," *Br. J. Haematol.*, vol. 161, no. 5, pp. 667–76, Jun. 2013.
- [297] K. N. Chi, E. Y. Yu, C. Jacobs, J. Bazov, C. Kollmannsberger, C. S. Higano, S. D. Mukherjee, M. E. Gleave, P. S. Stewart, and S. J. Hotte, "A phase I dose-escalation study of apatersen (OGX-427), an antisense inhibitor targeting heat shock protein 27 (Hsp27), in patients with castration-resistant prostate cancer and other advanced cancers," *Ann. Oncol.*, vol. 27, no. 6, pp. 1116–1122, 2016.
- [298] L. Yang, L. Cao, M. Yang, D. Tang, R. Kang, X. Min, S. Zhu, and Y. Yu, "Hsp27: A novel therapeutic target for pediatric M4/M5 acute myeloid leukemia," *Oncol. Rep.*, vol. 29, no. 4, pp. 1459–1466, 2013.
- [299] C. Desterke, C. Bilhou-Nab, B. Guerton, C. Martinaud, C. Tonetti, D. Clay, P. Guglielmelli, A. Vannucchi, D. Bordessoule, H. Hasselbalch, B. Dupriez, N. Benzoubir, M.-F. Bourgeade, O. Pierre-Louis, V. Lazar, W. Vainchenker, A. Bennaceur-Griscelli, H. Gisslinger, S. Giraudier, and Marie-Caroline Le Bousse-Kerdiles, "FLT3-Mediated p38 – MAPK Activation Participates in the Control of Megakaryopoiesis in Primary Myelofibrosis," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 8, pp. 2901–2915, 2011.
- [300] B. A. Hadaschik, J. Jackson, L. Fazli, A. Zoubeidi, H. M. Burt, M. E. Gleave, and A. I. So, "Intravesically administered antisense oligonucleotides targeting heat-shock protein-27 inhibit the growth of non-muscle-invasive bladder cancer," *BJU Int.*, vol. 102, no. 5, pp. 610–616, 2008.
- [301] E. Hadchity, M.-T. Aloy, C. Paulin, E. Armandy, E. Watkin, R. Rousson, M. Gleave, O. Chapet, and C. Rodriguez-Lafrasse, "Heat shock protein 27 as a new therapeutic target for radiation sensitization of head and neck squamous cell carcinoma.," *Mol. Ther.*, vol. 17, no. 8, pp. 1387–94, 2009.
- [302] M. Shiota, J. L. Bishop, K. M. Nip, A. Zardan, A. Takeuchi, T. Cordonnier, E. Beraldi, J. Bazov, L. Fazli, K. Chi, M. Gleave, and A. Zoubeidi, "Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer.," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 10, pp. 3109–19, May 2013.
- [303] M. Zimmermann, D. Traxler, E. Simader, C. Bekos, B. Dieplinger, M. Lainscak, H. J. Ankersmit, and T. Mueller, "In vitro Stability of Heat Shock Protein 27 in Serum and Plasma Under Different Pre-analytical Conditions: Implications for Large-Scale Clinical Studies," *Ann. Lab. Med.*, vol. 36, no. 4, p. 353, 2016.
- [304] L. Neckers and P. Workman, "Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet?," *Clin Cancer Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 64–76, 2012.
- [305] S. Pinz, S. Unser, and A. Rasche, "Signal transducer and activator of transcription STAT5 is recruited to c-Myc super-enhancer," *BMC Mol. Biol.*, vol. 17, no. 1, p. 10, 2016.
- [306] L. Fu and J. J. Liang, "Detection of Protein-Protein Interactions among Lens Crystallins in a Mammalian Two-hybrid System Assay," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 6, pp. 4255–4260,

2002.

- [307] N. Ho, A. Li, S. Li, and H. Zhang, "Heat shock protein 90 and role of its chemical inhibitors in treatment of hematologic malignancies.," *Pharmaceuticals*, vol. 5, no. 8, pp. 779–801, Jan. 2012.
- [308] R. García, D. Merino, J. M. Gómez, J. F. Nistal, M. A. Hurlé, A. L. Cortajarena, and A. V. Villar, "Extracellular heat shock protein 90 binding to TGF β receptor I participates in TGF β -mediated collagen production in myocardial fibroblasts," *Cell. Signal.*, vol. 28, no. 10, pp. 1563–1579, 2016.
- [309] J. Mccready, D. S. Wong, J. A. Burlison, W. Ying, and D. G. Jay, "An impermeant ganetespib analog inhibits extracellular Hsp90-mediated cancer cell migration that involves Lysyl oxidase 2-like protein," *Cancers (Basel)*, vol. 6, no. 2, pp. 1031–1046, 2014.
- [310] W.-C. Liao, M.-S. Wu, H.-P. Wang, Y.-W. Tien, and J.-T. Lin, "Serum heat shock protein 27 is increased in chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma," *Pancreas*, vol. 38, no. 4, pp. 422–6, 2009.
- [311] M. A. Fanelli, F. D. Cuello Carrión, J. Dekker, J. Schoemaker, and D. R. Ciocca, "Serological detection of heat shock protein hsp27 in normal and breast cancer patients.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 7, no. 9, pp. 791–5, 1998.
- [312] M. Korfei, S. Schmitt, C. Ruppert, I. Henneke, P. Markart, B. Loeh, P. Mahavadi, M. Wygrecka, W. Klepetko, L. Fink, P. Bonniaud, K. T. Preissner, G. Lochnit, L. Schaefer, W. Seeger, and A. Guenther, "Comparative proteomic analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and lung transplant donor lungs," *J Proteome Res*, vol. 10, no. 5, pp. 2185–2205, 2011.
- [313] A. Zembron-Lacny, E. Ziemann, P. Zurek, and E. Hübner-Wozniak, "Heat Shock Protein 27 Response to Wrestling Training in Relation to the Muscle Damage and Inflammation," *J. Strength Cond. Res.*, vol. 31, no. 5, pp. 1221–1228, 2017.
- [314] J. Feng, Y. Liu, H. Song, Z. Dai, and L. Qin, "Heat-shock protein 27 : A potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome," *Proteomics*, vol. 5, no. 17, pp. 4581–4588, 2005.
- [315] D. Thuringer, K. Berthenet, L. Cronier, E. Solary, C. Garrido, D. Thuringer, K. Berthenet, L. Cronier, E. Solary, and C. Garrido, "Primary tumor- and metastasis-derived colon cancer cells differently modulate connexin expression and function in human capillary endothelial cells," *Oncotarget*, vol. 6, no. 30, pp. 28800–28815, 2015.
- [316] S. Banerjee, C.-F. L. Lin, K. A. Skinner, L. M. Schiffhauer, J. Peacock, D. G. Hicks, E. M. Redmond, D. Morrow, A. Huston, M. Shayne, H. N. Langstein, C. L. Miller-Graziano, J. Strickland, L. O'Donoghue, and A. K. De, "Heat Shock Protein 27 Differentiates Tolerogenic Macrophages That May Support Human Breast Cancer Progression," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 2, pp. 318–327, 2011.
- [317] H. Tokuda, G. Kuroyanagi, M. Tsujimoto, R. Matsushima-Nishiwaki, S. Akamatsu, Y. Enomoto, H. Iida, T. Otsuka, S. Ogura, T. Iwama, K. Kojima, and O. Kozawa, "Thrombin receptor-activating protein (TRAP)-activated akt is involved in the release of phosphorylated-HSP27 (HSPB1) from platelets in DM patients," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17,

no. 5, 2016.

- [318] G. Minowada and W. Welch, "Variation in the expression and/or phosphorylation of the human low molecular weight stress protein during in vitro cell differentiation.," *J Biol Chem*, vol. 270, no. 13, pp. 7047–7054, 1995.
- [319] R. Ferreira, K. Ohneda, M. Yamamoto, and S. Philipsen, "GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis," *Mol Cell Biol*, vol. 25, no. 4, pp. 1215–1227, 2005.
- [320] A. M. Vannucchi, A. Pancrazzi, P. Guglielmelli, S. Di Lollo, C. Bogani, G. Baroni, L. Bianchi, A. R. Migliaccio, A. Bosi, and F. Paoletti, "Abnormalities of GATA-1 in megakaryocytes from patients with idiopathic myelofibrosis.," *Am. J. Pathol.*, vol. 167, no. 3, pp. 849–58, Sep. 2005.
- [321] S. Saini, L. Teigang, and Y. James, "TNF- α Stimulates Colonic Myofibroblast Migration via COX-2 and Hsp27," *J Surg Res.*, vol. 204, no. 1, pp. 145–152, 2016.
- [322] E. A. Voll, I. M. Ogden, J. M. Pavese, X. Huang, L. Xu, B. D. Jovanovic, and R. C. Bergan, "Heat shock protein 27 regulates human prostate cancer cell motility and metastatic progression.," *Oncotarget*, vol. 5, no. 9, pp. 2648–63, 2014.
- [323] S. Rousseau, I. Dolado, V. Beardmore, N. Shpiro, R. Marquez, A. R. Nebreda, J. S. C. Arthur, L. M. Case, M. Tessier-Lavigne, M. Gaestel, A. Cuenda, and P. Cohen, "CXCL12 and C5a trigger cell migration via a PAK1/2-p38 α MAPK-MAPKAP-K2-HSP27 pathway," *Cell. Signal.*, vol. 18, no. 11, pp. 1897–1905, 2006.
- [324] Y. Kageyama, T. Doi, S. Akamatsu, G. Kuroyanagi, A. Kondo, J. Mizutani, T. Otsuka, H. Tokuda, O. Kozawa, and S. Ogura, "Rac regulates collagen-induced HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase in human platelets," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 32, no. 4, pp. 813–818, 2013.
- [325] K. H. Bock O, Loch G, Büsche G, von Wasielewski R, Schlué J, "Aberrant expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor- α is associated with advanced bone marrow fibrosis in idiopathic myelofibrosis," *hematologica*, vol. 90, no. 1, pp. 8–9, 2005.
- [326] P. Mehlen, A. Mehlen, J. Godet, C. B. Lyon-i, and V. Ce, "hsp27 as a Switch between Differentiation and Apoptosis in Murine Embryonic Stem Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 50, pp. 31657–31665, 1997.
- [327] C. Garrido, "Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers.," *Cell Death Differ.*, vol. 9, no. 5, pp. 483–485, 2002.
- [328] C. Garrido, M. Brunet, C. Didelot, E. Schmitt, and G. Kroemer, "Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties," *cell Cycle*, vol. 5, no. 22, pp. 2592–2601, 2006.
- [329] B. Gibert, B. Eckel, L. Fasquelle, M. Moulin, F. Bouhallier, V. Gonin, G. Mellier, S. Simon, C. Kretz-Remy, A.-P. Arrigo, and C. Diaz-Latoud, "Knock down of heat shock protein 27 (HspB1) induces degradation of several putative client proteins.," *PLoS One*, vol. 7, no. 1, p. e29719, Jan. 2012.

- [330] M. E. Bjørn and H. C. Hasselbalch, "The Role of Reactive Oxygen Species in Myelofibrosis and Related Neoplasms," *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015.
- [331] T. Rogalla, M. Ehrnsperger, X. Preville, A. Kotlyarov, G. Lutsch, C. Ducasse, C. Paul, M. Wieske, A. P. Arrigo, J. Buchner, and M. Gaestel, "Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 27, pp. 18947–18956, 1999.
- [332] J. J. Oaks, R. Santhanam, C. J. Walker, S. Roof, J. G. Harb, G. Ferencak, A.-K. Eisfeld, J. R. Van Brocklyn, R. Briesewitz, S. a Saddoughi, K. Nagata, R. Bittman, M. a Caligiuri, O. Abdel-Wahab, R. Levine, R. B. Arlinghaus, A. Quintas-Cardama, J. M. Goldman, J. Apperley, A. Reid, D. Milojkovic, M. T. Ziolo, G. Marcucci, B. Ogretmen, P. Neviani, and D. Perrotti, "Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies.," *Blood*, vol. 122, no. 11, pp. 1923–34, Sep. 2013.
- [333] F. Lamoureux, C. Thomas, M.-J. Yin, L. Fazli, A. Zoubeidi, and M. E. Gleave, "Suppression of Heat Shock Protein 27 Using OGX-427 Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Potentiates Heat Shock Protein 90 Inhibitors to Delay Castrate-resistant Prostate Cancer.," *Eur. Urol.*, pp. 1–11, Dec. 2013.
- [334] N. Bhagwat, R. L. Levine, and P. Koppikar, "Sensitivity and resistance of JAK2 inhibitors to myeloproliferative neoplasms," *Int. J. Hematol.*, vol. 97, pp. 695–702, 2013.

Annexe

Annexe 1 :

Tableau des inhibiteurs de HSP90

Les inhibiteurs de HSP90 en thérapie

Composé	Types de cancers	Mécanisme moléculaire
2-Amino-7-[4-fluoro-2-(3-pyridyl)phenyl]-4-methyl-7,8-dihydro-6H-quinazolin-5-one oxime	Modèle de xénogreffe de cancer colorectal (HCT-116)	Cible le domaine N-terminal
AT13387	Cancer du nasopharynx	Induit la senescence cellulaire
BJ-B11	Leucémie myéloïde chronique, cellules K562	Induit l'apoptose
Celastrol	Cellules de leucémie myéloïde chronique	Diminue BCR-ABL et induit l'apoptose
CH5164840	Cancers gastriques et cancer du sein	Induit la dégradation des protéines clientes ainsi que l'apoptose
CUDC-305	Xénogreffe de tumeurs de glioblastome (U87MG) / modèles animaux de cancer du sein (MDA-MB-468) / leucémie myéloïde aigue (MV4-11)	Inhibe la voie (PI3K/AKT et RAF/MEK/ERK), induit l'apoptose
3,4-Diarylpyrazole (CCT018159)	Cellules de cancer du côlon (HCT116)	Inhibe l'activité ATPasique
DMAG-N-oxide	Cellules tumorales de mélanome (B16)	Inhibe la réorganisation du cytosquelette
17-DMCHAG	Cancer de la prostate	Diminue les facteurs de transcription et la vimentine, augmente la E-cadhérine induit la dégradation de la survivine et du récepteur à l'androgène
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	Cancer de la prostate	Se lie au domaine C-Terminale de HSP90
FK228	Cellules tumorales leucémiques (K562)	Hyper-acétylation de HSP70
FW-04-806	Cancer du sein	Inhibe l'apoptose en se liant au domaine N-terminal de HSP90 et inhibe son interaction avec le CDC37
Gedunin	Cellules tumorales du cancer du sein (MCF-7 et SkBr3)	
Ganetespiib	Cancers gastriques, du sein et colorectale	Induit l'arrêt du cycle et l'apoptose
Herbimycin A (HMA)	Cancer de la thyroïde	Inhibe la croissance et reverse l'EMT en activant l'E-cadhérine, p21, et p27 et inactive la voie de p53 et PI3K/AKT
HSP990	Glioblastome	Augmente l'inhibition de PI3K
IPI-493	Xénogreffes de tumeurs gastro-intestinales humaines	Induit l'apoptose et la nécrose Inhibe la voie des récepteurs aux kinases
IPI-504	Cancer du poumon et lymphome	Diminue GRP78
KU135	Cellules tumorales de leucémie humaine	Se lie à HSP90 et induit la dégradation ses protéines clientes Induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose
Mycoepoxydiene	Cervicale	Module la voie des kinases

Composé	Types de cancers	Mécanisme moléculaire
N-(4-hydroxy-3-(2-hydroxynaphthalene-1-yl) phenyl)-arylsulfonamides	Cellules tumorales du sein (SKBr3)	Inhibe l'activité ATPasique
Novobiocin		Interagit avec le domaine ATP de HSP90
NVP-BEP800	Le myélome multiple	Inhibe la voie de la survie et cause la déplétion des protéines clientes
NXD30001	Modèle murin de glioblastome	Inhibe les protéines clientes de HSP90
Onalespib	Cellules tumorales de cancer de la prostate	Bloque l'épissage et les récepteurs aux androgènes
PU-H71	Cancer du sein triple négatif	Inhibe les voies RAS/RAF/MAPK ; induit l'apoptose via AKT et BCL-XL
TAS-116	Modèle murin de cancer du poumon	Réprime les protéines clientes de HSP90
SNX-2112	Foie et myélome multiple	Abroge la voie d'Akt et de ERK
SNX-25a	Lignées cellulaires K562/SW-620/ A375/ Hep-2/ MCF-7/ HepG2/ HeLa/ A549	Induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose
SNX-7081	Leucémie lymphoïde chronique	Dérégule les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et dans le cycle cellulaire
SST0116CL1 (4-amino substituted resorcino-isoxazole)		Se lie à la poche ATP de HSP90 et cause la dégradation de protéines clientes
STA-1474	Lignée cellulaire d'ostéosarcome	Induit l'activation de la caspase-3 et diminue p-Met/Met et p-Akt/Akt
Sti1		Inhibe l'activité ATPasique, prévient de la dimérisation et du cycle de l'ATP de HSP90
Withaferin A	Cancer du pancréas	Induit l'apoptose et la dégradation des protéines clientes de HSP90
WK88-1	Cancer du Poumon	Diminue l'expression de protéines clientes de HSP90 tels qu'EGFR, ErbB2, ErbB3, MET, et AKT
XL888	Modèle de xénogreffe de souris de cancer gastrique (NCI-N87)	Diminue les protéines clientes de HSP90

D'après l'article de J. Wu, et col, 2017

Annexe 2:

Impact of HSP27 in myelofibrosis: a new partner of JAK2/STAT5

Sevin M, Pernet N, Causse C, Vitte F, Kubovcakova L, Villeval JL, Lacout C,
Cordonnier M, Rodrigues-Lima F, Chanteloup G, Mosca M, Chrétien ML, Bastie
JN, Audia S, Sagot P, Ramla S, Martin L, Gleave M, Mezger V, Skoda R, Plo I,
Garrido C, Girodon F and de Thonel A

SEVIN et al., Nature Communications 2017, In submission

TITLE PAGE

Impact of HSP27 in myelofibrosis: a new partner of JAK2/STAT5

Margaux Sevin^{1,2}, Nicolas Pernet^{1,2}, Sébastien Causse^{1,2}, Franck Vitte⁵, Lucia Kubovcakova⁶, Jean Luc Villeval^{7,8}, Catherine Lacout^{7,8}, Marine Cordonnier^{1,2}, Fernando Rodrigues-Lima⁹, Gaétan Chanteloup^{1,2}, Matthieu Mosca^{7,8}, Marie-Lorraine Chrétien¹⁰, Jean Noël Bastie^{1,2,10}, Sylvain Audia¹⁰, Paul Sagot¹⁰, Selim Ramla¹⁰, Laurent Martin¹⁰, Martin Gleave¹¹, Valérie Mezger¹²⁻¹⁴, Radek Skoda⁶, Isabelle Plo^{7,8}, Carmen Garrido^{1-4*}, François Girodon^{1,2,10,*} and Aurélie de Thonel^{1,2,12,13,*} †

¹University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France ; ²INSERM, UMR1231, Dijon, France ; ³Centre Georges François Leclerc (CGFL), Dijon, France; ⁴Scientific Cooperation Foundation (FCS) of Bourgogne Franche-Comté, LipSTIC LabEx, Dijon, France ; ⁵Cypath, Dijon, France; ⁶Department of Biomedicine, Experimental Hematology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland ; ⁷University Paris XI, UMR1170, Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁸INSERM, UMR1170, Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif, France; ⁹Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité BFA, CNRS UMR 8251, 75013, Paris, France; ¹⁰Hospital University Center (CHU), Dijon, France ; ¹¹The Vancouver Prostate Centre, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada; ¹²CNRS, UMR7216 Épigénétique et Destin Cellulaire, Paris Cedex 13, France; ¹³University of Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris Cedex 13, France ; ¹⁴Département Hospitalo-Universitaire DHU PROTECT, Paris, France

*** These authors jointly supervised this work**

† **Corresponding authors: Aurélie de Thonel**

7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21033 Dijon, France

Tel: (+33) 3 80 39 34 65

Fax: (+33) 3 80 39 34 34

Abstract:

Heat shock protein 27 (HSP27) is a stress inducible chaperon that facilitates cancer development by its proliferative and anti-apoptotic functions. Moreover, our team has previously shown the beneficial effect of a new generation antisense oligonucleotide against HSP27, OGX-427 (Phase II in solid cancers), in idiopathic pulmonary fibrosis. We report here the effect of OGX-427 in a murine model of thrombopoietin-induced myelofibrosis. OGX-427 limited the progression of the disease associated with a reduction of spleen weight and megakaryocytic expansion. We show that HSP27 regulates JAK2/STAT5 proliferative effect through direct interactions, and report increased expression of HSP27 in CD34⁺ circulating progenitors and in serum of patients with *JAK2*-dependent myelofibrosis disorders. We propose that HSP27 plays a key role in the pathophysiology of myelofibrosis and represents a new potential therapeutic target for patients with *JAK2*-dependent myelofibrosis disorders, including those resistant to conventional therapy.

Introduction:

Heat shock proteins (HSPs) are highly conserved molecular chaperones whose synthesis is induced by different stresses, in both environmental and pathophysiological conditions ¹. HSP70 and HSP27 are the most strongly induced proteins by aggressions such as oxidative stress, anti-cancer agents or ionizing radiation ². These HSPs were originally characterized as chaperones due to their ability to prevent aggregation and restore proteostasis and to their participation in the transport of proteins. These HSPs also have a strong cytoprotective action through inhibition of apoptosis and autophagy processes ^{3,4}. Because cancer cells have to re-wire their metabolism, they have a strong need of chaperones for their survival. As a consequence, HSPs are abnormally abundant in cancer cells and have become potent targets in cancer therapy ⁵.

HSP27 belongs to the family of small heat shock proteins. HSP27 is overexpressed in solid cancers, including prostate and breast cancers, as well as in haematological malignancies ⁶⁻⁸ and contributes to tumorigenesis and resistance to chemotherapy *via* its proliferative and anti-apoptotic functions ^{9,10}. HSP27 is secreted and has been found in the serum of cancer patients, where its presence is often associated with poor prognosis ^{11,12}. In addition, our team recently demonstrated the beneficial effect of a new generation antisense oligonucleotide against HSP27, OGX-427, which targets the human and rodent *Hsp27* translation initiation site ^{13,14}, in a murine model of idiopathic pulmonary fibrosis¹³. This compound is currently under clinical evaluation (phase II clinical trials) as a chemo-sensitizing agent

in solid tumors¹⁵. Furthermore, we and others have shown that HSP27 was strongly expressed in samples from patients with idiopathic pulmonary and kidney tubulointerstitial fibrosis^{13,16}.

Myelofibrosis (MF) is a chronic and degenerative disorder associated with megakaryocytic abnormalities and progressive marrow fibrosis, in which fibrous tissues replaces the red bone marrow. These two distinctive features are used in patients to monitor the progression of the disease¹⁷. The clinical features of MF generally include constitutional symptoms, splenomegaly and progressive marrow failure, which result in reduced life expectancy. MF are mostly related to myeloproliferative neoplasms (MPN) but can also be induced following treatment with hematopoietic growth factors like thrombopoietin (TPO)^{17,18}. One of the most frequent signalling pathway involved in MF pathogenesis is the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway. The aberrant activation of the JAK/STAT pathway may result from somatic mutations directly affecting JAK activity, excessive cytokine stimulation like TPO, and/or epigenetic modifications leading to abnormal gene regulation¹⁹⁻²¹.

Given the reported role of HSP27 in leukemia and in fibrotic disorders, we hypothesized that HSP27 might be involved in MF. We evaluated the role of this chaperone using OGX-427, a specific HSP27 inhibitor, in a murine model of TPO-induced MF (TPO^{high}), which is characterized by the constitutive activation of the thrombopoietin receptor (MPL) and JAK2 signalling pathway¹⁵. Furthermore, we assessed the impact of HSP27 on the JAK2/ STAT pathways and addressed the status of HSP27 in samples from patients with MPN-associated with MF.

Materials and methods:

Reagents: OGX-427, a second-generation antisense oligonucleotide inhibitor (Patent PCT n° 10/605, 498, 2005; <http://www.oncogenex.ca>) and the oligonucleotide control were synthesized by OncoGenex Pharmaceuticals. Antibodies used for western blot include anti-JAK2 (dilution 1:1000, #3230), anti-phospho-JAK2 (dilution 1:1000, #3771), anti-STAT5 (dilution 1:1000, #9363), anti-phospho-STAT5 (dilution 1:1000, #4322) and anti-c-MYC (dilution 1:1000, #9402) purchased from Cell Signalling technologies; anti-HSP27 (dilution 1:1000, SPA-803 (human), SPA801 (murin)), -HSP70 (dilution 1:1000, SPA-810), -HSP90 (dilution 1:1000, AC88) were purchased from Enzo Life Sciences and anti-beta-actin-peroxydase (dilution 1:25000, A3854) from Sigma. Antibodies used for proximity ligation assay (PLA) include anti-HSP27 (dilution 1:100, SPA-800); anti-JAK2 (dilution 1:100, #3230); anti-STAT5 (dilution 1:100, #9363). Antibodies for flow cytometry include anti-CD34 PE-Cy7 (#348811), -CD45 APC (#555485), -Mouse IgG FITC purchased from BD Biosciences and anti-HSP27 FITC (SPA-800FI), -HSP70 FITC (SPA-810FI), -HSP90 Alexa 488 (SPA830-488) from Enzo Life Sciences. Secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories. The two siRNAs against HSP27 (siRNA#1: 122371, siRNA#2: S6991; Ambion) and siRNA control (Negative control #1, Sigma-aldrich) were purchased from Ambion.

Cell line and transfections: The *JAK2V617F*-positive human leukemic cell line HEL92.1.7 (ACC-11, DSMZ) and SET2 (ACC-608, DSMZ) and the *JAK2V617F*-negative human leukemic cell line K562 (ACC-10, DSMZ) were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (HEL92.1.7 and K562) or 20% (SET-2) v/v foetal bovine serum. All cell lines were tested for mycoplasmas. Cells were transfected with siRNA against HSP27 (siHSP27), siRNA control (CTL), or OGX-427 using Amaxa Nucleofector system (Lonza) according to suppliers' instructions.

Proliferation assay: Untransfected (NT) and transfected cells with siHSP27, OGX-427 and siCTL were plated in 96-well plate in triplicate, 48h post transfection, in 100 μ L media. Cell proliferation was determined by the cell proliferation assay (XTT, Roche). Briefly, 50 μ l of XTT labelling mixture was added in each well for 4h and cell proliferation was determined by absorption at 490 nm with a reference wavelength at 650 nm.

Western blot analysis: Protein extracts from cells and spleen tissues were prepared using a modified Laemmli buffer (5% Sodium Dodecylsulfate, 10% glycerol, 32.9 mM TRIS-HCL pH 6.8) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). 30 μ g of proteins from lysates were subjected to migration on 8-12% acrylamide gels and transferred on PVDF membranes (GE Healthcare Europe GmbH) in borate buffer (50mM Tris HCl and 50mM borate) for 1h45 at constant voltage (48V). Membranes were washed in TBS-Tween 0.1% and incubated with HRP-coupled secondary antibody or beta-actin peroxidase antibody (Sigma). The signal was revealed using a chemiluminescent reagent (Luminata Crescendo Western HRP substrate reagent, Merck Millipore) and was detected using a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

Protein interaction studies: For *in vitro* interaction experiments, we used the biolayer interferometry technology (Octet Red, Forté-Bio). Recombinant HSP27 (Enzo-Life Sciences, ADI-ESP-715 (produced in E.Coli, low endotoxin)) was desalted (Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 0.5 mL (Fisher 1034-1164) and biotinylated at a molar ratio biotin/protein (3:1) for 30 min at room temperature (EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Fisher 1189-1195)). Excess of Biotin was removed using Zeba™ Spin Desalting Columns. Biotinylated recombinant HSP27 was used as a ligand and immobilized at 10 μ g/ml on streptavidin biosensors after dilution in PBS (600s). Interaction with desalted analytes diluted in PBS at 125nM (recombinant STAT5a/b (Origen TP305753 and TP309429, respectively), JAK2 (Origen TP320503) or as a negative control the RING domain of CBP (gift from Dr. Rodrigues-Lima (Duval *et al.*, 2015) or as a positive control the alphaB-Crystallin (Enzo-Life Sciences, ADI-SPP-228) was analysed after association (600s) and dissociation (600s) steps at 26°C. For endogenous interaction experiments, we performed co-immunoprecipitations and proximity ligation assays (PLA) in HEL92.1.7 cells. For immunoprecipitation, HEL92.1.7 cells were first

deprived of serum for 16h and then stimulated 10 min with 10% serum or increasing doses of erythropoietin (EPO, 15 and 50 UI/ml). Cells were lysed in Lysis buffer (50 mM Hepes pH8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, Triton X-100 0,1%, Glycerol 10 %, 0,25 mM DTT, NaVO₄ 10mM, NaF 10mM, proteases inhibitors). Precleared cell lysates were subjected to immunoprecipitation for 3h using an anti-mouse HSP27 antibody (2µg, SPA-800, Enzo Life Sciences) or a mouse IgG (I5381, Sigma-Aldrich) as a negative control that were pre-incubated 1h at RT with Protein G UltraLink Resin beads (Pierce). Protein complexes were then washed 4 times in lysis buffer and suspended in 2X laemmli buffer. After boiling, the immunoprecipitates were resolved in 8-12% SDS-PAGE and immunoblots were performed using an anti-rabbit STAT5, JAK2 or HSP27 antibody. For PLA, HEL92.1.7 cells transfected or not with HSP27 siRNA#1 or control siRNA, were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in chilled methanol, blocked with 3% BSA, then incubated overnight with anti-HSP27 and -JAK2 or -STAT5 antibodies. PLA was carried out according to suppliers' instructions (Olink). Cells were mounted with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) containing prolong diamond (Life Technologies). JAK2 or STAT5 interaction with HSP27 was visualized *in situ* using an axio imager 2 (Zeiss, France) and analyzed using ICY software.

Murine model and analysis of mice: Specific pathogen-free C57BL/6J female mice between 2 and 4 months of age were purchased from Janvier (Lyon, France) and maintained in sterile housing in accordance with the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Paris, France). Rodent laboratory food and water were provided *ad libitum*. All experiments were approved by the Comité d'Éthique de l'Université de Bourgogne. All animal procedures were performed with inhalation anaesthesia with isoflurane (TEM, Lormont, France). To generate the TPO^{high} model, mice were lethally irradiated and animals were injected with transduced bone marrow cells (retrovirus MPZenTPO) as previously described^{22,23}. Mice were randomized based on blood count 30 days after transplantation and injected intraperitoneally, 3 times per week, with 10mg/kg OGX-427, or a control oligonucleotide. TPO^{high} mice were treated for 5 weeks and euthanized 4 weeks after the last injection (Fig. 1a). Haematocrit platelet and WBC counts were determined using an automated counter (Scil Vet abc Plus+, Horiba) on blood collected from the tails in EDTA tubes all along the study. At the end of the study, spleens were weighted, measured and collected in 4% paraformaldehyde for histopathology studies or frozen at -20°C for western blot analysis. The concentration of HSP27 in serum from control mice was measured by ELISA, 3 months after the transplantation. For bone marrow analysis, femurs were collected, fixed in 4% phosphate-buffer formalin, embedded in paraffin and sectioned. Tissues sections were stained with H&E for morphology analysis, which was performed in blinded fashion. Images were organized in folder identified by letters by one person and quantified by another. A minimum of n = 9 mice were used for each experiment, which was sufficient to provide adequate power for these experiments (0.90) (inVivoStat analysis).

Patient samples: Patient samples (serum, blood and histological section) were obtained from the University Hospital of Dijon and Gustave Roussy (France). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki with the consent of each patient, and approval was obtained from the local ethics committee ESTI (NCT02873832).

Flow cytometry: Mononuclear cells (PBMC) from peripheral blood or cord blood were collected in EDTA tubes and isolated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation. PBMC were immunostained with anti-CD34-PE-Cy7 and anti-CD45-APC antibodies in stain Buffer (BD Biosciences) for 45 minutes and washed. Cells were fixated and permeabilized in commercial solution (BD biosciences) and then stained using anti-HSP FITC/Alexa488 or anti-mouse IgG FITC control antibody for 30 minutes. After wash, cells were analysed by flow cytometry. The CD45^{low}/CD34^{high} population was gated and the median fluorescence intensities of intracellular HSPs were evaluated.

Immunoassays: Blood samples were centrifuged at 20°C for 15 min at 2500 × g, and serum aliquots were stored at -80°C for subsequent analysis. Since some HSPs are known to be unstable in plasma, we used serum for the analysis²⁴. Serum levels of HSP70, HSP90α and HSP27 in patients and serum level of HSP27 in mice were quantified using specific enzyme-linked (ELISA) kits according to the manufacturer's protocol [human HSPs: ADI-EKS-715, ADI-EKS-895 ADI-EKS-500, (Enzo Life Sciences); mouse HSP27: SEA693Mu, (Cloud Clone Corp)]. Before quantification, sera were diluted at 1:50 for HSP90α, 1:4 for HSP70 and 1:10 dilution for HSP27 or 1:2 dilution to detect mouse HSP27.

Immunohistochemistry: Patients biopsies immunohistochemistry was performed using an automated Leica Bond Max on formalin-fixed, paraffin-embedded spleen sections (5 μm). Sections were deparaffinised and rehydrated through a graded series of xylene-ethanol baths. Antigen retrieval was performed using Citrate Buffer pH 6,0 for 20 min at 95°C. Tissue sections were incubated with primary antibody for 1 hour at room temperature. The antibodies were used at 1:100 dilution for anti-HSP27 (SPA-800); 1:500 dilution for anti-HSP70 (ab47455); 1:500 dilution for anti-HSP90α (ab59459). Visualization was performed using Novolink™ Polymer Detection Systems (Leica biosystems). Tissue sections were counterstained with haematoxylin, dehydrated, and mounted. Analysis was performed in blinded fashion. Images were organized in folder identified by patient ID by one person and quantified by another.

Statistics: Data are displayed as means ± SEM. Statistical significance between 2 groups was assessed using the unpaired *t* test with Welch's correction (for CD34⁺ HPC from patients) or the Mann-Whitney test in regard to the distribution of tested population. Similarity of variance was tested before

application of any statistical test using GraphPad PRISM (San Diego, CA, USA). P values less than 0.05 were considered significant.

Results and discussion:

Treatment with an HSP27 inhibitor impairs myelofibrosis progression in a TPO^{high} murine model.

To assess the role of HSP27 in bone marrow fibrosis, we used a murine model recommended to study the establishment of the myelofibrotic features²⁵: the TPO^{high} murine model. This model reproduces some myelofibrotic traits found in human primary MF^{22,25}, such as megakaryocyte hyperplasia, anaemia, extramedullary haematopoiesis, splenomegaly and myelofibrosis. Also, the persistent production of TPO^{22,23} in the mice induces the constitutive activation of the JAK2/STAT signalling in MPL-expressing hematopoietic cells (Fig. 1a). As shown in Figure 1b, we clearly observed in this TPO^{high} model an increased HSP27 level in the serum compared with wild type mice.

One month later, once the myelofibrosis-like features established, mice were treated with the specific inhibitor of HSP27, OGX-427, using a validated non-toxic dose (10mg/kg)¹⁴, conditions which induced a 65% decrease in HSP27 expression in splenocytes compared to control mice treated with a non-relevant antisense oligonucleotide (Fig. 1c). OGX-427 treatments had no direct effects on blood parameters (Supplementary Fig. 1a) or on the committed fibrosis (data not shown) probably due to the incomplete decrease in HSP27 levels. In contrast, OGX-427 treatment resulted in a marked reduction of spleen weight (30%) and size, a major criterion of treatment efficacy in humans (Fig. 1d-e). In agreement with this result, spleen sections revealed hyperplasia of the red pulp in TPO^{high} mice and partial restoration of the white pulp territories in OGX-427-treated mice compared to CTL (Fig. 1f). These results strongly suggest that OGX-427 treatment enabled a partial restoration of the normal splenic architecture. In addition, the decrease in erythropoiesis in the bone marrow was more pronounced in control mice than in OGX-427-treated mice whereas megakaryocytic hyperplasia was less marked in OGX-427-treated mice than in controls (Fig. 1g), suggesting a beneficial effect of OGX-427 treatment on erythropoiesis and on the reduction in megakaryocytic expansion. Accordingly, the three month-survival after transplantation was improved in mice treated with OGX-427 (Supplementary Fig. 1b). To validate these results, we evaluated the effect of HSP27 inhibition in another JAK2-dependant MPN associated with MF (*JAK2V617F* transgenic mice: *ScfCre;FFI;GFP*²⁶. Supplementary Fig. 2a-e). In accordance with the results obtained in the TPO-high mice model, OGX-427 treatment significantly reduced the weight of the spleen (with a decrease in phosphorylated STAT5, Supplementary Fig 2b-c) and the frequency of megakaryocytes showed a near-significant decrease in the spleen. Furthermore, in this mice model, the platelet counts were almost back to the normal levels at the end of the treatment with OGX-427 whereas they remained very high in the

control group (Supplementary Fig. 2e). Altogether, these results might suggest an inhibitory effect of OGX-427 on megakaryopoiesis.

Another chaperone, HSP90 - known to stabilize JAK2 - has been reported as a potential therapeutic target in JAK2-dependent MPN associated with MF (in clinical phase I ²⁷). Nevertheless, HSP90 inhibitors, probably because of their toxicity, induce the expression of HSP70 and most likely HSP27, as previously shown in other cancers^{28,29}. OGX-427, in contrast to the HSP90 inhibitors, is a very selective inhibitor with so far no reported toxicity (clinical phase I and II) and does not induce HSP70 or HSP90 expression in TPO^{high} mice or in the *JAK2V617F* positive (HEL92.1.7 and SET2) and negative (K562) cell lines (Supplementary Fig. 1c and 3a).

HSP27 affects proliferation of *JAK2V617F* positive cells and interacts directly with JAK2 and STAT5

Since HSP27 depletion has a beneficial impact on the progression of the disease, we explored whether HSP27 plays a role in the proliferative effect of JAK2/STAT5. HSP27 was depleted by means of two specific siRNAs, a shRNA or OGX-427 in the two leukemic cell lines: HEL92.1.7 (erythroleukemia cell line) and SET2 (megakaryoblastic cell line), which bear a *JAK2* mutation (*JAK2V617F*) that constitutively activates the JAK2 signalling pathway. HSP27 depletion by the three different approaches affected cell proliferation induced by the constitutively activated *JAK2* mutant (Fig. 2a, supplementary Fig. 3b), but not apoptosis (Supplementary Fig. 3c), with a more pronounced effect on the megakaryoblastic SET2 cell line (Fig. 2a). It is worth to note that HSP27 depletion did not have any effect on the proliferation of the *JAK2V617F* negative cell line K562, suggesting a role for HSP27 on *JAK2V617F* positive cell proliferation. An effect of HSP27 on cell proliferation was confirmed on primary cells from patients by performing an erythroid colony formation assay. We found that HSP27 depletion by means of a specific shRNA induced a decrease in BFU-E from MPN patients along with a specific effect on *JAK2V617F* cells (Supplementary Fig. 3e-g).

At the molecular level, depletion of HSP27 decreased phosphorylated STAT5. Consequently, the expression of the STAT5 target c-MYC, a modulator of proliferative signals, was reduced (Fig. 2b, supplementary Fig. 3d).

We next performed *in vitro*, *in cellulo* and *in situ* experiments to determine whether HSP27 interacts with JAK2/STAT. Using biolayer interferometry, we showed that recombinant JAK2 and STAT5a/b interacted directly with immobilized biotinylated HSP27 within the same range as alphaB-crystallin, a well-known partner of HSP27 used here as a positive control ³⁰ (Fig. 3a, Supplementary Fig 4a-c).

JAK2 or STAT5 association with HSP27 was next determined by co-immunoprecipitation experiments using endogenous or exogenous tagged proteins (Fig. 3b, supplemental Fig. 4d,e). For interaction between endogenous proteins, HEL92.1.7 cells were first deprived of serum for 16h and then stimulated 10 min with serum or increasing doses of erythropoietin (EPO, 15 and 50 UI/ml) to stimulate the JAK2/STAT5 signalling. Endogenous HSP27 was immunoprecipitated from cell lysates

followed by immunodetection of endogenous JAK2 and STAT5. As shown Figure 3b, and in line with the biolayer interferometry results, HSP27 interacted with JAK2, and with STAT5 mainly in cells stimulated with EPO (50 UI/ml). The interactions were confirmed in transfected cells expressing tagged proteins (Supplementary Fig. 4d,e).

We then confirmed these results, by proximity ligation assay (PLA) by analysing JAK2 or STAT5 interaction with HSP27 within the HEL92.1.7 cells (Fig. 3c). The number of detected interaction foci per cells was significantly lower in siRNA HSP27 transfected compared to control HEL92.1.7 cells (Fig. 3c). Using the same approach, we determined whether HSP27 affected JAK2 interaction with STAT5. As shown Fig. 3c, depletion of HSP27 by siRNA significantly decreased JAK2 and STAT5 association.

Altogether, our results thus indicate that the chaperone HSP27 is involved in JAK2/STAT5 proliferative effect. One hypothesis is that HSP27, as previously shown with other HSP27 client proteins³¹⁻³⁴, could act as a scaffold protein or favour the molecular assembly JAK2/STAT5.

Patients with MPN-associated MF display high intracellular and extracellular HSP27 levels.

On the basis of our previous *in vivo* and *in vitro* results, we determined the expression levels of HSP27 in patients with an MPN-associated MF. In this type of MF, acquired mutations (*JAK2V617F*, calreticulin (*CALR*) or *MPL* mutations) constitutively induce the JAK2 signalling pathways.

As a first approach, we evaluated the HSP27 levels in CD34⁺ circulating hematopoietic progenitor cells (HPC) isolated from the blood of MF patients and healthy donors by flow cytometry. We observed that HSP27 levels in CD34⁺ HPC from MF patients were significantly higher than those in healthy donors (HD) (Fig. 4a). In contrast, HSP70 and HSP90 levels within CD34⁺HPC in MF patients were not different from those in HD. Knowing that HSPs can also be secreted we assessed the extracellular content of HSPs in MF patient serum by ELISA. Again, significantly higher levels of HSP27 were detected in MF patient serum compared to HD as previously observed in the TPO^{high} mouse model (Fig. 4b). High levels of extracellular HSP27 have also been reported in patients with hepatic and breast cancer^{11,12} and in non-cancer pathologies involving chronic inflammation^{35,36}, an important process for MPN clonal evolution^{37,38}. Notably, increased HSP27 levels in HPC and in serum from patients were detected independently of *JAK2V617F*, *CALR* or *MPL* mutation (data not shown, all three mutant proteins that are indeed known to activate constitutively the JAK2/STAT pathway). HSP70 levels in patient serum were again not different from those in HD (Fig. 4a-b). In contrast, HSP90 levels in serum samples were higher in MF than in HD, highlighting the involvement of HSP90 in MPN^{28,39} and suggesting that the extracellular form of HSP90 might play a role and/or could be used as a biomarker in MF.

In line with the results described above, HSP27 was strongly expressed in bone marrow biopsies from MF patients whereas only a few myeloid cells were positive for HSP90 and none for HSP70 (Fig. 4c).

More precisely, HSP27 was detected in megakaryocytes and in the endothelial cells (Fig. 4c). Previous studies also reported increased levels of HSP27 in endothelial cells from fibrotic tissues⁴⁰ and in MF megakaryocyte progenitors⁴¹. Altogether, these results suggest that HSP27 is a potential new player in MPN-associated MF.

Concluding remarks

In conclusion, our results show that a specific inhibitor of HSP27, OGX-427, limits the progression of the myelofibrosis in a murine model of TPO-induced MF characterized by the constitutive activation of the JAK2 signalling. We demonstrated that OGX-427 was associated with a reduction in spleen weight and size and a decrease in myeloid proliferation in the spleen and bone marrow, as well as in megakaryocytic expansion. At the molecular level, we show for the first time that HSP27 may chaperon JAK2/STAT5, a central signalling pathway activated in MF-associated MPN and also in other pathologies⁴²⁻⁴⁴. In MF-associated MPN patients, we demonstrated an increase in the expression of HSP27 in CD34⁺ HPC, which might be involved in the excessive growth of these cells. We also observed an increase of the secreted HSP27 in the serum of these patients, suggesting that HSP27 could be a possible therapeutic target in this disease. Altogether, our results support a key role for HSP27 in the pathophysiology of MF and highlight a potential interest of HSP27 inhibitors as a complementary approach for MF-associated MPN treatment, particularly interesting in patients that are resistant to JAK2 inhibitors^{45,46}.

Acknowledgments:

The authors thank the patients and healthy donors for participating and donating samples to make this research possible. The authors thank the Cellimap platform for immunohistochemistry, Dr. Kevin Cheesman and Mr. Philip Bastable (University Hospital, Dijon, France) for revising the manuscript and Dr Vincent Ribrag for patients' serum samples.

This work was funded by “La Ligue contre le cancer”, the “Association pour la Recherche sur le Cancer”, the association “Laurette Fugain” and the GR-Ex 2014.

Contributions:

M.S. design the majority of experiments, performed the research, and analysed data; N.P, M.C and G.C performed BLI experiments, ELISA and immunoblotting; S.C. designed the PLA study; L.K, J.L.V. and C.L. generated the mouse models; F.V. analyzed the immunohistochemistry from mice; F.L.R gave us the domain of CBP, M.G. gave the drug (OGX-427); M.L.C., J.N.B., S.A., P.S., S.R., L.M., and I.P. collected patient sample; A.D.T., F.G. and C.G. directed the work, supervised the

experiments and wrote the paper; I.P., R.S and V.M. belong to the advisory PhD committee and revised the manuscript. All authors have seen and approved the final version of the manuscript before submission.

Competing interests:

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence:

Aurélie de Thonel or François Girodon, 7 Boulevard Jeanne d'ARC, 21033 Dijon, France; e-mail: aurelie.dethonel@u-bourgogne.fr, francois.girodon@chu-dijon.fr.

References

1. Kampinga, H. H. *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* **14**, 105–111 (2009).
2. Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Schmitt, E. & Kroemer, G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *cell Cycle* **5**, 2592–2601 (2006).
3. Lanneau, D. *et al.* Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 743–61 (2008).
4. Dokladny, K., Myers, O. B. & Moseley, P. L. Heat shock response and autophagy. *Autophagy* **11**, 200–213 (2015).
5. Jego, G., Hazoume, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* (2010). doi:10.1016/j.canlet.2010.10.014
6. Hajare, M., François, G., Fontenay, M. & Garrido, C. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Exp. Cell Res.* (2012).
7. Acunzo, J., Andrieu, C., Baylot, V., So, A. & Rocchi., P. Hsp27 as a therapeutic target in cancers. *Curr. Drug Targets* **15**, 423–431 (2014).
8. Vidyasagar, A., Wilson, N. a & Djamali, A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, 7 (2012).
9. Straume, O. *et al.* Suppression of heat shock protein 27 induces long-term dormancy in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8699–8704 (2012).
10. Zhang, S. A. I. *et al.* Heat shock protein 27 promotes cell proliferation through activator protein-1 in lung cancer. *Oncol. Lett.* **9**, 2572–2576 (2015).

11. Feng, J., Liu, Y., Song, H., Dai, Z. & Qin, L. Heat-shock protein 27 : A potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome. *Proteomics* **5**, 4581–4588 (2005).
12. Banerjee, S. *et al.* Heat Shock Protein 27 Differentiates Tolerogenic Macrophages That May Support Human Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* **71**, 318–327 (2011).
13. Wettstein, G. *et al.* Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J* **27**, 1549–1560 (2013).
14. Kamada, M., So, A., Muramaki, M., Kamada, M. & So, A. Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells inhibit tumor growth and enhance chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 299–308 (2007).
15. Baylot, V. *et al.* OGX-427 inhibits tumor progression and enhances gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer. *Cell Death Dis.* **2**, e221 (2011).
16. Vidyasagar, A., Reese, S., Acun, Z., Hullett, D. & Djamali, A. HSP27 is involved in the pathogenesis of kidney tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Ren. Physiol* **295**, 707–716 (2008).
17. Kuter, D. J., Bain, B., Mufti, G., Bagg, A. & Hasserjian, R. P. Bone marrow fibrosis: Pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br. J. Haematol.* **139**, 351–362 (2007).
18. Ghanima, W. *et al.* Bone marrow fibrosis in 66 patients with immune thrombocytopenia treated with thrombopoietin-receptor agonists: A single-center, long-term follow-up. *Haematologica* **99**, 937–944 (2014).
19. Mascarenhas, J., Roper, N., Chaurasia, P. & Hoffman, R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: A target for novel therapeutic strategies. *Clin. Epigenetics* **2**, 197–212 (2011).
20. Cross, N. C. P. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 208–14 (2011). doi:10.1182/asheducation-2011.1.208
21. Tefferi, A. *et al.* Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: A comprehensive cytokine profiling study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1356–1363 (2011).
22. Villeval, J. *et al.* High Thrombopoietin Production by Hematopoietic Cells Induces a Fatal Myeloproliferative Syndrome in Mice. *Blood* **90**, 4369–4383 (1997).
23. Debeurme, F. *et al.* JAK2 inhibition has different therapeutic effects according to

- myeloproliferative neoplasm development in mice. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 2564–2574 (2015).
24. Zimmermann, M. *et al.* *In vitro* Stability of Heat Shock Protein 27 in Serum and Plasma Under Different Pre-analytical Conditions: Implications for Large-Scale Clinical Studies. *Ann. Lab. Med.* **36**, 353 (2016).
 25. Varricchio, L., Migliaccio, A. R. & Mancini, A. Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis. *Expert Rev Hematol* **2**, 315–334 (2010).
 26. Kubovcakova, L. *et al.* Differential effects of hydroxyurea and INC424 on mutant allele burden and myeloproliferative phenotype in a JAK2-V617F polycythemia vera mouse model. *Blood* **121**, 1188–1199 (2013).
 27. LaFave, L. M. & Levine, R. L. JAK2 the future: therapeutic strategies for JAK-dependent malignancies. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 574–82 (2012).
 28. Marubayashi, S. *et al.* HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **120**, 3578–3593 (2010).
 29. Ambati, S. R. *et al.* Pre-clinical efficacy of PU-H71, a novel HSP90 inhibitor, alone and in combination with bortezomib in Ewing sarcoma. *Mol. Oncol.* **8**, 323–336 (2014).
 30. Fu, L. & Liang, J. J. Detection of Protein-Protein Interactions among Lens Crystallins in a Mammalian Two-hybrid System Assay. *J. Biol. Chem.* **277**, 4255–4260 (2002).
 31. Cordonnier, T. *et al.* Hsp27 regulates EGF/beta-catenin mediated epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. *Int. J. Cancer* **136**, E496–E507 (2015).
 32. Kanagasabai, R. *et al.* Hsp27 protects adenocarcinoma cells from UV-induced apoptosis by Akt and p21-dependent pathways of survival. *Mol. Cancer Res.* **8**, 1399–412 (2010).
 33. Wu, R. *et al.* Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 21598–21608 (2007).
 34. Konishi, H. *et al.* Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett.* **410**, 493–498 (1997).
 35. Jiang, Y. *et al.* Expression of Heat Shock Protein 27 in Benign Prostatic Hyperplasia with Chronic Inflammation. *Med. Sci. Monit.* **21**, 2976–2985 (2015).
 36. Jin, C. *et al.* Human Myocardium Releases Heat Shock Protein 27 (HSP27) after Global Ischemia : The Proinflammatory Effect of Extracellular HSP27 through Toll-like Receptor (TLR) -2 and TLR4. *Mol. Med.* **20**, 280–289 (2014).

37. Hasselbalch, H. C. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia , polycythemia vera and myelofibrosis . A human inflammation model for cancer development ? *Leuk. Res.* **37**, 214–220 (2013).
38. Sevin, M., Girodon, F., Garrido, C. & Thonel, A. De. HSP90 and HSP70 : Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators Inflamm.* (2015).
39. Fiskus, W. *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.* **17**, 7347–58 (2011).
40. Choi, S. *et al.* HSPB1 Inhibits the Endothelial-to-Mesenchymal Transition to Suppress Pulmonary Fibrosis and Lung Tumorigenesis. *Cancer Res.* **76**, 1019–1030 (2016).
41. Desterke, C. *et al.* FLT3-Mediated p38 – MAPK Activation Participates in the Control of Megakaryopoiesis in Primary Myelofibrosis. *Cancer Res.* **71**, 2901–2915 (2011).
42. Britschgi, A. *et al.* JAK2/STAT5 Inhibition Circumvents Resistance to PI3K/mTOR Blockade: A Rationale for Cotargeting These Pathways in Metastatic Breast Cancer. *Cancer Cell* **22**, 796–811 (2012).
43. Pfeifer, A. C., Timmer, J. & Klingmüller, U. Systems biology of JAK / STAT signalling. *Essays Biochem.* **45**, 109–120 (2008).
44. Vainchenker, W. & Constantinescu, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* **32**, 2601–2613 (2013).
45. Bhagwat, N., Levine, R. L. & Koppikar, P. Sensitivity and resistance of JAK2 inhibitors to myeloproliferative neoplasms. *Int. J. Hematol.* **97**, 695–702 (2013).
46. Weigert, O. *et al.* Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition. *J. Exp. Med.* **209**, 259–73 (2012).

Figure legends

Figure 1. HSP27 downregulation impairs myelofibrosis progression in a TPO^{high} murine model.

(a) *In vivo* strategy of HSP27 inhibition using OGX-427, or a scrambled oligonucleotide control (CTL) injected intraperitoneally 3 times a week at a dose of 10 mg/kg in a TPO^{high} murine model of myelofibrosis (MF). **(b)** Expression level of HSP27 proteins in the serum of TPO^{high} mice (n=9) compared with healthy mice (WT, n=10) measured by ELISA assay. P-value was calculated using the Mann-Whitney test. *P < .05. Error bars represent the standard errors of the mean **(c)** Western blot analysis of HSP27 in splenocytes (whole cell lysate) of MF mice treated with OGX-427 or CTL. Actin served as the loading control. Bar graphs show quantification of mean relative amount of the proteins (n=2 per group) **(d)** Spleen weight were evaluated in mice (n=9 per group). Outcomes of the two treatments were compared using the Mann-Whitney test. *P < .05. Error bars represent the standard errors of the mean. **(e)** Representative picture of spleen size of MF mice treated with CTL or OGX-427. **(f)** Left panel, haematoxylin- and eosin-stained spleen sections revealed hyperplasia of the red pulp (R) in MF mice and partial restoration of the white pulp (W) territories in OGX-427-treated mice. Right panel, assessment of the grade of extramedullary haematopoiesis (EMH), from spleen sections in 18 sacrificed mice. Pie chart: Grade A (light red): diffuse EMH invasion. Grade B (dark red color): diffuse EMH invasion with atrophy of white pulp. Images were obtained using a Nanozoomer scanner (Hamamatsu, France) at X23 magnification and Calopics software. **(g)** Left panel, histology of bone marrow sections after haematoxylin-eosin staining. Right panel, Pie chart representing percentages of mice according to erythrocyte (right upper panel) and megakaryocyte counts (right lower panel) from bone marrow sections of 18 sacrificed mice: very low cell number (dark blue), decreased cell number (azure blue), normal cell number (light blue) and increased cell number (purple). Arrows show erythrocyte foci and megakaryocytes. Images were obtained using a Nanozoomer scanner (Hamamatsu, France) at X13 magnification and Calopics software.

Figure 2. HSP27 affects proliferation of JAK2V617F leukemic cell lines. (a) HEL92.1.7, SET2 and K562 cells were transfected with HSP27 siRNA, OGX-427 or an oligonucleotide control (CTL). Bars represent cell proliferation percentages relative to non-transfected cells (NT) from 9 independent experiments. P-values were calculated using the Mann-Whitney test. **P < .01. Error bars represent the standard errors of the mean **(b)** HEL92.1.7, SET2 and K562 cells were transfected with HSP27 siRNA, OGX-427 or CTL and lysed 48h later in Laemmli Buffer. Protein expression was determined by western-blot and compared to non-transfected cells (NT). Actin was used as the loading control (n=3 independent experiments). See quantification of the blot in supplementary Fig. 3d.

Figure 3. HSP27 interacts with JAK2/STAT5. (a) The binding of recombinant JAK2 and STAT5a/b at 125nM to immobilized biotinylated HSP27 was determined by biolayer interferometry alphaB crystallin serves as a positive control (See raw data Supplementary Fig.4 a-c) (n=3 independent

experiments). **(b)** Immunoprecipitation from HEL92.1.7 cell extracts of endogenous HSP27 was followed by immunodetection of endogenous STAT5 and JAK2. Inputs: proteins in total cell lysates. IP IgG: immunoprecipitation with a non-relevant antibody (IgG mouse) (n=2 independent experiments). **(c)** Immunofluorescence analysis of the endogenous interaction (red foci) of JAK2 (upper panel) or STAT5 (middle panel) with HSP27 visualized in situ by PLA in HEL92.1.7 cells transfected or not with a HSP27 siRNA. Nuclei are stained with DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole). Images were obtained using an Axio Imager 2 (Zeiss, France) at X40 magnification and analysed using ICY software. Images were taken randomly and analyzed using ICY software. Cells were segmented manually, and the number of interaction foci in each cell were counted using the spot detector plugin. Statistical analysis (Mann and Whitney test) was carried out using GraphPad. Right panel, graphs represent quantification of the interaction of endogenous JAK2 or STAT5 with HSP27 visualized in situ by PLA. Each data point corresponds to an analyzed cell, placed according to the number of detected interaction foci (lower panel). Immunofluorescence analysis of the endogenous interaction (red foci) of JAK2 with STAT5 visualized in situ by PLA in HEL92.1.7 cells transfected with a scramble (CTL) or a HSP27 siRNA (siHSP27). Nuclei are stained with DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole). Images were obtained using an Axio Imager 2 (Zeiss, France) at X63 magnification and analysed using ICY software as in upper panel. Right panel, graphs represent quantification of the interaction of endogenous JAK2 with STAT5 visualized by in situ by PLA.

Figure 4. HSP27 is overexpressed in patients with MPN associated-MF. (a) Flow cytometry analysis of HSP27, HSP70 and HSP90 in circulating hematopoietic progenitor CD34⁺ cells from patients with Myelofibrosis (MF) and healthy control donors (HD) (number of samples analysed; MF: n =11-18; HD: n=10-12). P-values were calculated by using the unpaired *t* test with Welch's correction. **P < .01. ; n.s = not significant. Expression levels of HSP27, HSP70 and HSP90 from MF patients were plotted as median fluorescence intensities. **(b)** Analysis of HSP27, HSP70 and HSP90 levels in the serum of patients with Myelofibrosis (MF, n=24-27) compared with healthy control donors (HD, n=15) measured by ELISA. P-values were calculated using the Mann-Whitney test. ****P < .0001; n.s = not significant. **(c)** Representative histological sections of bone marrow from MF patients. Images were obtained using Cell Observer (Zeiss, France) at two different magnifications (X20 and X63) and Axiovision software. Arrows show megakaryocytes.

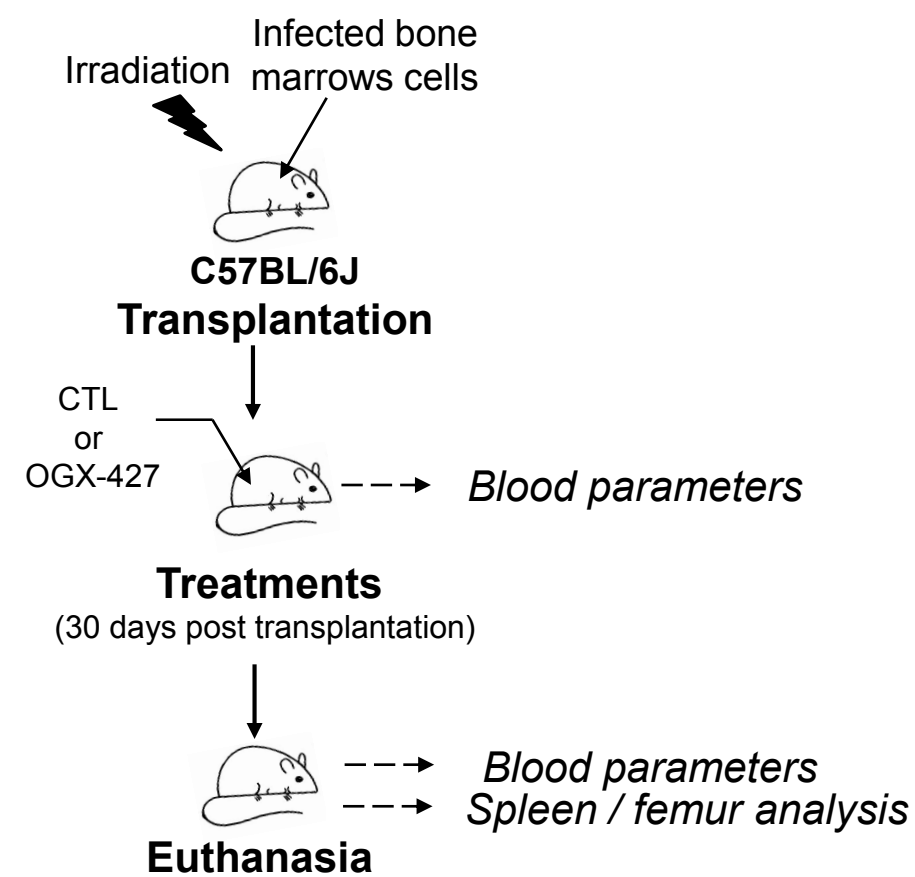
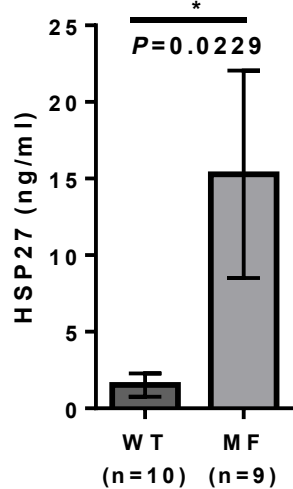
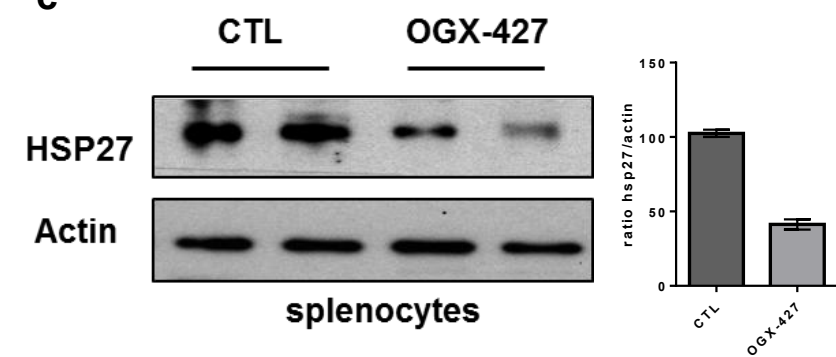
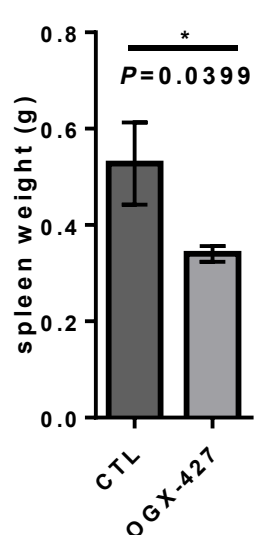
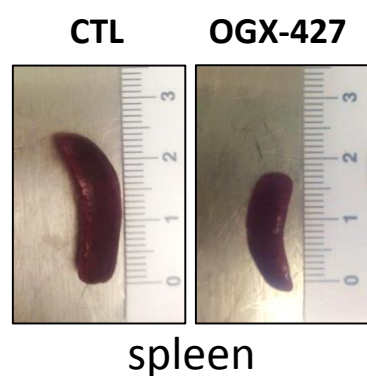
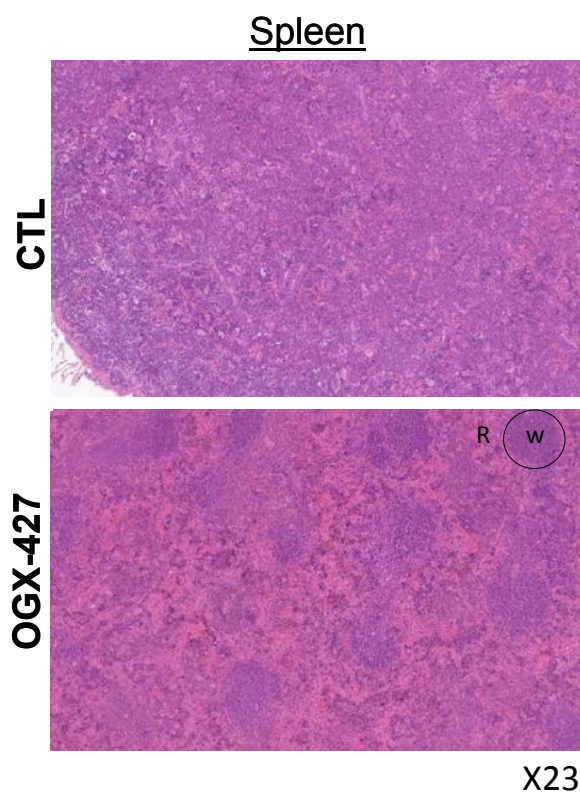
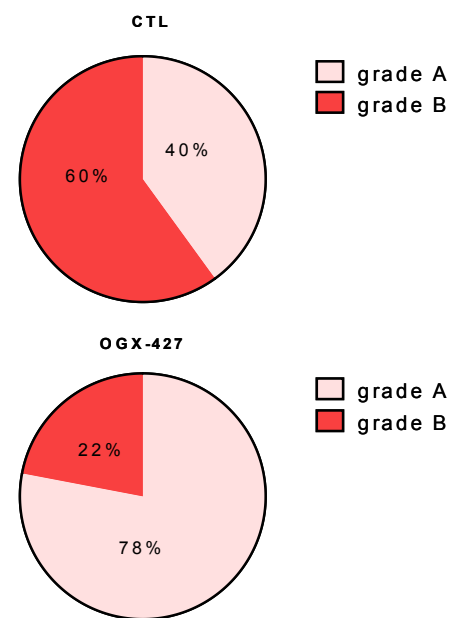
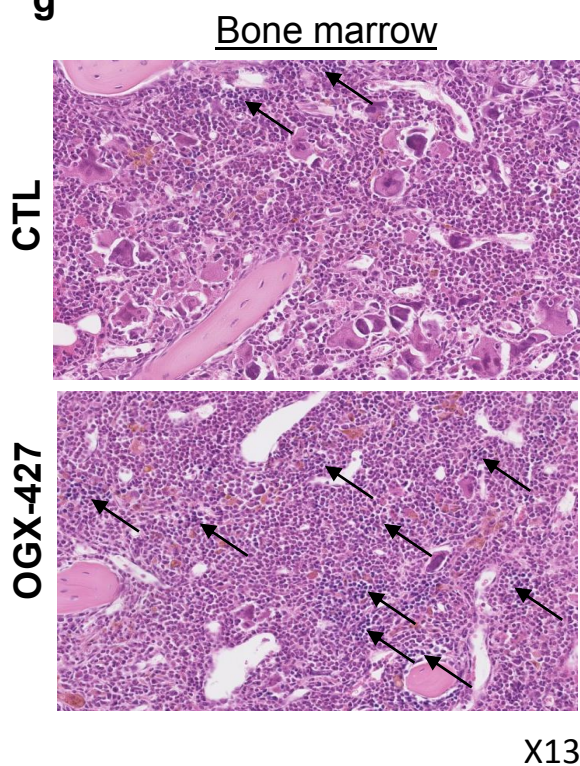
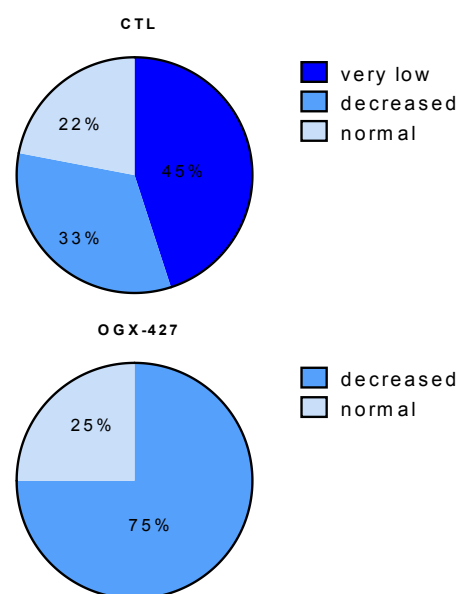
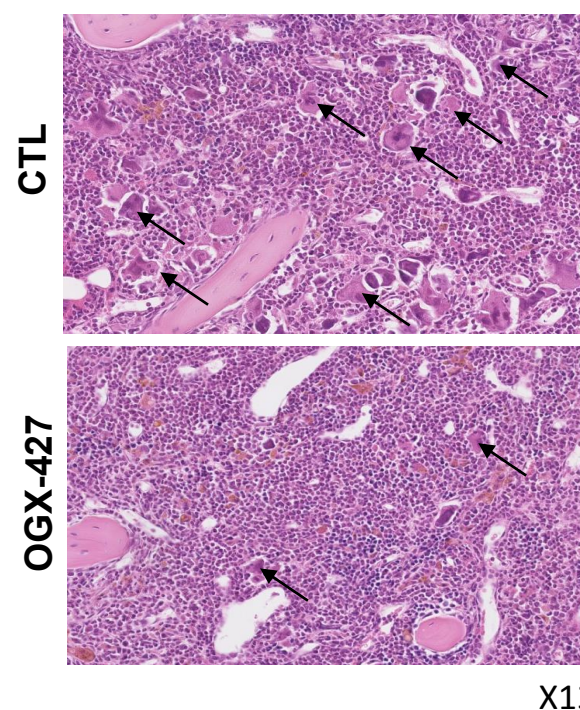
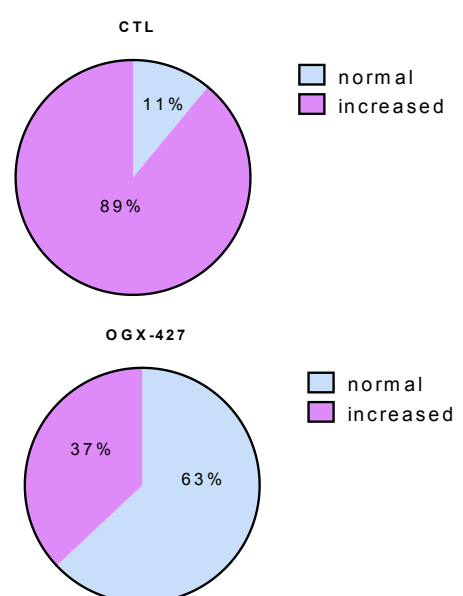
FIGURE 1**a****b****c****d****e****f****EXTRAMEDULLAR HEMATOPOIESIS****g****ERYTHROCYTES****Bone marrow****MEGAKARYOCYTES**

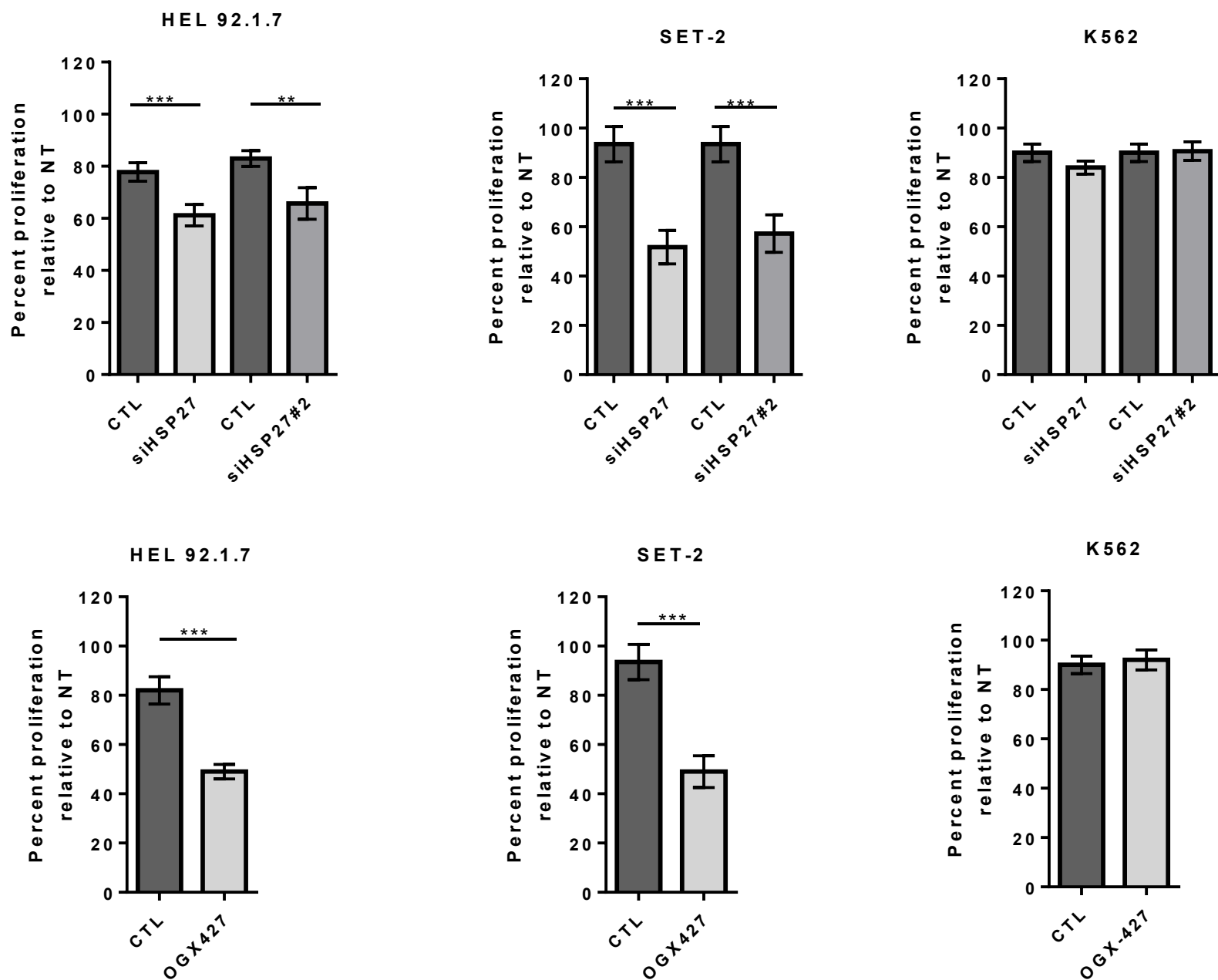
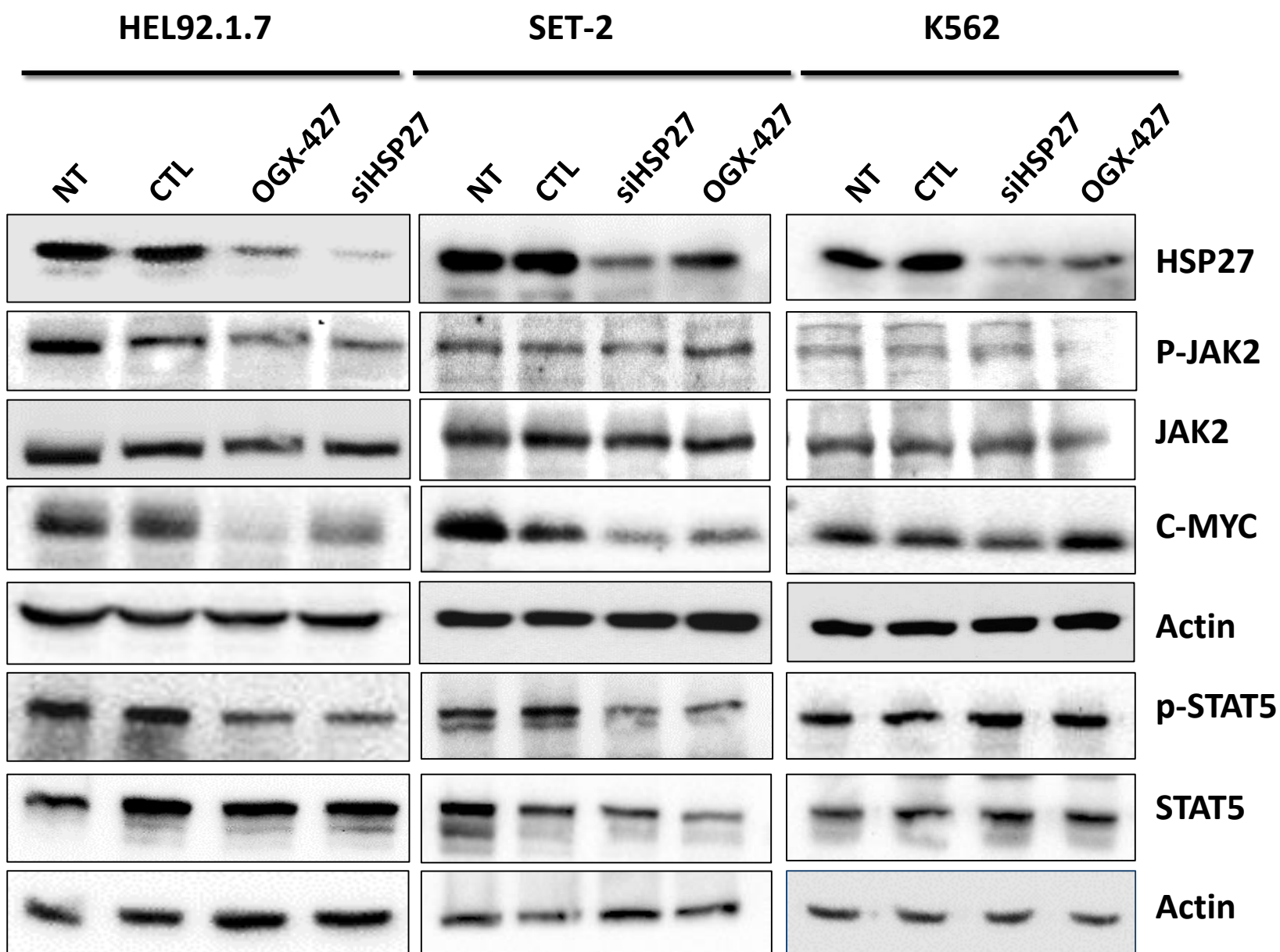
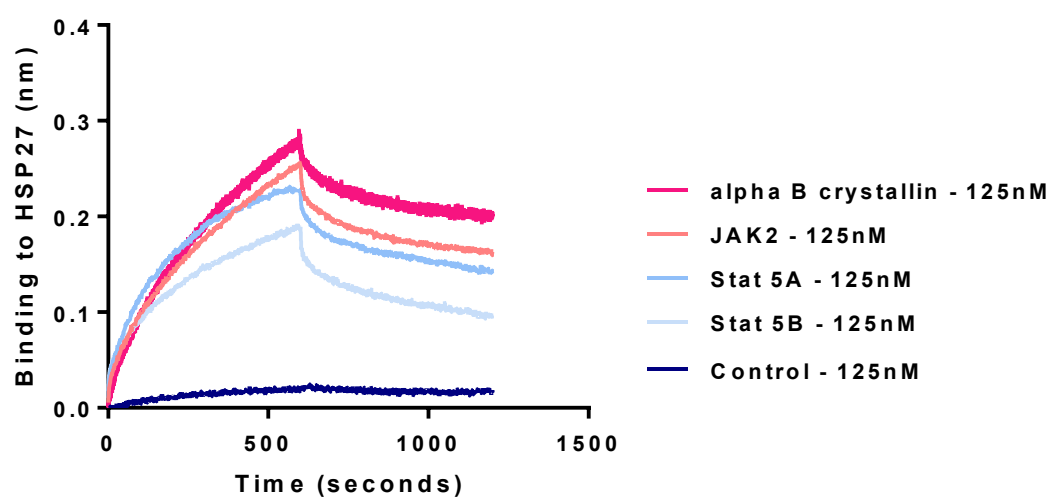
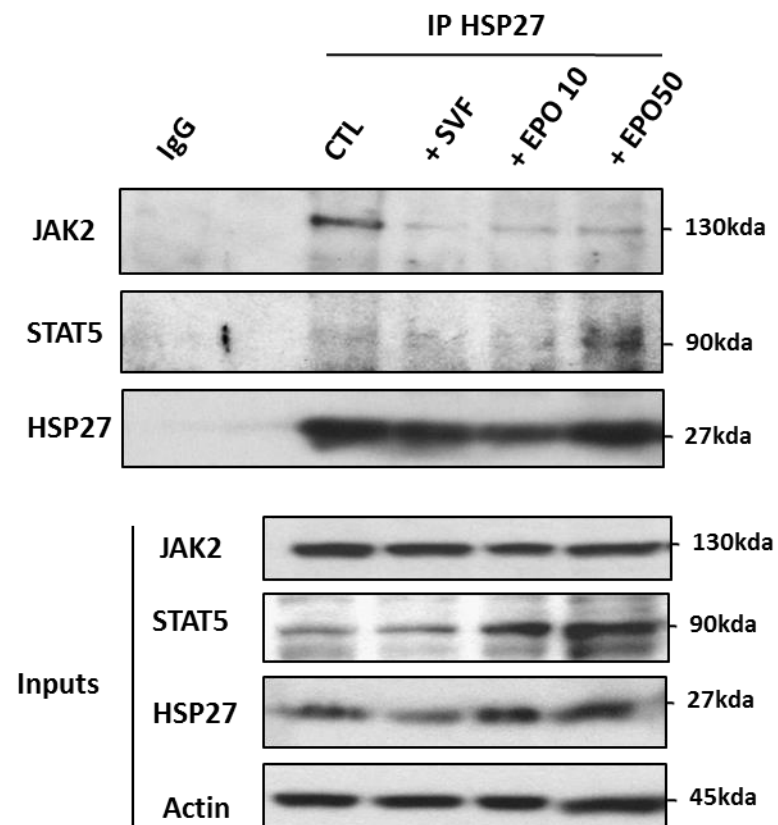
FIGURE 2**a****b**

FIGURE 3

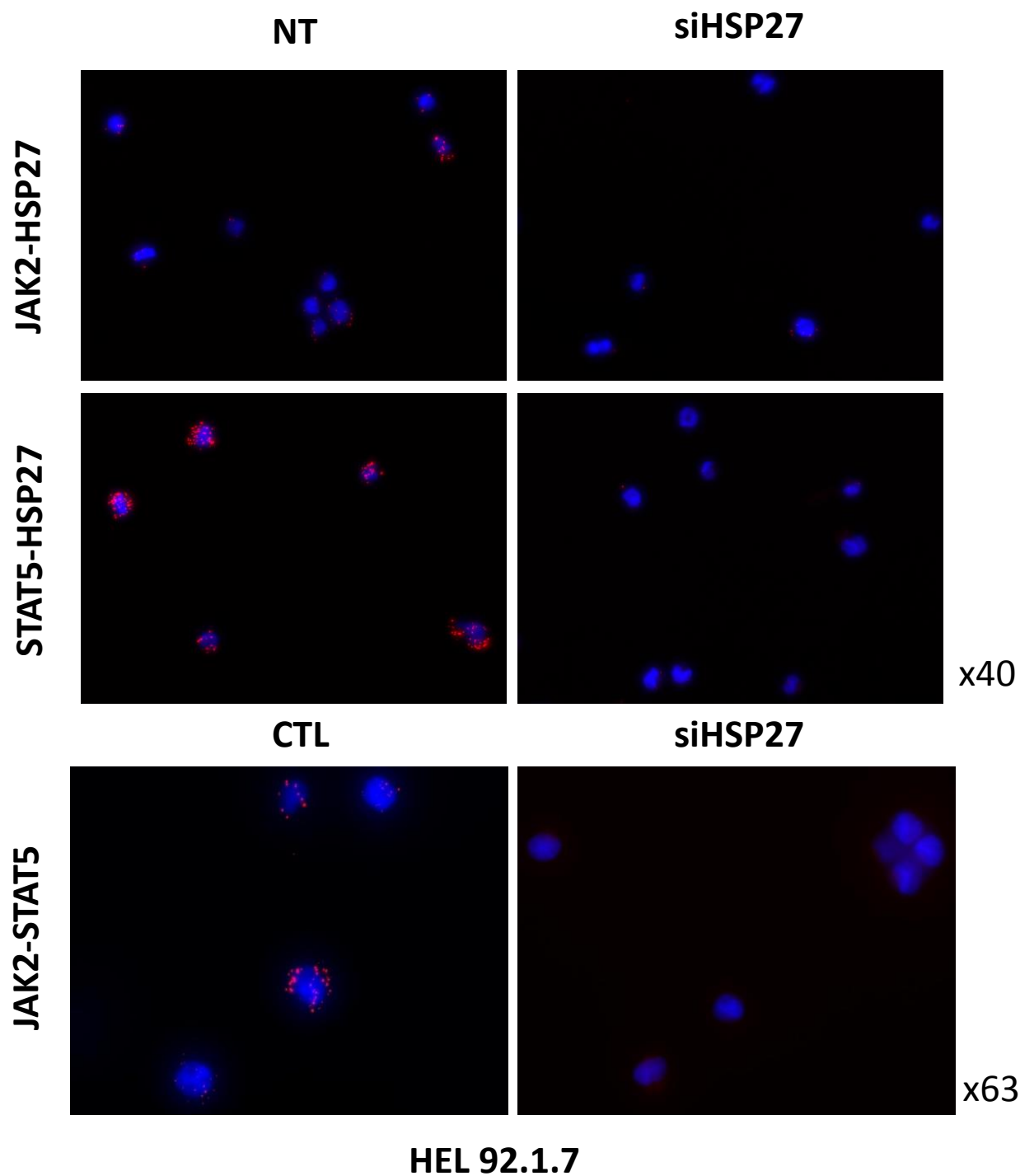
a



b



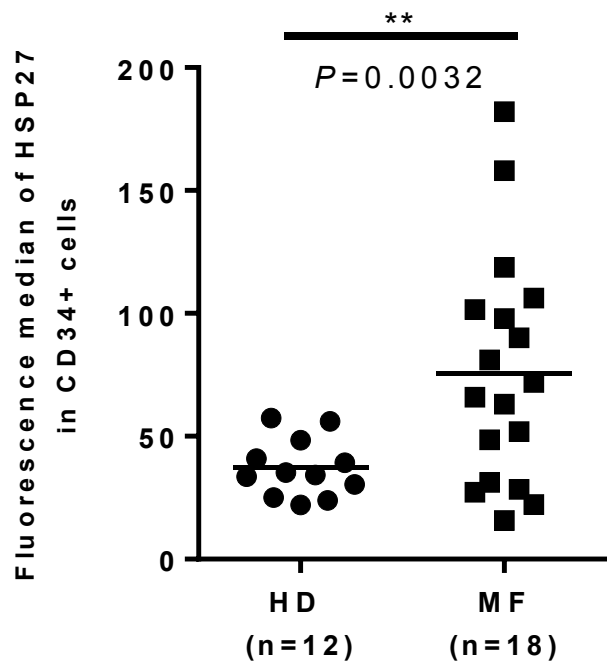
c



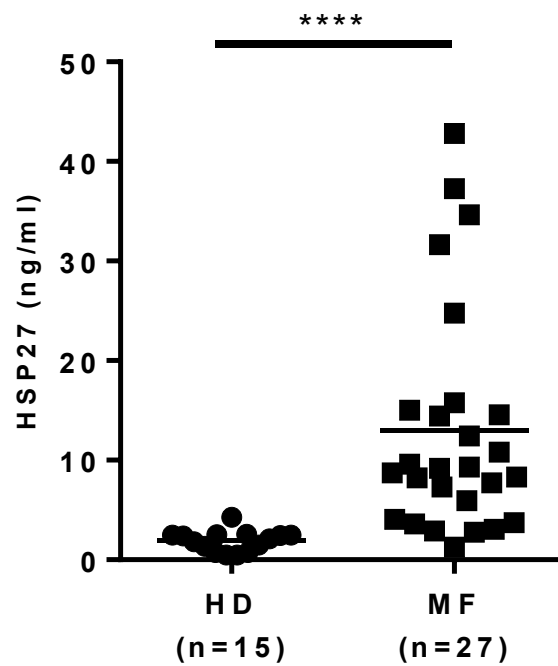
HEL 92.1.7

FIGURE 4

a

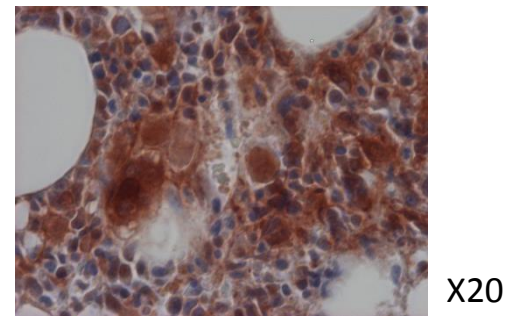


b

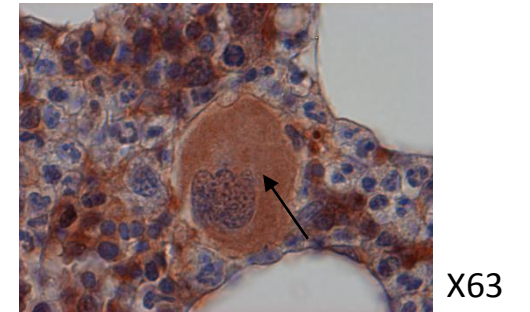


c

HSP27



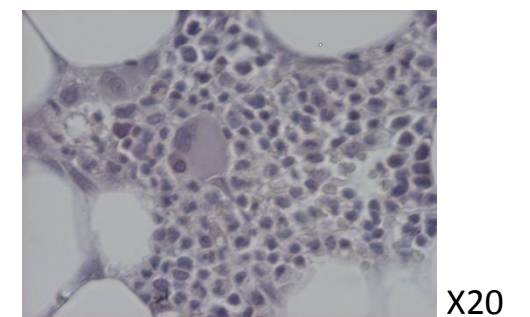
X20



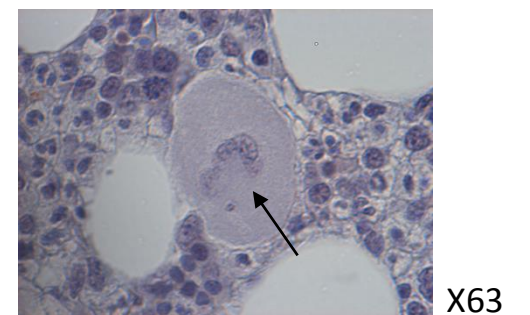
X63

Bone marrow

HSP70

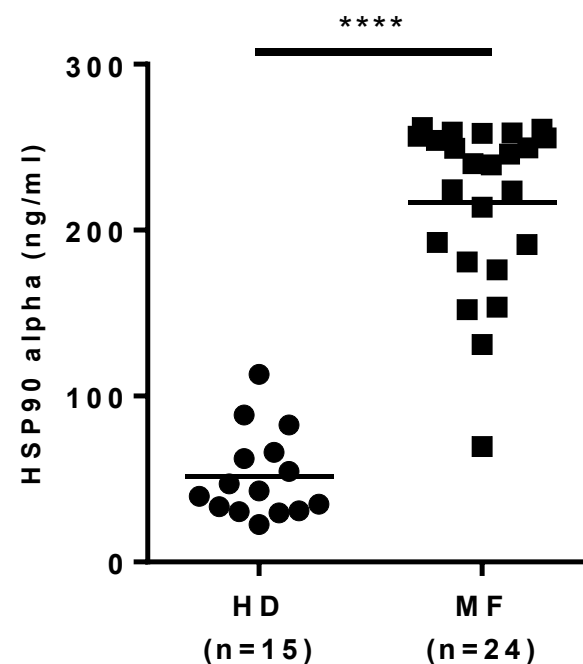
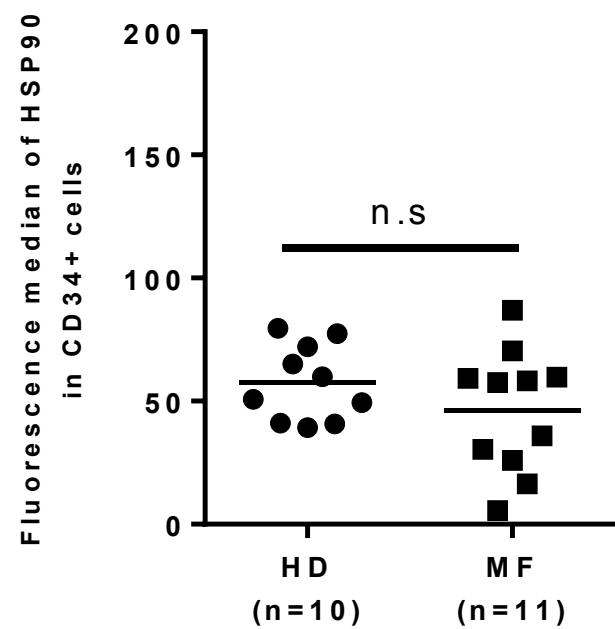
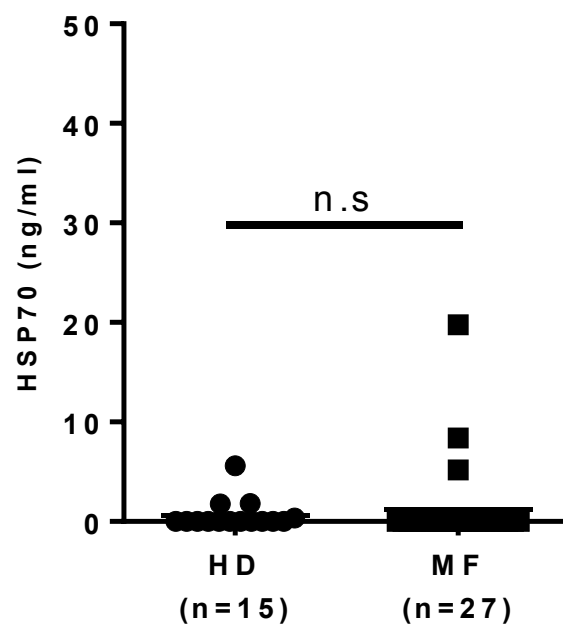
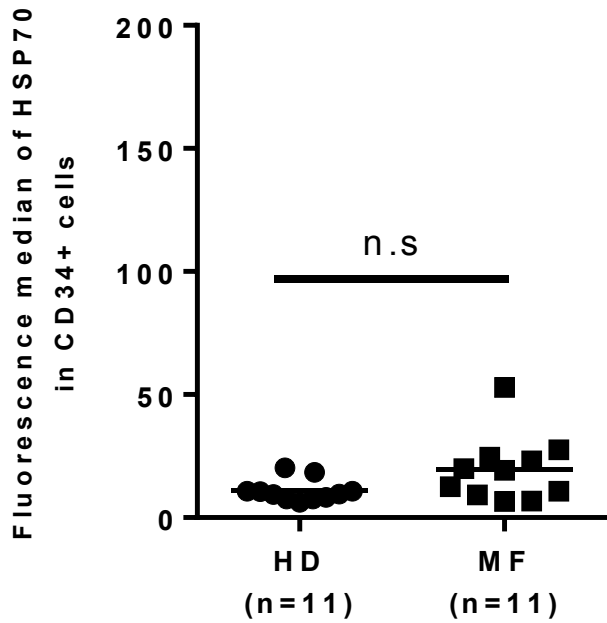


X20

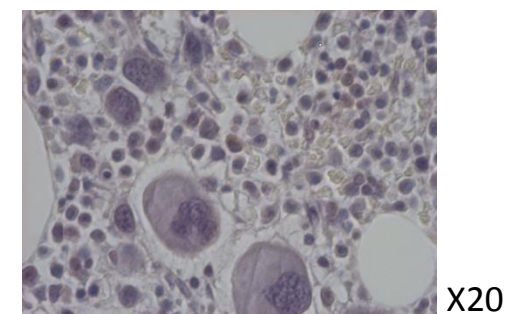


X63

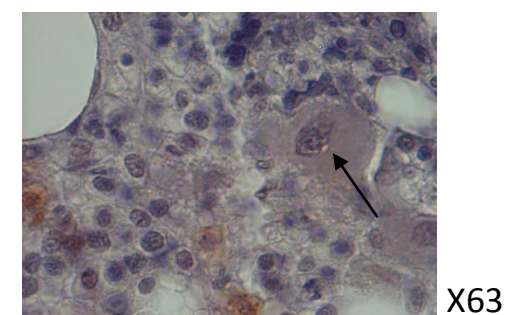
Bone marrow



HSP90



X20



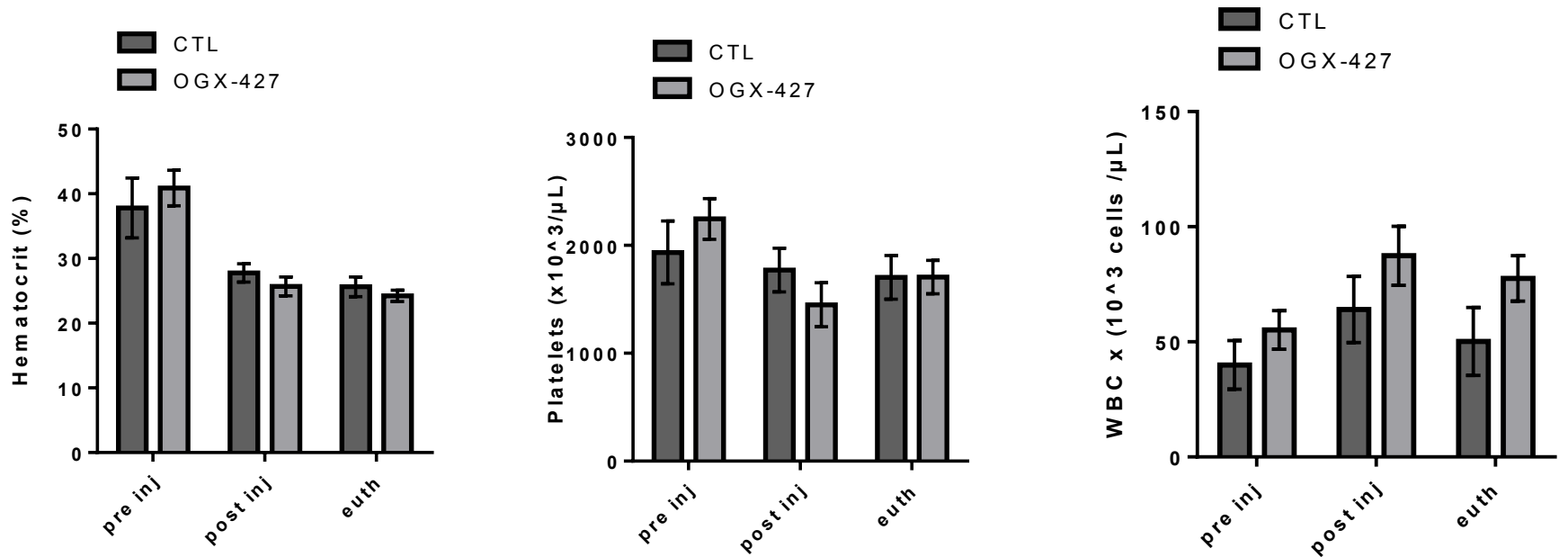
X63

Bone marrow

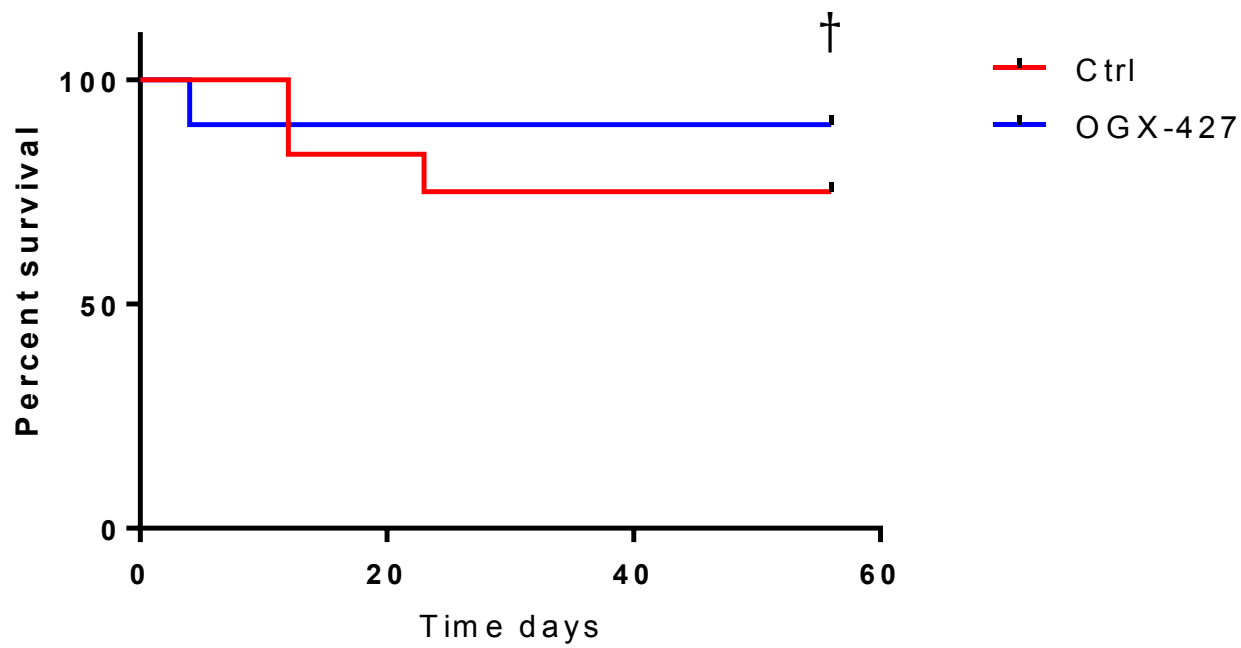
SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1

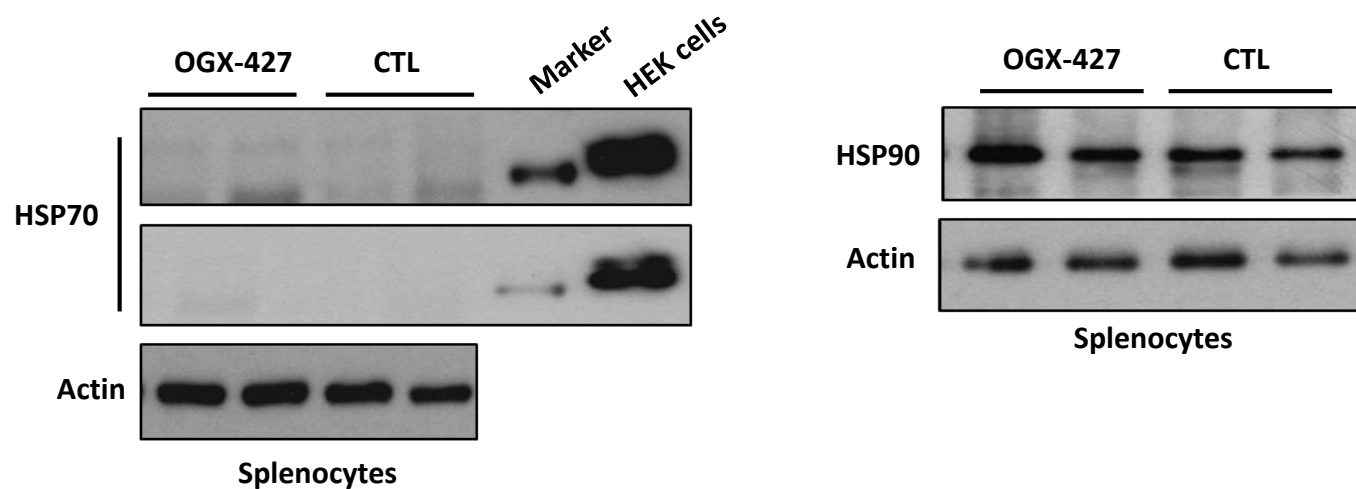
a



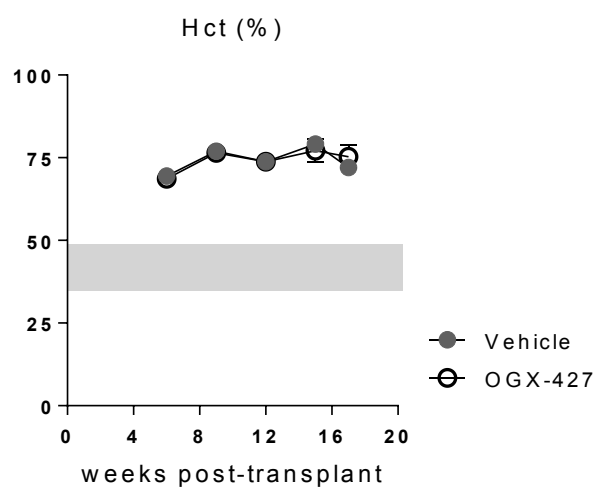
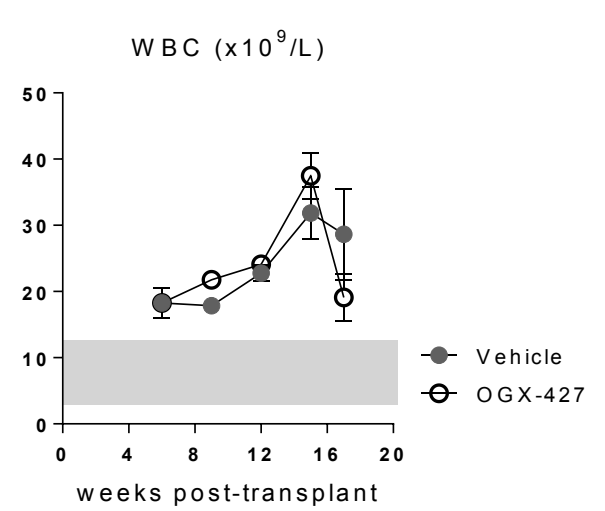
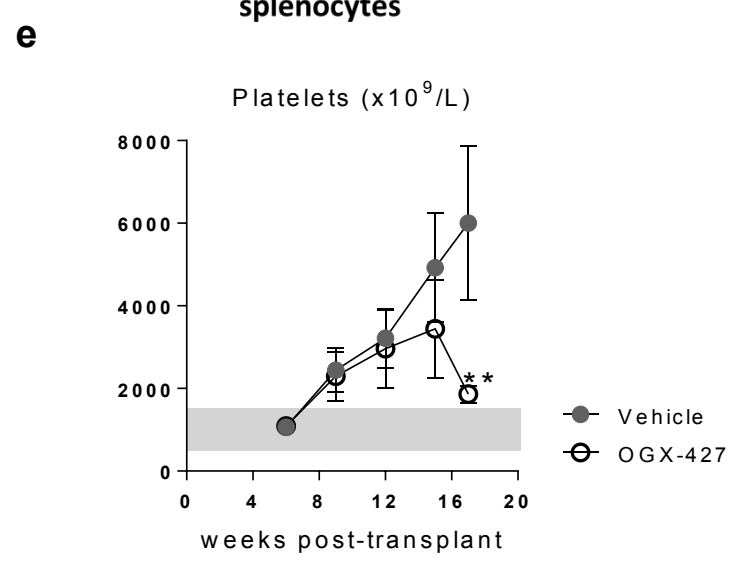
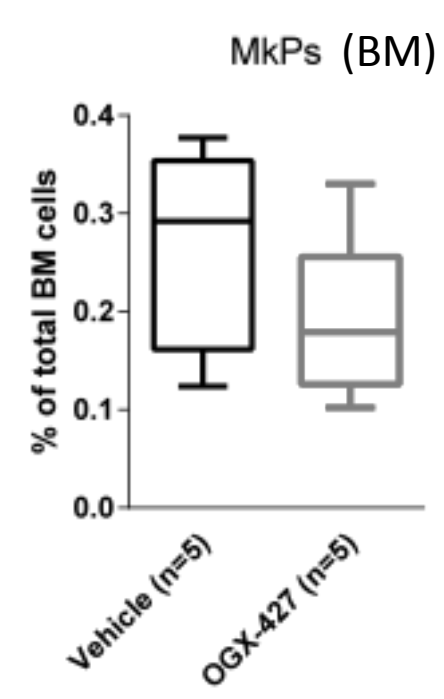
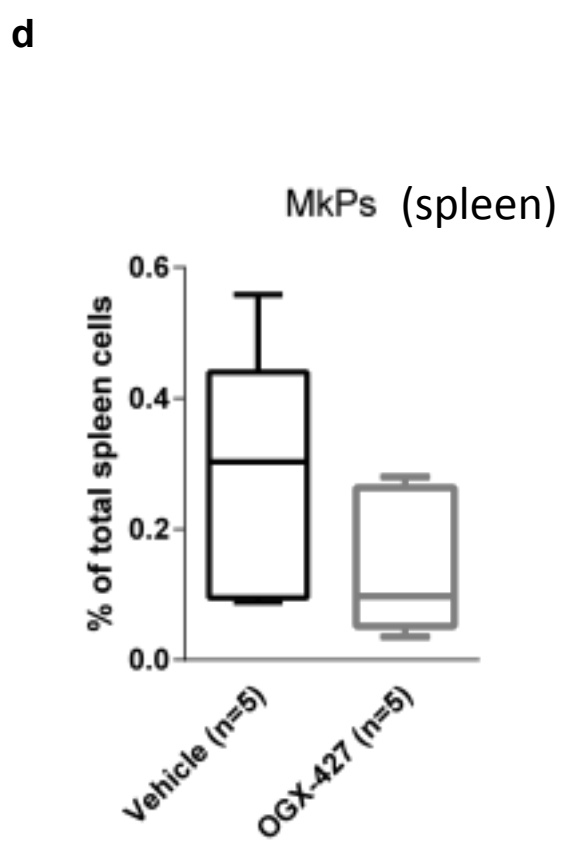
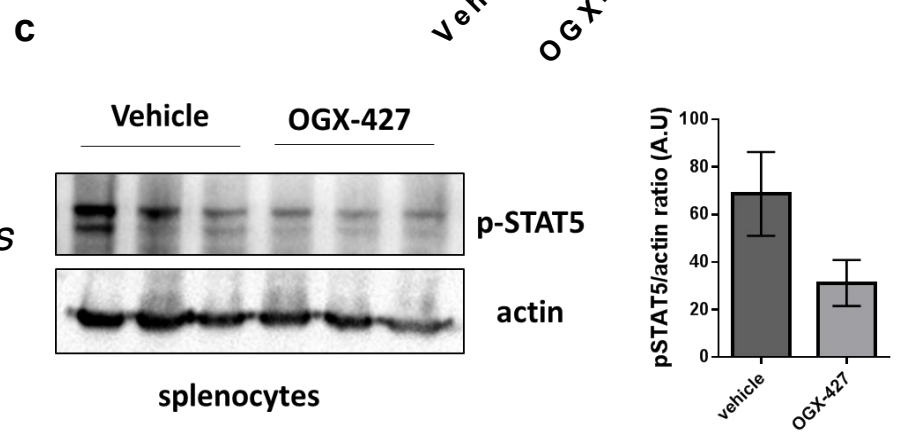
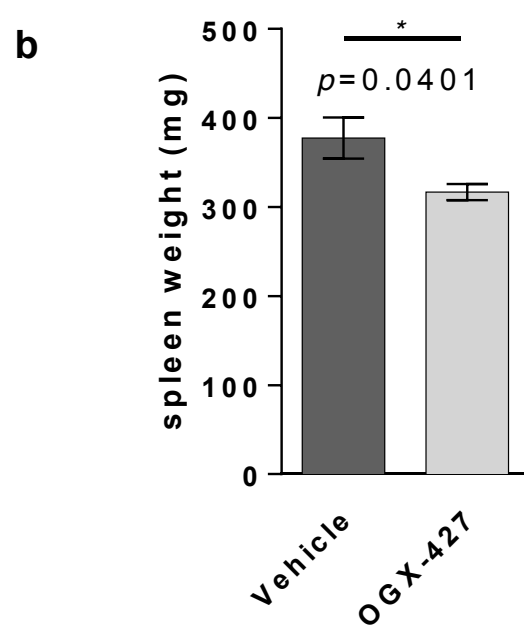
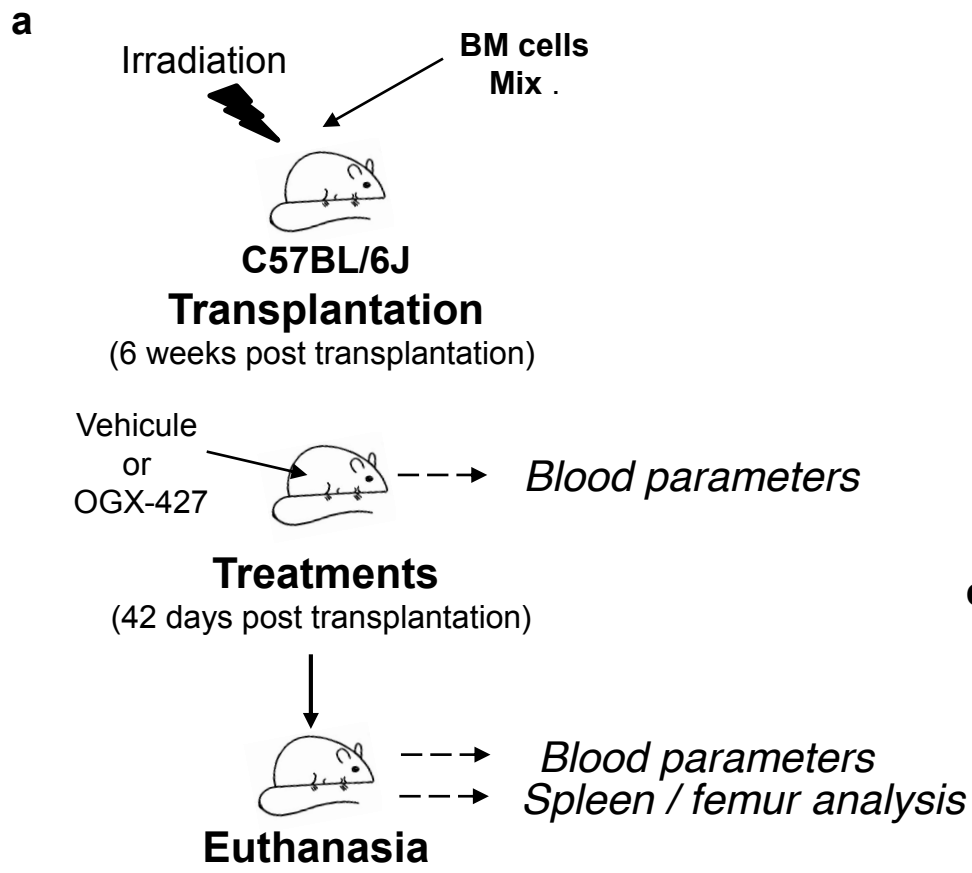
b



c

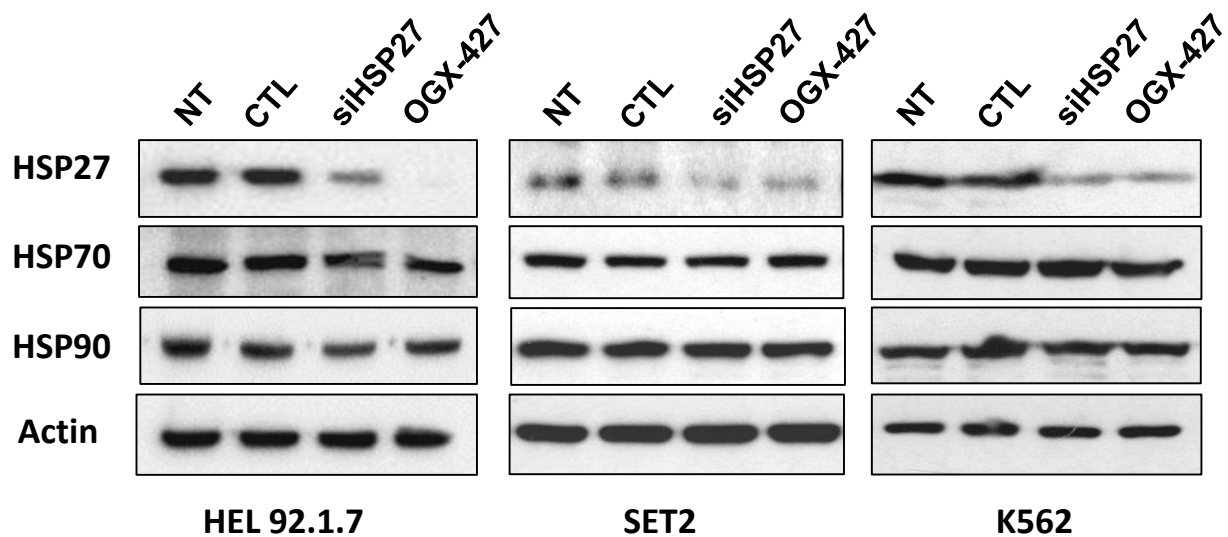


Supplementary Figure 2

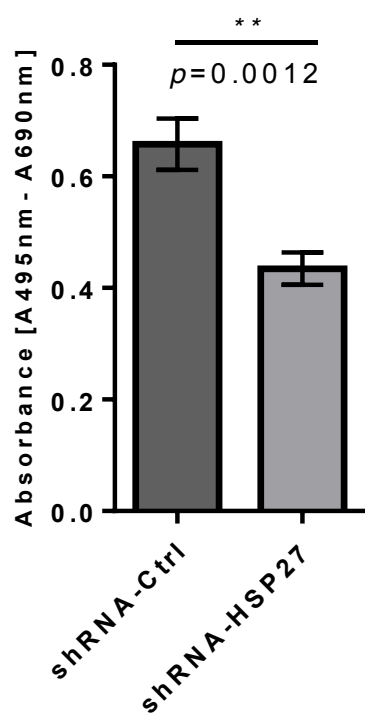


Supplementary Figure 3

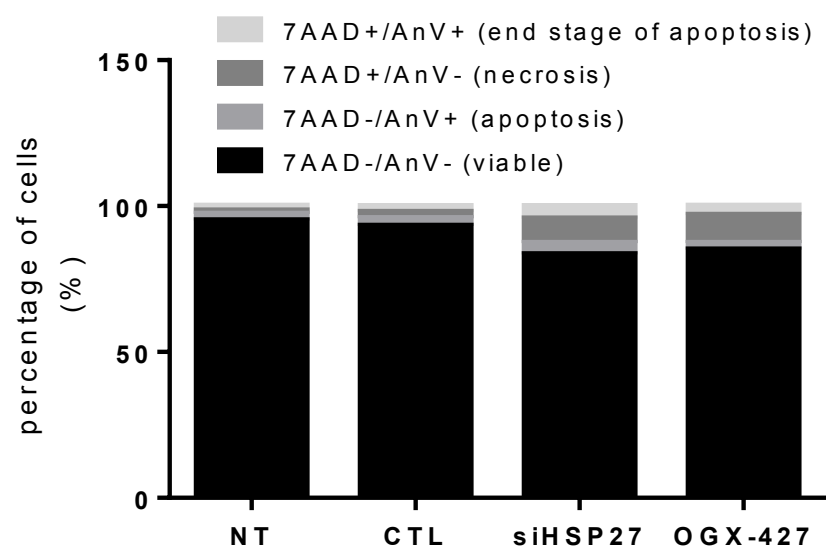
a



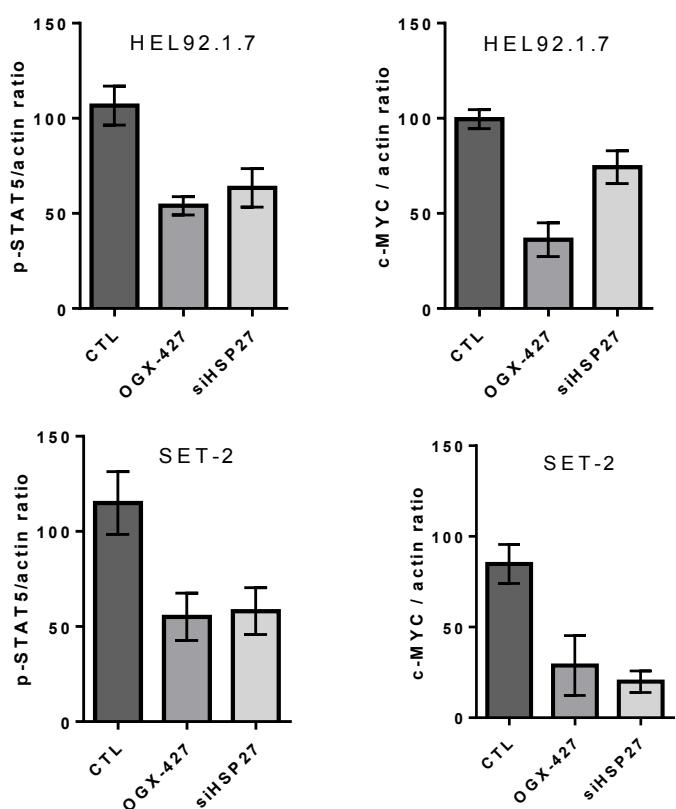
b



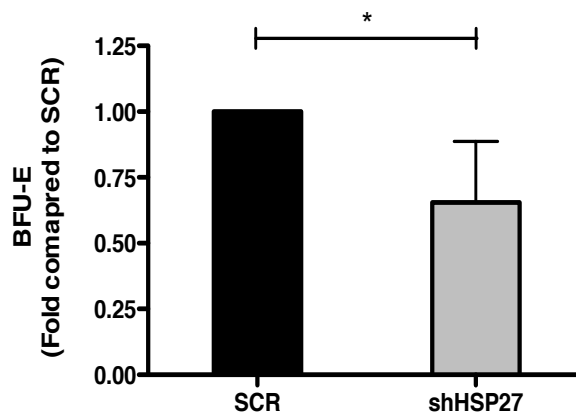
c



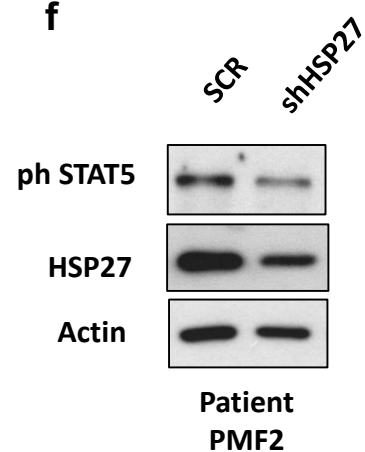
d



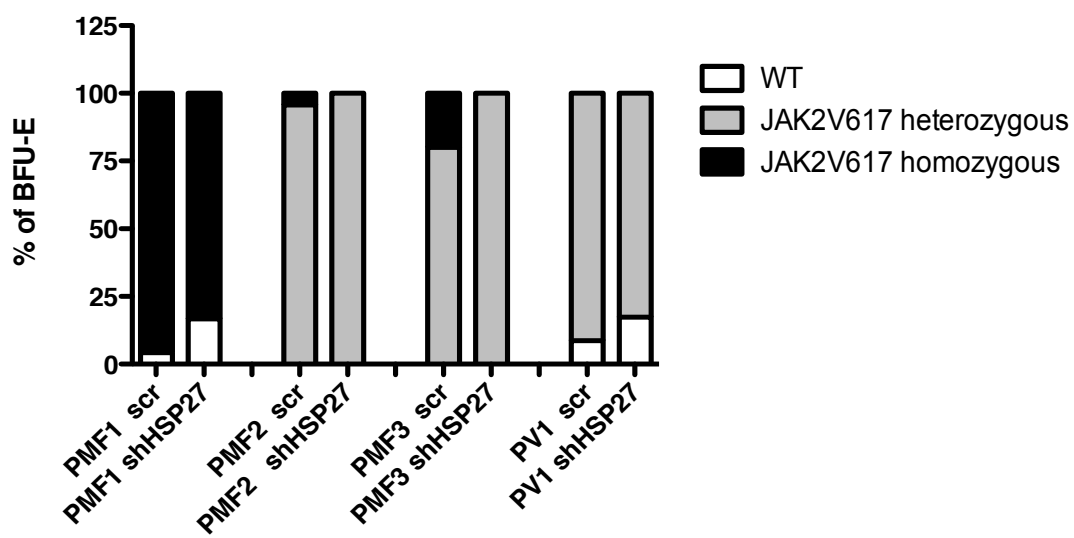
e



f

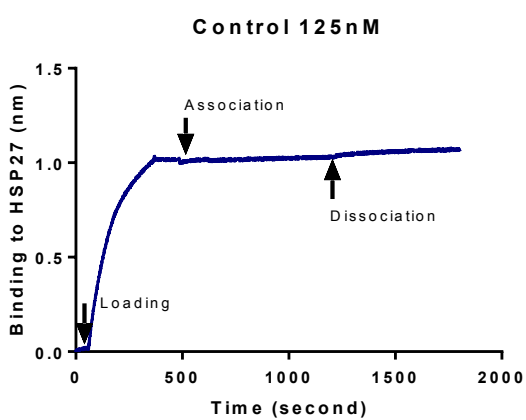


g

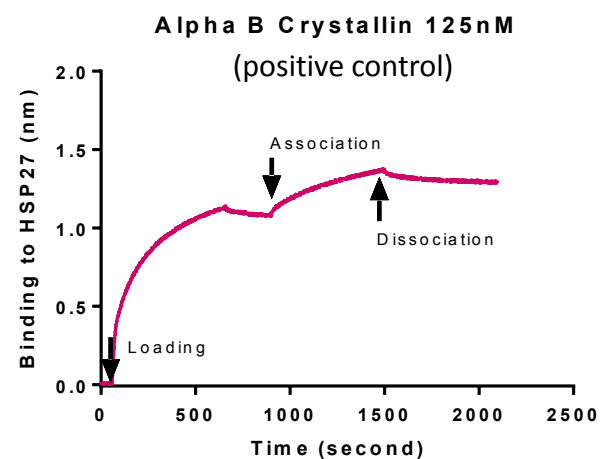
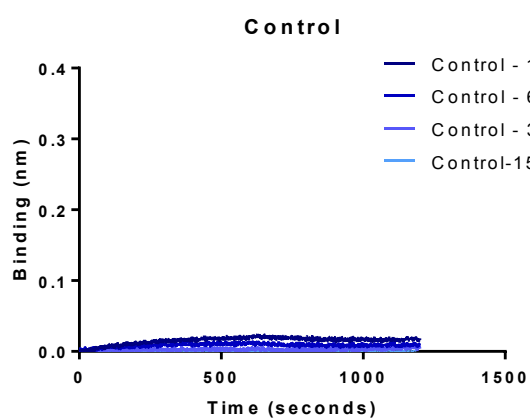


Supplementary Figure 4

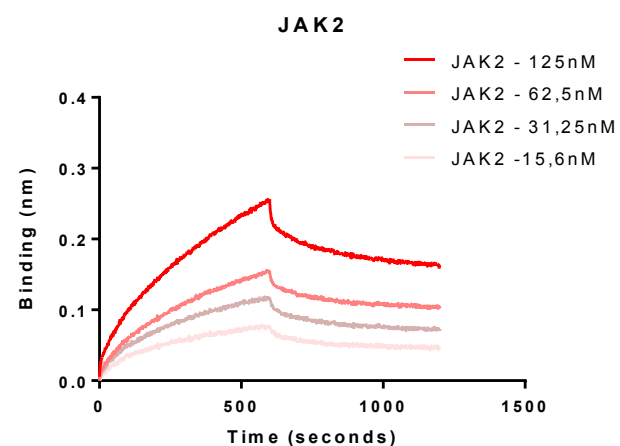
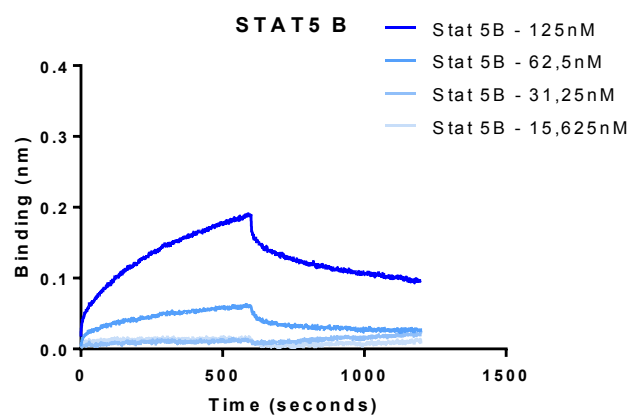
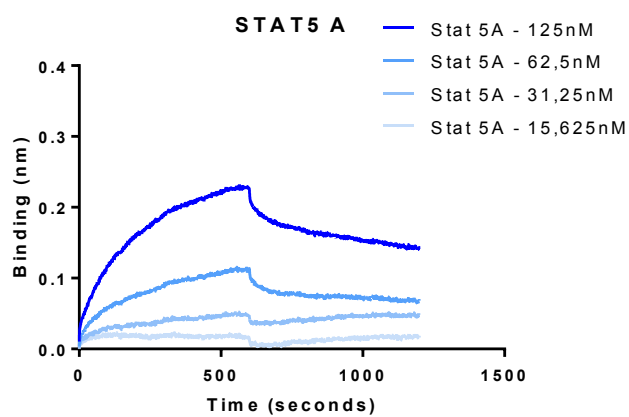
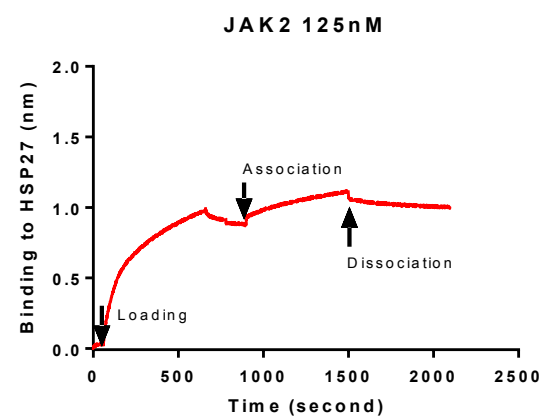
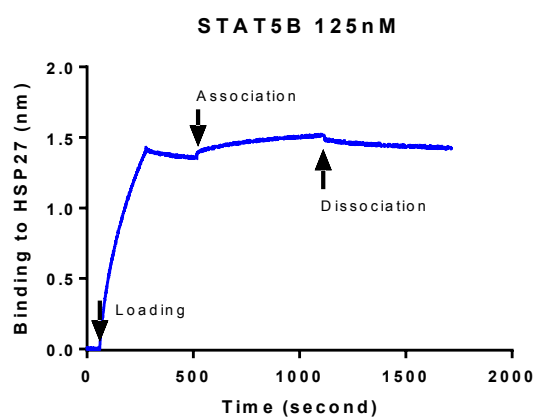
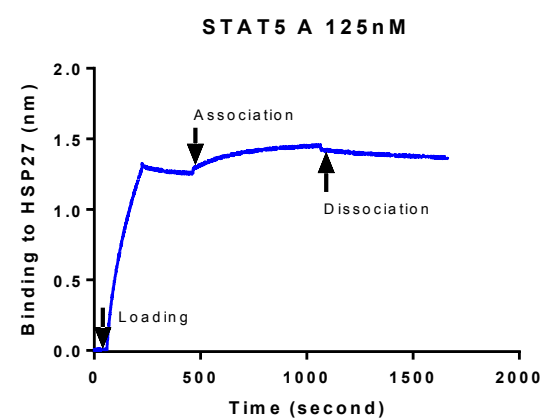
a



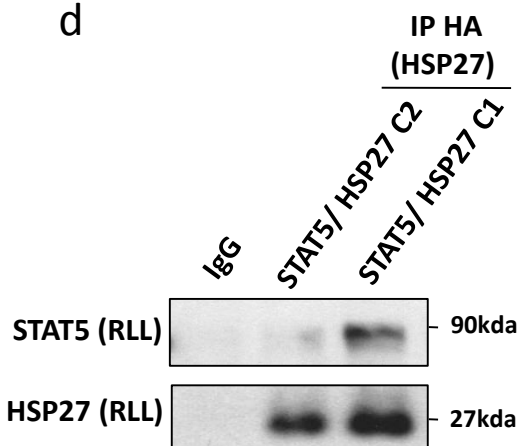
b



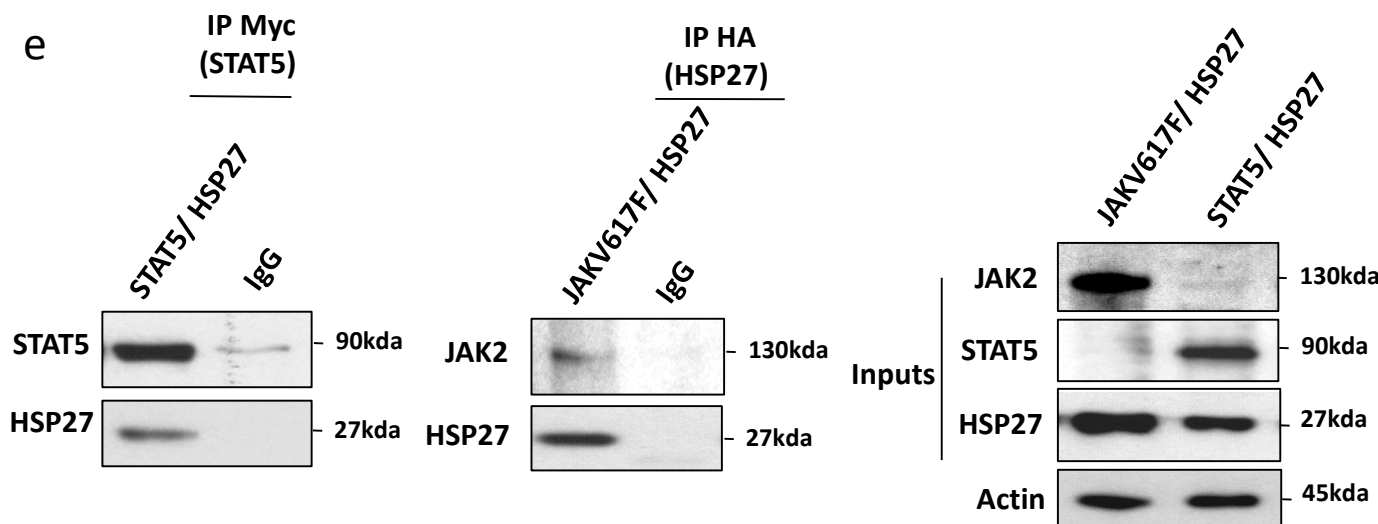
c



d



e



SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1: (a) Blood cell parameters assessed in mice before and after OGX-427 (n=9) or CTL treatment (n=9) and on the day of euthanasia. WBC indicates white blood cells, error bars represent the standard errors of the mean. The kinetics of peripheral blood parameters were similar to those described in non-treated TPO^{high} mice⁸, and OGX treatment had no significant effect. **(b)** A Kaplan-Meier survival curve was done for the control (CTL, n=9) and treated group (OGX-427, n=9). Outcomes of the two treatments were compared using a log-Rank statistic analysis (p=0,32). **(c)** Western blot analysis of HSP70 and HSP90 in splenocytes (whole cell lysates) 24 days after treatment of MF mice with OGX-427 or CTL (n=2 per group). Actin served as the loading control. HEK cells served as positive control.

Supplementary Figure 2: (a) *In vivo* strategy of HSP27 inhibition using OGX-427 in transgenic mice *JAK2V617F* model of MPN (*ScfCre;FF1;GFP*) (Kubovcakova et al., Blood 2013). Mice were treated, 6 weeks after transplantation, with OGX-427 or vehicle three times a week (10mg/kg injected intraperitoneally) (n=5 per group) for 10 weeks. **(b)** Spleen weight was evaluated in mice (n=5 per group). Outcomes of the two treatments were compared using student test. *P < .05. Error bars represent the standard errors of the mean. **(c)** Western blot analysis of p-STAT5 in splenocytes (whole cell lysate) of MPN mice treated with OGX-427 or CTL. Actin served as the loading control. **(d)** Percentage of megakaryocytes progenitors present in the spleen or bone marrow **(e)** Blood cell parameters (Platelets, WBC: white blood cells, Hct: Hematocrit) assessed in mice treated with OGX-427 or vehicle (n=5), every three weeks, from week 6 post transplantation until the day of euthanasia.

Supplementary Figure 3: (a) HEL92.1.7, SET2 and K562 cells were transfected with HSP27 siRNA#1, OGX-427 or an oligonucleotide control (CTL) using the Amaxa Nucleofector silencing siRNA system (NT = no transfected cells). 48h later, the expression of HSP27, HSP70 and HSP90 were determined by western-blot (n=2). Actin was used as the loading control. **(b)** HEL92.1.7 cells were transduced with a lentiviral vector expressing either HSP27 shRNA or a scramble sequence (shCTL) and GFP as a selection marker and 48h later cell proliferation was assessed using a XTT assay kit. (left panel) Bars represent cell proliferation percentages relative to shRNA CTL transfected cells from 3 independent experiments. (Right panel) To assess the efficiency of shRNA HSP27, the expression level of HSP27 was determined by western-blot (12% SDS-PAGE). P-values were calculated using the Mann-Whitney test. **P < .01. Error bars represent the standard errors of the mean **(c)** Representative histogram showing percentages of cell death from HEL92.1.7 cells transfected with OGX-427 or siRNA#1 HSP27 compared with CTL (NT = no transfected cells). Annexin V and 7AAD staining was analyzed 48h after transfection. **(d)** Bar graphs show quantification of mean relative amount of the proteins analysed by western blot Fig. 2b (n=3 independent experiments), error bars represent the standard errors of the mean. **(e)** HSP27 knockdown decreases clonogenic potential of human erythroid progenitors (BFU-E) formation and specifically targets *JAK2V617F* clones in MPN patients CD34⁺ from MPN patients (4 PMF and 1 PV) were transduced with lentiviral vector encoding shRNA-HSP27 (shHSP27) or shRNA-CTRL (SCR) and GFP. The CD34⁺/GFP⁺ were sorted 24 hours later and cells were plated in semisolid conditions (methylcellulose) BFU-E of the 4 PMF patients were counted 14 days later. **(f)** Western blot analysis of HSP27 and p-STAT5 in primary cells from patient PMF2. Actin served as the loading control. **(g)** Figure represents the fold decrease in shHSP27 knockdown condition compared to SCR. Data are shown as means ± s.e.m.; n = 4; *P < 0.05, Student's *t* test. Approximately 18–24 colonies were plucked in each condition and analysed for *JAK2V617F* (1 PV, 3 PMF). The percentage of colonies (normal(WT)/heterozygous/homozygous) is indicated in the figure for each patient.

Supplementary Figure 4: (a) The binding of the recombinant RING domain of the CBP protein used as the negative control to immobilized biotinylated HSP27 was determined by biolayer interferometry (control) (n=3 independent experiments). **(b)** The binding of recombinant alpha B crystallin to immobilized biotinylated HSP27, used as a positive control³⁰, was determined by biolayer interferometry (n=3 independent experiments). **(c)** Raw data for the loading step. The association and dissociation steps were done at 26°C as follow: Baseline = PBS - 60s; Loading = HSP 27 - 600s (the loading was stopped at 1nm), two successive Baselines = - 120s; Association step: - 600s; Dissociation step : - 600s. (n=3 independent experiments). **(d)** Recombinant proteins Myc-tagged STAT5a and HA-tagged HSP27 produced in the TNT rabbit reticulocyte lysate (RLL) were incubated 15 min at 37°C and then subjected to immunoprecipitation using an HA antibody (HA-HSP27) followed by an immunodetection of Myc-tagged STAT5 (n=2 independent experiments). **(e)** HEK293T cells were transfected with HA-tag HSP27 and Myc-tagged STAT5a or JAK2 and 24h later, an Immunoprecipitation on HEK293T cells extract was performed using anti-HA antibody (HA-HSP27) or anti-Myc antibody (Myc-STAT5a) followed by an immunoblot using a STAT5 or JAK2 antibody, respectively. Inputs: proteins in total cell lysates. IP IgG: immunoprecipitation with a non-relevant antibody (IgG mouse).

Supplementary methods

Mice : Bone marrow (BM) cells (2×10^6) from a wild-type control and SclCre;FF1 mice were transplanted into lethally irradiated recipients (5 mice per group) at a 1:1 ratio as previously described (Kubovcaková et al., Blood, 2013). At 6 weeks post-transplantation, a first cell blood count was performed to check and confirm MPN phenotype. Animals were then divided into 2 groups of 5 mice: one group was treated with the vehicle alone (3 times per week) and the other mice were treated with the HSP27 inhibitor OGX-427 (10mg/kg; 3 times per week). Mice were treated during 10 weeks and cell blood count was performed every three weeks. At the end of the experiment, mice were euthanized and spleens were weighted and collected at -20°C . Mice were kept under specified pathogen-free conditions with free access to food and water. All experiments were done in strict adherence to Swiss laws for animal welfare and were approved by the Swiss Cantonal Veterinary Office of Basel-Stadt

Immunoprecipitation : For exogenous immunoprecipitation, HEK cells were transfected with HA-tagged HSP27 and Myc-tagged STAT5a or JAK2V617F constructs. 24h later, cells were lysed in lysis buffer (50 mM HEPES pH8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, Triton X-100 0.1%, Glycerol 10 %, 0.25 mM DTT, NaVO₄ 10mM, NaF 10mM, proteases inhibitors). Precleared cell lysates were then subjected to immunoprecipitation for 3h using an anti-mouse HA (HSP27) (Sigma-aldrich) or Myc (STAT5) antibody or a mouse IgG as a negative control that were pre-incubated 1h at RT with Protein G UltraLink Resin beads (Pierce). Protein complexes were then washed 4 times in lysis buffer and suspended in 2X Laemmli buffer. After boiling, the immunoprecipitates were resolved in 8-12% SDS-PAGE and immunoblot was performed using an anti-rabbit STAT5, JAK2 (Cell Signalling technologies, 9363 and 3230) or HSP27 antibody (Enzo Life Sciences, SPA-803).

For *in vitro* immunoprecipitation, recombinant proteins were produced using TNT Quick Coupled Transcription/Transcription System (Promega) as follows: 1 mg of template plasmid DNA was added to the reaction mixture, which was afterwards incubated at 30°C for 90 min. The *in vitro* translated proteins were incubated 15 min at 37°C in buffer (HEPES pH7.4 10mM, NaCl 25mM MgCl₂ 5mM MnCl₂ 5mM, DTT 1mM, protease and phosphatase inhibitors) and then subjected to immunoprecipitation using a mouse anti-HA antibody (HSP27) (Sigma) or a mouse IgG as a negative control that were pre-incubated 1h at RT with Protein G UltraLink Resin (Pierce). Protein complexes were then washed 4 times in lysis buffer and suspended in 2X Laemmli buffer. After boiling, the immunoprecipitates were resolved in 8% SDS-PAGE and immunoblot was performed using an anti-rabbit STAT5 (Cell Signalling technologies, 9363).

shRNA production: For shRNA experiments, the sequence for shRNA targeting human HSP27 was cloned in a pRRSIN-PGK-eGFP-WPRE plasmid. Lentivirus particles were produced in HEK293T cells and HEL92.1.7 were transduced with lentivirus encoding shRNA for HSP27 or Ctrl and sorted for GFP on ARIA III cytometer.

Purification of CD34 cells and erythroid progenitor assays: Mononuclear cells from MPN patients were obtained over a Ficoll density gradient and CD34⁺ cells were purified by a double-positive magnetic cell sorting system (AutoMACS, Miltenyi Biotec, Paris, France). CD34⁺ cells were cultured 2 days in a liquid culture system stimulating erythropoiesis, in the presence of 50 ng/ml recombinant human stem cell factor (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), 50 U/ml interleukin-3 (Novartis, Basel, Switzerland) and 3 U/ml EPO (Orthobiotech, Paris, France). Cells were then transduced with lentiviral vector encoding shRNA-HSP27 or shRNA-CTRL (SCR) and GFP. The CD34⁺/GFP⁺ were sorted 24 hours later and 750-1000 cells were plated in duplicate in semi-solid conditions (methylcellulose) (Stem Cell Technologies, H4230) supplemented with IL3, SCF and EPO. BFU-E were counted 14 days later and were plucked from methylcellulose for genotyping. The JAK2V617F mutational status was analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), using fluorescent competitive probes.

Annexe 3:

HSP90 and HSP70: Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms.

Sevin M, Girodon F, Garrido C and de Thonel A.

Sevin et al., *Neoplasms. Mediators Inflamm.* 2015; 2015:970242.

Review Article

HSP90 and HSP70: Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms

Margaux Sevin,^{1,2} François Girodon,^{1,2,3} Carmen Garrido,^{1,2,4} and Aurélie de Thonel^{1,2}

¹INSERM, UMR 866, Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer and Association pour la Recherche contre le Cancer, La Ligue Nationale contre le Cancer, Laboratoire d'Excellence LipSTIC, 21000 Dijon, France

²Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, 21000 Dijon, France

³Service d'Hématologie Biologique, Pôle Biologie, 21000 Dijon, France

⁴Centre Anticancéreux Georges-François Leclerc, CGFL, 21000 Dijon, France

Correspondence should be addressed to Aurélie de Thonel; aurelie.dethonel@u-bourgogne.fr

Received 30 July 2015; Accepted 27 September 2015

Academic Editor: Hans Carl Hasselbalch

Copyright © 2015 Margaux Sevin et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal stem cell disorders that lead to the excessive production of one or more blood cell lineages. It has been reported that, in most MPN, inflammatory cytokines are frequently increased, indicating that inflammation plays a crucial role in these disorders. Heat shock proteins (HSP) are induced in response to many stressful conditions from heat shock to hypoxia and inflammation. Besides their chaperone and cytoprotective functions, HSPs are key players during inflammation, hence the term “chaperokine.” Through their chaperone activity, HSP90, a stabilizer of many oncogenes (e.g., JAK2), and HSP70, a powerful antiapoptotic chaperone, tightly regulate Nuclear Factor-kappa B signalling, a critical pathway in mediating inflammatory responses. In light of this potential, several HSP90 inhibitors have been generated as anticancer agents able to degrade oncogenes. As it turns out, however, these drugs are also potent inhibitors of the inflammatory response in various diseases. Given the chaperone potential of HSP70 and the fact that HSP90 inhibitors induce HSP70, interest in HSP70 inhibitors is also increasing. Here, we focus on the implication of HSP90 and HSP70 in inflammatory responses and on the emergence of new therapeutic approaches in MPN based on HSP inhibitors.

1. Introduction

1.1. Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) are acquired clonal disorders of haematopoietic stem cells (HSC) characterized by hyperplasia of one or several myeloid lineages. They include essential thrombocythaemia (ET), polycythaemia vera (PV), and myelofibrosis (PMF). The V617F mutation of the Janus kinase protein, JAK2, is the most prevalent genetic abnormality in these three types of MPN and is found in 95% of PV, and about 50% of ET and PMF [1–4]. This mutation, which usually affects only one of the JAK2 gene alleles in ET, frequently becomes homozygous in PV and MF. Subsequently, JAK2V617F induces the constitutive activation of downstream signalling pathways including PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase), MAPK

(Mitogen Activating Protein Kinase), and STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) and thus cytokine independent growth and hypersensitivity [2]. Other abnormalities in the TPO receptor (MPL)/JAK2 axis, such as mutations in MPL, LNK, [5] or CBL epigenetic regulators (TET2 (Tet methylcytosine dioxygenase 2) [6] and DNMT3A (DNA Methyl Transferase 3b) [7]), have been identified. More recently, two groups have identified novel alterations of the calreticulin gene (CALR) in around 67% and 88% of JAK2-negative ET and PMF, respectively. These alterations were exceptionally found in PV patients. Inflammation seems to be independent from the identified mutations, and better understanding of the causes and molecular mechanisms that underlie chronic inflammation in MPNs seems necessary to improve the treatments currently proposed to MPN patients. Depending on the beneficial effects of JAK2 inhibitors on inflammatory conditions observed in myelofibrosis, one may

reasonably wonder whether other anti-inflammatory therapeutics could be useful. In this review, we focus on the key role of heat shock proteins in inflammatory responses and on the emergence of new therapeutic approaches based on HSP inhibitors.

1.2. Heat Shock Proteins (HSPs). Stress or heat shock proteins (HSPs), first discovered in 1962 by Ritossa [8], are a set of ubiquitous and highly conserved proteins. Mammalian HSPs have been classified into two groups according to their size: high molecular weight HSPs and small molecular weight HSPs. The first group includes four major families: HSP110, HSP90, HSP70, and HSP60. Some of these are expressed constitutively whereas expression of the others is induced by stressful conditions [9]. High molecular weight HSPs are ATP-dependent chaperones and require cochaperones to modulate their conformation and ATP binding. In contrast, small molecular weight HSPs, such as HSP27, are ATP-independent chaperones. HSPs are induced by a variety of physiological and environmental insults, from temperature stress to hypoxia, inflammation, infections, or anticancer chemotherapy [10]. Even in the absence of stress, HSPs play key roles in living systems by acting as chaperones. They assist in (i) the folding of newly synthesized polypeptides, (ii) the assembly of multiprotein complexes, and (iii) the transport of proteins across cellular membranes [11].

Stress proteins allow cells to survive in otherwise lethal conditions, and several mechanisms account for their cytoprotective effect: (i) as mentioned above, they are powerful chaperones; (ii) they participate in the proteasome-mediated degradation of proteins under stress conditions, thereby contributing to the so-called “protein triage”; (iii) they inhibit key effectors of the apoptotic machinery at the pre- and postmitochondrial level [12]. Among the different HSPs, HSP27 and HSP70 are the most strongly induced after stresses such as anticancer drugs, oxidative stress, radiation, and shock inflammatory stress. This need for HSPs increases not only after proteotoxic damage, but also during physiological conditions, such as differentiation processes, in a tissue and stage-specific manner. HSPs like HSP90 and HSP70 participate in the monomacrophagic differentiation of primary monocytes [13, 14]. In zebrafish, mutation of GRP75 (HSP70 family) specifically impairs the development of erythrocytes, granulocytes, and haematopoietic progenitors, thus giving rise to a human myelodysplastic-like syndrome (MDS) [15]. Moreover, HSP70 and HSP27 are required for erythroid differentiation of human primary erythroblasts [16, 17]. Apart from their cytoprotective functions, HSPs such as HSP90 and HSP70 have been shown to have additional cellular functions directly related to inflammation and the innate immune response. The term “chaperokine” was therefore attributed to these HSPs, which combine their unique function to act both as a chaperone and as cytokine (see Section 3).

In this review, we will focus mainly on the role of HSP90 and HSP70 in inflammation and on the therapeutic approaches based on their inhibition.

The Chaperone HSP90. The HSP90 family includes HSP90-alpha and HSP90beta, which functions as an ATP-dependent

chaperone. HSP90 forms large protein complexes with other molecular chaperones (p23, cdc37, HSP70, and so on) known as multichaperone complexes. This chaperone complex is involved in the folding, activation, and assembly of numerous proteins, including key mediators of signal transduction and transcriptional regulation [18]. The alpha and beta isoforms of HSP90, which are essential for the viability of eukaryotic cells, represent 1-2% of total cytosolic proteins usually in a latent, uncomplexed form and can be further induced by stresses. Conversely, tumours often express high levels of catalytically active HSP90, which is found in complexes with oncogenic client proteins [19]. HSP90 is overexpressed in breast tumours, lung cancer, leukaemia (i.e., myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia), and Hodgkin lymphoma [20], and thus it contributes to tumorigenicity and cancer cell resistance. HSP90 acts through both its antiapoptotic role and its chaperone function of stabilizing many kinases involved in cancer-cell signalling, including tyrosine kinases (i.e., FLT3 [21], JAK2 [22], v-Src [23], and serine/threonine kinases (AKT, Raf-1)). HSP90 also interacts with and stabilizes the receptor interacting kinase (RIP). Upon stimulation by Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- α), RIP is recruited to the TNF receptor, thereby allowing the activation of Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B), a key component of the inflammatory response. Following depletion of HSP90, RIP is degraded and activation of NF- κ B is prevented [24]. In this context, HSP90, by its stabilizing effect on the conformations of mutant proteins during transformation, favours the emergence of polymorphisms and mutations that support the evolution of resistant clones. Therefore, a rationale exists for targeting HSP90-dependent pathways in cancers and inflammatory diseases.

The Chaperone HSP70. The HSP70 family constitutes the most conserved and well-known class of HSPs. Among them, the inducible HSP70 (also called HSP72/HSPA1) and the constitutively expressed HSC70 (HSP73/HSPA8) are mainly localized in the cytosol, while others are located in the mitochondria (mtHSP70) or in the endoplasmic reticulum (GRP78/Bip). HSP70 cochaperones (HSP40, HSP110, CHIP, HOP, HIP, BAG-1, and BAG-3) modulate the chaperone activity of the protein through their binding to functional domains of HSP70 either the NH₂-terminal ATP-binding domain (ABD) or the COOH-terminal peptide-binding domain (PBD).

HSP70 is a powerful antiapoptotic protein that inhibits both caspase-dependent (extrinsic and intrinsic pathways) and independent cell death [25, 26]. The important role of HSP70 was further demonstrated using mouse embryonic cells that lacked inducible HSP70 (encoded by HSP70.1 and HSP70.3), which display hypersensitivity to a wide range of lethal stimuli [27].

The high expression of HSP70 is associated with a poor prognosis and resistance to chemotherapeutic drugs in many cancers such as breast, endometrial, or gastric cancer [28, 29]. In Bcr-abl leukaemia cells, the expression of the protein HSP70 is also elevated and requires the GATA-response element in the HSP70 promoter [30]. Recently, Gallardo and colleagues identified a role for HSP70 in the

proliferation and survival of the erythroid lineage in PV. In an *ex vivo* model, inhibition of HSP70 expression led to the dose-dependent inhibition of cell growth and burst formation unit erythroid (BFU-E) in PV and ET. This effect was associated with increased apoptosis of the erythroid lineage and decreased phospho-JAK2 signalling [31]. HSP70 might contribute to cell proliferation through the regulation of STAT signalling. Overexpression of HSP70 has been shown to upregulate STAT5 levels and activity, thus allowing the expression of the antiapoptotic protein Bcl-xl [32].

2. Focus on Emerging Drugs as HSP Inhibitors

2.1. HSP90 Inhibitors. The HSP90 chaperone family has a unique pocket in their N-terminal region, which binds ATP and ADP. This domain is crucial for the control of conformation and activity. Most competitive inhibitors of HSP90 bind to this “pocket” and block interaction with its client proteins.

There are two major classes of active molecules: natural HSP90 inhibitors and their derivatives, as well as synthetic inhibitors. In this review, we focus on HSP90 inhibitors, which have been proved to be useful for patients with haematological malignancies.

Most of the natural HSP90 inhibitor derivatives come from Geldanamycin and Radicicol [33]. Geldanamycin is an ansamycin-derivative benzoquinone that binds to the ATP binding “pocket” of HSP90 with higher affinity than natural nucleotides. This compound was discovered in 1970 [34]. It was first identified for its antibiotic and antitumoural potential in leukaemia (L1210) and nasopharynx KB cell lines [34]. A preclinical study subsequently revealed the hepatotoxicity of this inhibitor, thereby limiting its application [35]. Many derivatives have been reported to have less severe hepatotoxic effects and demonstrate potent anticancer activity at nontoxic doses, as is the case for 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (tanespimycin, 17-AAG) and 17-[2-(dimethylamino) ethyl] amino-17-demethoxygeldanamycin (alvespimycin, 17-DMAG) [36]. 17-DMAG, which has better bioavailability and water solubility, went through a phase I evaluation [37] and 17-AAG with an improved formulation (DMSO-free) is in a phase III clinical trial.

Similarly to Geldanamycin, Radicicol is a macrocyclic antifungal antibiotic [38] that binds to the N-terminal domain of HSP90 [39] and destabilizes HSP90 client proteins. While *in vitro* studies have shown the efficacy of Radicicol, it was found unstable *in vivo*. Derivatives of Radicicol like VER-52296 (NVP-AUY922) were thus developed and entered in clinical trials in 2007 [40].

In parallel with natural HSP90 inhibitor derivatives, novel synthetic inhibitors have been developed, including purine-based compounds. The first class of such scaffolds was the PU series, such as PU-H71 and PU-DZ8, which share biological activity with Geldanamycin and Radicicol [33]. The PU series have a higher affinity for HSP90 than does ADP and are more water soluble and specific [41]. One of them, PU-H71, has been shown to induce tumour regression in a xenograft model of triple-negative breast cancers [42] and is currently

in clinical trials. Another family of chemical compounds, not yet disclosed, has been produced by Serenex using a chemoproteomics technology platform. Among this family, SNX-7081, a small oral molecule, is more potent than 17-AAG in Chronic Lymphocytic Leukaemia [43] and SNX-5422 has entered a phase I trial [43] (Pfizer Inc., New York, NY, USA) [44, 45].

2.2. HSP70 Inhibitors. Members of the HSP70 family comprise three major domains: an N-terminal domain, which binds ATP, a substrate-binding domain, and a C-terminal domain, which also acts as a substrate-binding domain. Inhibitors of HSP70 could be classified in two groups according to the targeted domains, ABD or PBD.

Different inhibitors targeting the PBD have been developed. The first inhibitor was derived from the apoptosis inducing factor (AIF) protein, named ADD70 (AIF derived decoy for HSP70) [27]. It prevents caspase-independent cell death through its association with HSP70 [46]. Other small chemical inhibitors of HSP70, like 2-phenylethanesulfonamide (PES), which is also called pifithrin- μ , induce an apoptotic caspase-dependent cell death [47].

Other strategies to inhibit HSP70 are based on molecules that target the ABD. The first inhibitor tested was VER-155008. This is an adenosine-derived inhibitor that inhibits cell proliferation and induces apoptosis by targeting the ABD of both the inducible and constitutive (HSC70) form of HSP70 [48]. Furthermore, combined with small HSP90 inhibitors, VER-155008 displays a potentiator effect in colon cancer cells [48].

In order to protect the activity of constitutive HSC70, peptide inhibitors selectively directed against the inducible form of HSP70 have been designed. By screening, our group has selected peptide aptamers with (i) high affinity for the ABD of HSP70 and (ii) a strong inhibitory capacity on the chaperone activity of HSP70 *in vitro*. One of these aptamers, named A17, has also demonstrated a strong antitumoural potential *in vivo* [49].

Designing molecules that directly target HSP70 protein is not the only strategy. Other molecules, like KNK437 (N-formyl-3,4-methylenedioxy-benzylidene-gamma-butyrolactam), are able to inhibit the expression of inducible HSPs. In particular, KNK434 has been shown to prevent the induction of HSP70 following treatment with HSP90 inhibitors [50].

3. HSP90 and HSP70: Role in the Inflammatory Process

3.1. HSP90 and Inflammation. As previously mentioned, HSP90 functions as part of a multichaperone complex via its association with cochaperones (e.g., p23 and HSP70) and client proteins. Inhibition of HSP90 by inhibitors such as benzoquinone ansamycins leads to both upregulation of HSP expression (especially HSP70 and HSP27) and degradation of various client proteins via proteasomal degradation [51]. Several key regulators of signalling pathways that play critical roles in mediating inflammatory and immune responses are clients of HSP90. These include JAK/Signal Transducer

and Activator of Transcription (STATs) (JAK2), Toll Like-Receptor- (TLR-) 4 (e.g., TGF- β -activated kinase- (TAK-) 1 and RIP kinase), and NF- κ B (Inhibitor of κ B Kinase (IKK)) signalling pathways [52].

Although the main application of HSP90 inhibitors is related to cancer therapy, these drugs are potent inhibitors of certain proinflammatory mediators in different cell types [50, 51]. The use of HSP90 inhibitors causes the dissociation of the IKK complex and thus prevents NF- κ B activation [53]. In a number of *in vitro* models, Geldanamycin has inhibited TNF- α -mediated IKK and NF- κ B activation [24, 50, 54]. In cultured human respiratory epithelium, Geldanamycin also inhibits TNF- α -mediated IL-8 gene expression [54]. SNX-7081 (by Serenex), a potent inhibitor of HSP90, increases HSP70 levels, and prevents NF- κ B nuclear translocation, and cytokine and nitric oxide (NO) production following the stimulation of Jurkat cells by TNF α , Interleukin(IL)1-beta or LPS [55]. Data show that HSP90 immunostaining is increased in inflammatory regions of human atherosclerotic plaque. Atherosclerotic plaque of mice treated with either 17-AAG or 17-DMAG showed reduced activation of the transcription factors STATs and NF- κ B and chemokine expression induced by proinflammatory cytokines [56]. 17-AAG was also shown to attenuate the inflammatory response in autoimmune encephalomyelitis and in severe sepsis [55, 57]. More recently, Yun et al. showed that a synthetic HSP90 inhibitor, EC144, is potent and selective and is efficacious in an inflammatory mouse model of endotoxic shock. EC144 is able to prevent LPS-mediated TLR4 signalling, thus decreasing proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 [58].

3.2. HSP70 and Inflammation. Inflammation occurs in response to various cellular stresses including infection or heat shock. During infection, the level of HSP70 is increased and confers cytoprotection [59] via the inhibition of inflammatory signalling pathways, including the NF- κ B pathway [60].

HSP70 proteins are implicated in the regulation of the immune responses and modulate inflammation through several mechanisms. Of note, extracellular HSP70 is released from intact cells via an active nonclassical secretory pathway. HSP70 could be secreted associated with exosomes or by an endolysosomal dependent pathway [61, 62]. Extracellular HSP70 was first shown to enhance the cross-presentation of the HSP-bound peptide by MHC-I on dendritic cells (DCs). HSP70s, by associating with peptides, form an HSP-peptide complex that binds to cell surface receptors, such as CD91 and Lox-1, and is further internalized by endocytosis [63]. Extracellular HSP70 functions as a "danger signal" [64], since, compared with serum from healthy individuals, serum from patients with autoimmune diseases, patients with trauma, and children with septic shock shows high concentrations of HSP70 [65–67]. As a mediator of inflammation, exogenous HSP70 is able to activate cell surface receptors on immune cells such as TLR2 and TLR4 [68], thus leading to NF- κ B activation, and TNF- α , IL-1 β , and IL-6 production [69]. As well as activating the NF- κ B pathway, downstream signalling

induced by HSP70 elicits a rapid calcium flux, and the production of inflammatory cytokines and chemokines by monocytes and DCs [69].

4. HSP90 as a Therapeutic Target in MPN and the Potential Implication of HSP70

Malignant cells have more unfolded proteins than do normal cells, which lead to higher chaperone expression. In transformed myeloid cells, oncogenic transducer molecules have been shown to depend more on HSP90 chaperoning than is the case in untransformed cells [70]. Among the client proteins that interact with and are stabilized by HSP90, there are several transducer molecules, such as kinases like BCR-ABL [71, 72], FLT-3 [21], and JAK2 [22]. In myeloproliferative neoplasms, one promising therapy is based on using HSP90 as a therapeutic target to destabilize its oncogenic partners and induce their proteolytic degradation. Different specific inhibitors of HSP90 (i.e., geldanamycin derivatives, resorcinol derivatives, purine analogues, and other synthetic inhibitors) are currently used as anticancer drugs and display potent activity in clinical trials in patients with solid tumours and haematological malignancies [42, 68].

It was first established that targeting HSP90 in JAK2-mutant cells lines by using 17-AAG reduced JAK2 levels and inhibited JAK2 signalling pathway activation [73]. This study showed a decrease in the expression of oncoprotein AKT and in the phosphorylated form of STAT5 and JAK2. In addition to this direct inhibition strategy, the authors combined JAK2 inhibitors with 17-AAG and observed no synergic effect. However, a more detailed study that examined the effects of PU-H71 [74] showed promising results in preclinical models of solid cancers [42] or haematological cancers [75]. In addition, the toxic side effects of PU-H71 on nonhaematopoietic cells were lower than those associated with geldanamycin derivatives, such as 17-AAG or 17-DMAG [74]. In this work, PU-H71 demonstrated interesting effects *in vitro* in JAK2-dependent cell lines, *in vivo* in murine models of PV and ET, and in samples from patients with primary MPN [74]. Moreover, PU-H71, which is able to induce degradation of client proteins of HSP90 including JAK2, inhibits proliferation and attenuates JAK-STAT pathways in JAK2V617F-positive or MPLW515L-positive cell lines. Following these results, the authors observed additive effects of a combined treatment using PU-H71 and a JAK2 inhibitor (TG101348), suggesting that using inhibitors of HSP90 alone or in combination might be an interesting therapeutic approach.

In light of these results, other inhibitors of HSP90 were tested. Among these molecules, a nongeldanamycin analogue (NVP-AUY922, AUY922), already known to inhibit the chaperone association of HSP90 with its client proteins [72, 75], was investigated in the context of a preclinical MPN study [70]. This study found a synergic effect of AUY922 and a JAK2 inhibitor (TG101209) in JAK2V617F cells lines. In addition, it has been shown that genetic resistance to enzymatic inhibitors of JAK2 is overcome by HSP90 inhibition [76].

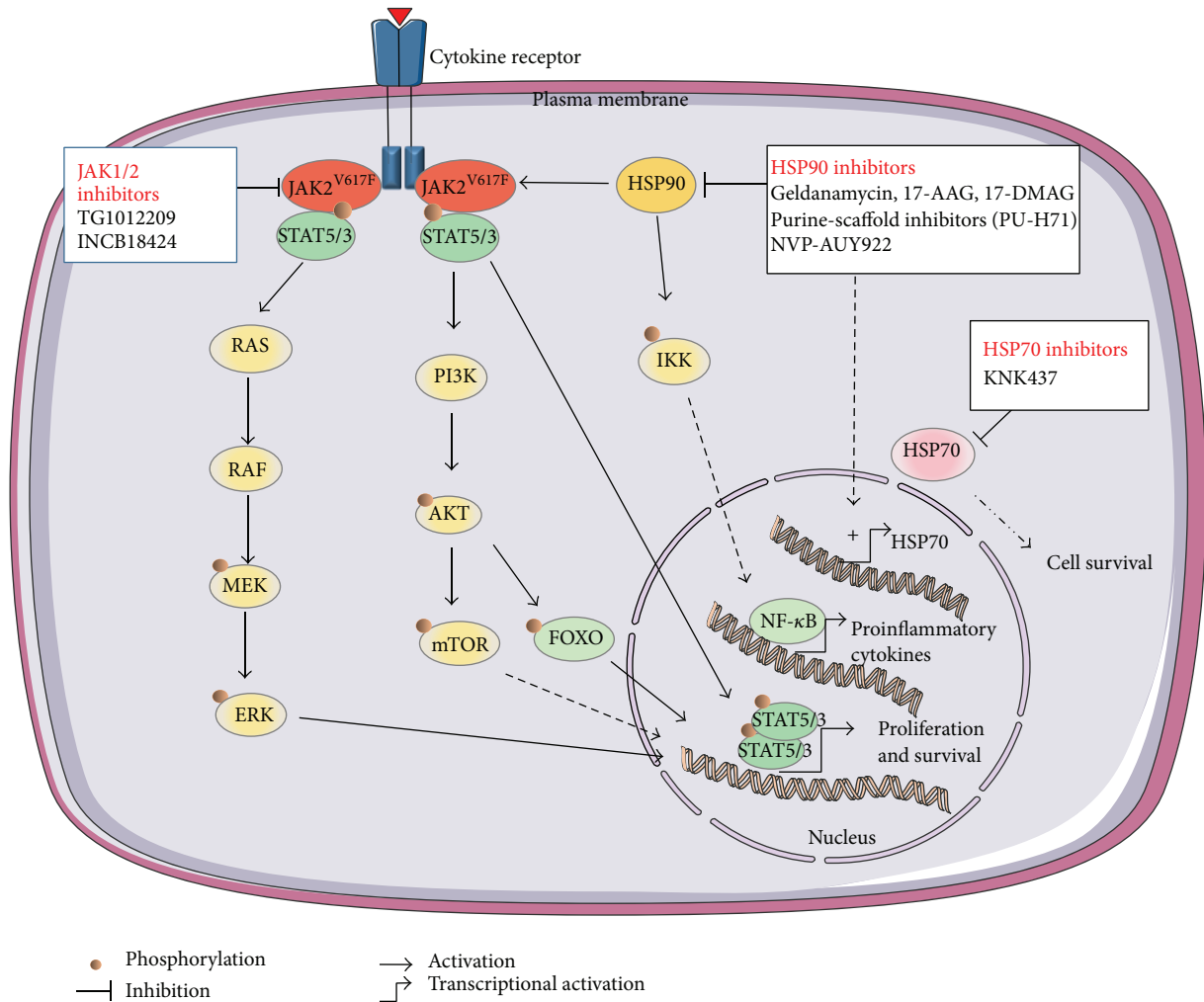


FIGURE 1: Schematic representation of the potential effects of HSP inhibitors on the main activated pathways in myeloproliferative neoplasms. PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase), STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), ERK (extracellular signal-regulated kinases), MEK (mitogen-activated protein kinase kinase), HSP (heat shock protein), mTOR (mammalian target of rapamycin), FOXO (Forkhead transcription factors), NF-κB (Nuclear Factor-kappa B), and IKK (Inhibitor of IκB Kinase).

This combination was also evaluated on CD34+ cells harvested from the peripheral blood of patients suffering from myelofibrosis. In these primary cells, the combined treatment was more effective than each agent alone and caused a greater decrease in JAK2 and AKT levels in addition to a decrease in the phosphorylated forms of STAT3 and STAT5 without affecting their expression. More recently, it was also observed that the effect of JAK inhibitors and especially the dual JAK1/JAK2 inhibitor INCB18424 (ruxolitinib, JAKAVI) was enhanced by PU-H71 in a murine model of myelofibrosis [77]. Nevertheless, HSP90 inhibitors have been reported to increase the expression of other HSPs including HSP70, which provides a selective survival advantage in tumour cells.

The implication of HSP70 in MPN has not been investigated; however, several in-depth studies have explored the implication of HSP70 in other types of haematological malignancies including chronic [78, 79] or acute myeloid leukaemia [80]. Recently, proteomic analysis of samples from PV and ET patients revealed that HSP70 is overexpressed in

PV samples but not in ET samples. Additionally, JAK2V617F cells from patients with PV were sensitized by siRNA HSP70 interference assay or treatment with an inhibitor of HSP70 (KNK437). Their results supported the hypothesis that HSP70 is implicated in the pathogenesis of PV and suggested that HSP70 could constitute a new molecular target [31]. Furthermore, the association of ruxolitinib with the HSP70 inhibitor, KNK437, showed a synergic effect in both JAK2 V617F cells lines and in culture colonies of PV [81]. These data confirm that HSP70 must participate in the pathogenesis of PV and seems to be a promising therapeutic target in MPN.

5. Concluding Remarks

Inhibition of HSP90 as a therapeutic approach was first evaluated in the context of cancer treatments [19, 77]. However, growing evidence indicates that HSP90 inhibitors could be beneficial for both MPN and inflammatory reactions. Moreover, and given the substantial increase in HSP70 induced

by HSP90 inhibitors, a combination with HSP70 inhibitors might be an interesting alternative to optimise the treatment [74, 75] (Figure 1).

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank Mr. Philip Bastable (University Hospital, Dijon, France) for revising the paper. The authors have received funding from “La Ligue contre le Cancer,” the “Association pour la Recherche sur le Cancer,” and the association “Laurette Fugain.”

References

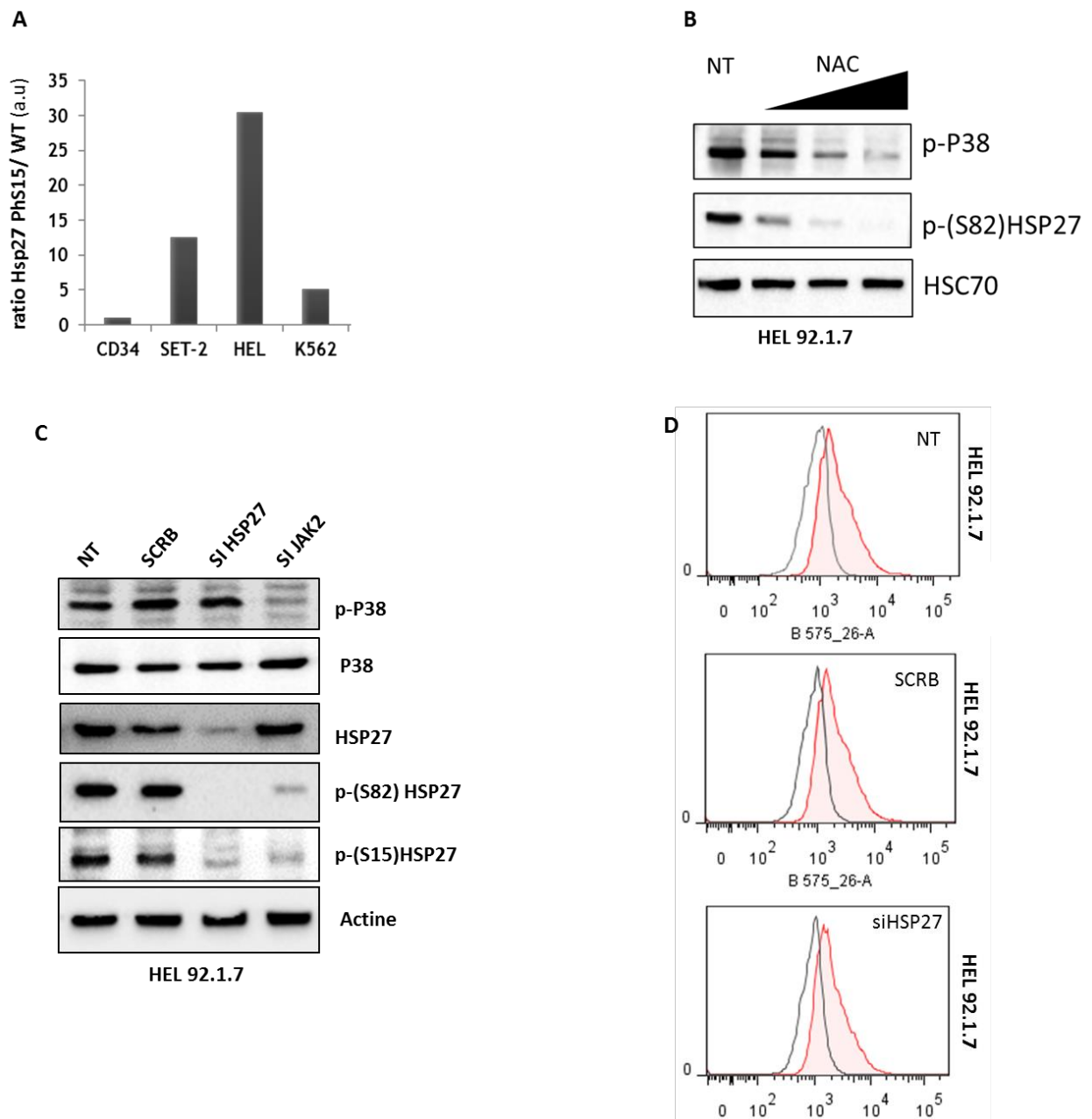
- [1] E. J. Baxter, L. M. Scott, P. J. Campbell et al., “Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders,” *The Lancet*, vol. 365, no. 9464, pp. 1054–1061, 2005.
- [2] C. James, V. Ugo, J.-P. Le Couédic et al., “A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera,” *Nature*, vol. 434, no. 7037, pp. 1144–1148, 2005.
- [3] R. Kralovics and R. C. Skoda, “Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders,” *Blood Reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 1–13, 2005.
- [4] R. L. Levine, M. Wadleigh, J. Coombs et al., “Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis,” *Cancer Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 387–397, 2005.
- [5] T. L. Lasho, A. Pardanani, and A. Tefferi, “LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 12, pp. 1189–1190, 2010.
- [6] F. Delhommeau, S. Dupont, V. Della Valle et al., “Mutation in TET2 in myeloid cancers,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 22, pp. 2289–2301, 2009.
- [7] F. Stegelmann, L. Bullinger, R. F. Schlenk et al., “DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms,” *Leukemia*, vol. 25, no. 7, pp. 1217–1219, 2011.
- [8] F. Ritossa, “A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*,” *Experientia*, vol. 18, no. 12, pp. 571–573, 1962.
- [9] M. J. Schlesinger, “Heat shock proteins,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 21, pp. 12111–12114, 1990.
- [10] S. Jindal, “Heat shock proteins: applications in health and disease,” *Trends in Biotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 17–20, 1996.
- [11] C. Garrido, S. Gurbuxani, L. Ravagnan, and G. Kroemer, “Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 286, no. 3, pp. 433–442, 2001.
- [12] D. Lanneau, M. Brunet, E. Frisan, E. Solary, M. Fontenay, and C. Garrido, “Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 12, no. 3, pp. 743–761, 2008.
- [13] C. Didelot, D. Lanneau, M. Brunet et al., “Interaction of heat shock protein 90 β isoform (HSP90 β) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 15, no. 5, pp. 859–866, 2008.
- [14] G. Jego, D. Lanneau, A. De Thonel et al., “Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes,” *Leukemia*, vol. 28, no. 8, pp. 1676–1686, 2014.
- [15] S. E. Craven, D. French, W. Ye, F. De Sauvage, and A. Rosenthal, “Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome,” *Blood*, vol. 105, no. 9, pp. 3528–3534, 2005.
- [16] J.-A. Ribeil, Y. Zermati, J. Vandekerckhove et al., “Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1,” *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 102–105, 2007.
- [17] A. de Thonel, J. Vandekerckhove, D. Lanneau et al., “HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation,” *Blood*, vol. 116, no. 1, pp. 85–96, 2010.
- [18] W. B. Pratt and D. O. Toft, “Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery,” *Experimental Biology and Medicine*, vol. 228, no. 2, pp. 111–133, 2003.
- [19] L. Whitesell and S. L. Lindquist, “HSP90 and the chaperoning of cancer,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 10, pp. 761–772, 2005.
- [20] P.-L. Hsu and S.-M. Hsu, “Abundance of heat shock proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in malignant cells of Hodgkin’s disease,” *Cancer Research*, vol. 58, no. 23, pp. 5507–5513, 1998.
- [21] P. George, P. Bali, P. Cohen 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 Research*, vol. 64, no. 10, pp. 3645–3652, 2004.
- [22] L. Shang and T. B. Tomasi, “The heat shock protein 90-CDC37 chaperone complex is required for signaling by types I and II interferons,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 4, pp. 1876–1884, 2006.
- [23] L. Whitesell, E. G. Mimnaugh, B. De Costa, C. E. Myers, and L. M. Neckers, “Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 18, pp. 8324–8328, 1994.
- [24] J. Lewis, A. Devin, A. Miller et al., “Disruption of Hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor- κ B activation,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 14, pp. 10519–10526, 2000.
- [25] A.-L. Joly, G. Wettstein, G. Mignot, F. Ghiringhelli, and C. Garrido, “Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity,” *Journal of Innate Immunity*, vol. 2, no. 3, pp. 238–247, 2010.
- [26] E. M. Creagh, R. J. Carmody, and T. G. Cotter, “Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells,” *Experimental Cell Research*, vol. 257, no. 1, pp. 58–66, 2000.
- [27] E. Schmitt, A. Parcellier, S. Gurbuxani et al., “Chemop sensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant,” *Cancer Research*, vol. 63, no. 23, pp. 8233–8240, 2003.
- [28] L. M. Vargas-Roig, F. E. Gago, O. Tello, J. C. Aznar, and D. R. Cioica, “Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy,” *International Journal of Cancer*, vol. 79, no. 5, pp. 468–475, 1998.
- [29] A. Brondani Da Rocha, A. Regner, I. Grivicich et al., “Radiore-sistance is associated to increased Hsp70 content in human

- glioblastoma cell lines," *International Journal of Oncology*, vol. 25, no. 3, pp. 777–785, 2004.
- [30] S. Ray, Y. Lu, S. H. Kaufmann et al., "Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 34, pp. 35604–35615, 2004.
- [31] M. Gallardo, S. Barrio, M. Fernandez et al., "Proteomic analysis reveals heat shock protein 70 has a key role in polycythemia Vera," *Molecular Cancer*, vol. 12, article 142, 2013.
- [32] F. Guo, C. Sigua, P. Bali et al., "Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells," *Apoptosis*, vol. 105, no. 3, pp. 1246–1255, 2005.
- [33] G. Jego, A. Hazoumé, R. Seigneuric, and C. Garrido, "Targeting heat shock proteins in cancer," *Cancer Letters*, vol. 332, no. 2, pp. 275–285, 2013.
- [34] C. DeBoer, P. A. Meulman, R. J. Wnuk, and D. H. Peterson, "Geldanamycin, a new antibiotic," *Journal of Antibiotics*, vol. 23, no. 9, pp. 442–447, 1970.
- [35] J. G. Supko, R. L. Hickman, M. R. Grever, and L. Malspeis, "Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 36, no. 4, pp. 305–315, 1995.
- [36] J. Trepel, M. Mollapour, G. Giaccone, and L. Neckers, "Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 10, no. 8, pp. 537–549, 2010.
- [37] J. E. Lancet, I. Gojo, M. Burton 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*, vol. 24, no. 4, pp. 699–705, 2010.
- [38] P. Delmotte and J. Delmotte-Plaquee, "A new antifungal substance of fungal origin," *Nature*, vol. 171, no. 4347, article 344, 1953.
- [39] T. W. Schulte, S. Akinaga, S. Soga et al., "Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin," *Cell Stress & Chaperones*, vol. 3, no. 2, pp. 100–108, 1998.
- [40] P. A. Brough, W. Aherne, X. Barril et al., "4,5-Diarylisoazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 51, no. 2, pp. 196–218, 2008.
- [41] G. Chiosis, M. N. Timaul, B. Lucas et al., "A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells," *Chemistry and Biology*, vol. 8, no. 3, pp. 289–299, 2001.
- [42] E. Caldas-Lopes, L. Cerchietti, J. H. Ahn et al., "Hsp90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 20, pp. 8368–8373, 2009.
- [43] O. G. Best, N. Singh, C. Forsyth, and S. P. Mulligan, "The novel Hsp-90 inhibitor SNX7081 is significantly more potent than 17-AAG against primary CLL cells and a range of haematological cell lines, irrespective of lesions in the TP53 pathway," *British Journal of Haematology*, vol. 151, no. 2, pp. 185–188, 2010.
- [44] L. Jin, C.-L. Xiao, C.-H. Lu et al., "Transcriptomic and proteomic approach to studying SNX-2112-induced K562 cells apoptosis and anti-leukemia activity in K562-NOD/SCID mice," *FEBS Letters*, vol. 583, no. 12, pp. 1859–1866, 2009.
- [45] Y. Okawa, T. Hideshima, P. Steed et al., "SNX-2112, a selective Hsp90 inhibitor, potently inhibits tumor cell growth, angiogenesis, and osteoclastogenesis in multiple myeloma and other hematologic tumors by abrogating signaling via Akt and ERK," *Blood*, vol. 113, no. 4, pp. 846–855, 2009.
- [46] L. Ravagnan, S. Gurbuxani, S. A. Susin et al., "Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor," *Nature Cell Biology*, vol. 3, no. 9, pp. 839–843, 2001.
- [47] J. I.-J. Leu, J. Pimkina, A. Frank, M. E. Murphy, and D. L. George, "A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70," *Molecular Cell*, vol. 36, no. 1, pp. 15–27, 2009.
- [48] A. J. Massey, D. S. Williamson, H. Browne et al., "A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 66, no. 3, pp. 535–545, 2010.
- [49] A.-L. Rérole, J. Gobbo, A. De Thonel et al., "Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy," *Cancer Research*, vol. 71, no. 2, pp. 484–495, 2011.
- [50] E. L. Davenport, A. Zeisig, L. I. Aronson et al., "Targeting heat shock protein 72 enhances Hsp90 inhibitor-induced apoptosis in myeloma," *Leukemia*, vol. 24, no. 10, pp. 1804–1807, 2010.
- [51] H. Zhang and F. Burrows, "Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 82, no. 8, pp. 488–499, 2004.
- [52] N. Adhikari, N. Charles, U. Lehmann, and J. L. Hall, "Transcription factor and kinase-mediated signaling in atherosclerosis and vascular injury," *Current Atherosclerosis Reports*, vol. 8, no. 3, pp. 252–260, 2006.
- [53] A. Salminen, T. Paimela, T. Suuronen, and K. Kaarniranta, "Innate immunity meets with cellular stress at the IKK complex: regulation of the IKK complex by HSP70 and HSP90," *Immunology Letters*, vol. 117, no. 1, pp. 9–15, 2008.
- [54] V. Malhotra, T. P. Shanley, J.-F. Pittet, W. J. Welch, and H. R. Wong, "Geldanamycin inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 gene expression in cultured human respiratory epithelium," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 25, no. 1, pp. 92–97, 2001.
- [55] J. W. Rice, J. M. Veal, R. P. Fadden et al., "Small molecule inhibitors of Hsp90 potently affect inflammatory disease pathways and exhibit activity in models of rheumatoid arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 58, no. 12, pp. 3765–3775, 2008.
- [56] J. Madrigal-Matute, O. López-Franco, L. M. Blanco-Colio et al., "Heat shock protein 90 inhibitors attenuate inflammatory responses in atherosclerosis," *Cardiovascular Research*, vol. 86, no. 2, pp. 330–337, 2010.
- [57] G. Chen, P. Cao, and D. V. Goeddel, "TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90," *Molecular Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 401–410, 2002.
- [58] T. J. Yun, E. K. Harning, K. Giza et al., "EC144, a synthetic inhibitor of heat shock protein 90, blocks innate and adaptive immune responses in models of inflammation and autoimmunity," *Journal of Immunology*, vol. 186, no. 1, pp. 563–575, 2011.
- [59] S. Bruemmer-Smith, F. Stüber, and S. Schroeder, "Protective functions of intracellular heat-shock protein (HSP) 70-expression in patients with severe sepsis," *Intensive Care Medicine*, vol. 27, no. 12, pp. 1835–1841, 2001.
- [60] H. Chen, Y. Wu, Y. Zhang et al., "Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation by interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination," *FEBS Letters*, vol. 580, no. 13, pp. 3145–3152, 2006.

- [61] F. Chalmin, S. Ladoire, G. Mignot et al., "Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 2, pp. 457–471, 2010.
- [62] S. S. Mambula and S. K. Calderwood, "Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 11, pp. 7849–7857, 2006.
- [63] P. Srivastava, "Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 3, pp. 185–194, 2002.
- [64] J. Campisi, T. H. Leem, and M. Fleshner, "Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 8, no. 3, pp. 272–286, 2003.
- [65] J. D. Johnson and M. Fleshner, "Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 79, no. 3, pp. 425–434, 2006.
- [66] R. Njemini, M. Lambert, C. Demanet, M. V. Abeele, S. Vandebosch, and T. Mets, "The induction of heat shock protein 70 in peripheral mononuclear blood cells in elderly patients: a role for inflammatory markers," *Human Immunology*, vol. 64, no. 6, pp. 575–585, 2003.
- [67] A. G. Pockley, J. Shepherd, and J. M. Corton, "Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals," *Immunological Investigations*, vol. 27, no. 6, pp. 367–377, 1998.
- [68] T. Torigoe, Y. Tamura, and N. Sato, "Heat shock proteins and immunity: application of hyperthermia for immunomodulation," *International Journal of Hyperthermia*, vol. 25, no. 8, pp. 610–616, 2009.
- [69] A. Asea, S.-K. Kraeft, E. A. Kurt-Jones et al., "HSP70 stimulates cytokine production through a CD 14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine," *Nature Medicine*, vol. 6, no. 4, pp. 435–442, 2000.
- [70] W. Fiskus, S. Verstovsek, T. Manshouri et al., "Heat shock protein 90 inhibitor is synergistic with JAK2 inhibitor and overcomes resistance to JAK2-TKI in human myeloproliferative neoplasm cells," *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 23, pp. 7347–7358, 2011.
- [71] W. G. An, T. W. Schulte, and L. M. Neckers, "The heat shock protein 90 antagonist geldanamycin alters chaperone association with p210(bcr-abl) and v-src proteins before their degradation by the proteasome," *Cell Growth and Differentiation*, vol. 11, no. 7, pp. 355–360, 2000.
- [72] M. E. Gorre, K. Ellwood-Yen, G. Chiosis, N. Rosen, and C. L. Sawyers, "BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90," *Blood*, vol. 100, no. 8, pp. 3041–3044, 2002.
- [73] J. Bareng, I. Jilani, M. Gorre et al., "A potential role for HSP90 inhibitors in the treatment of JAK2 mutant-positive diseases as demonstrated using quantitative flow cytometry," *Leukemia and Lymphoma*, vol. 48, no. 11, pp. 2189–2195, 2007.
- [74] S. Marubayashi, P. Koppikar, T. Taldone et al., "HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 10, pp. 3578–3593, 2010.
- [75] L. C. Cerchietti, E. C. Lopes, S. N. Yang et al., "A purine scaffold Hsp90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 12, pp. 1369–1376, 2009.
- [76] O. Weigert, A. A. Lane, L. Bird et al., "Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, no. 2, pp. 259–273, 2012.
- [77] N. Bhagwat, P. Koppikar, M. Keller et al., "Improved targeting of JAK2 leads to increased therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms," *Blood*, vol. 123, no. 13, pp. 2075–2083, 2014.
- [78] T. Stühmer, A. Zöllinger, D. Siegmund et al., "Signalling profile and antitumour activity of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multiple myeloma," *Leukemia*, vol. 22, no. 8, pp. 1604–1612, 2008.
- [79] S. A. Eccles, A. Massey, F. I. Raynaud et al., "NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis," *Cancer Research*, vol. 68, no. 8, pp. 2850–2860, 2008.
- [80] M. Kaiser, A. Kühnl, J. Reins et al., "Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin-1 in acute leukemia," *Blood Cancer Journal*, vol. 1, no. 7, article e28, 2011.
- [81] S. Barrio, M. Gallardo, A. Arenas et al., "Inhibition of related JAK/STAT pathways with molecular targeted drugs shows strong synergy with ruxolitinib in chronic myeloproliferative neoplasm," *British Journal of Haematology*, vol. 161, no. 5, pp. 667–676, 2013.

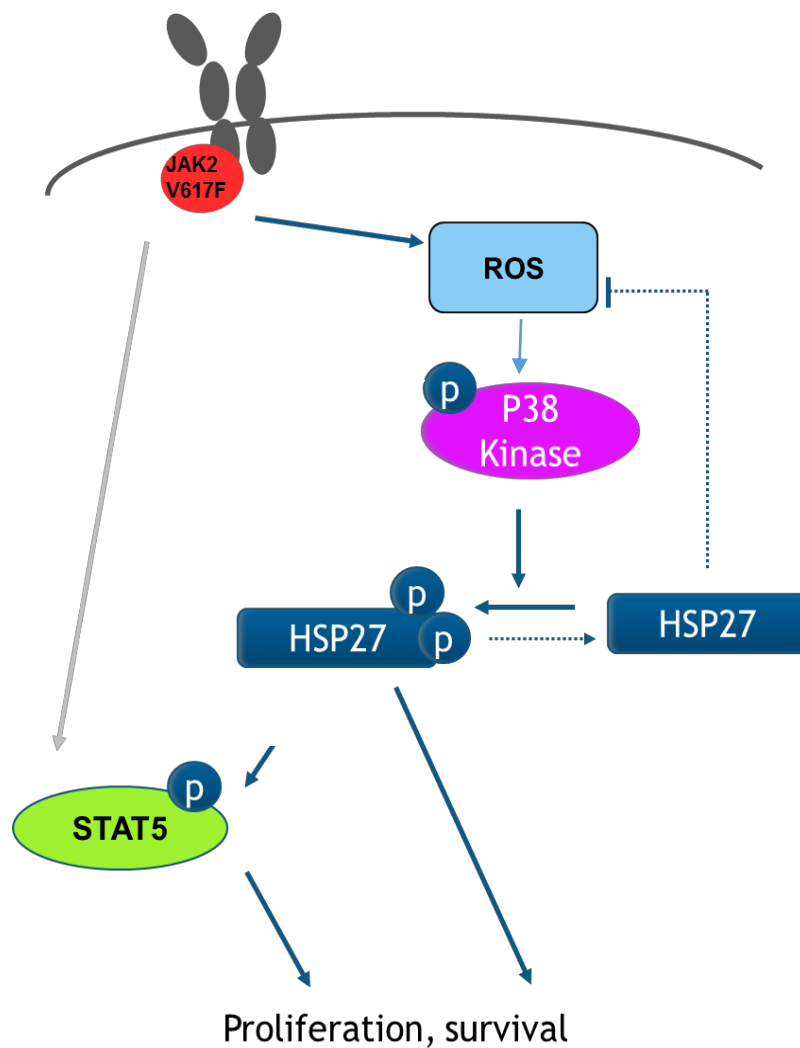
Annexe 4 :

Données supplémentaires



Annexe 4 ; Figure 1 : HSP27 est fortement phosphorylée dans les cellules *JAK2V617F* dut à la mutation *JAK2V617F* et au taux élevé de ROS

(A) Evaluation de taux de phosphorylation de HSP27 dans les lignées *JAK2V617F* (HEL92.1.7 et SET-2) en comparaison avec les cellules CD34+ de donneurs sains et leucémiques non mutées pour JAK2 (K562). (B) Western blot montrant l'effet d'un anti oxydant (la n-acetyl cysteine (NAC)) sur la phosphorylation de la p38MAPK et de HSP27 (phospho sérine 82), dans la lignée HEL92.1.7 positive pour *JAK2V617F*. (C) Western blot montrant les effets de la déplétion de HSP27 et de JAK2 et sur la phosphatation de la MAPKp38 et de HSP27 (phospho sérine 15 et 82). (D) Quantification par cytométrie en flux du taux de ROS dans les cellules HEL92.1.7 par un marquage à la DHE (en gris cellules non marquées, en rouge cellules marquées à la DHE).



Annexe 4 ; Figure 2 : Schéma hypothétique de l'implication de HSP27 dans la signalisation des ROS des cellules *JAK2V617F*

La kinase *JAK2V617F*, connue pour activer les ROS, induit l'activation de la signalisation des MAPKs dont la p38MAPK. Cette activation de p38MAPK constitutive, favorise ainsi la phosphorylation de HSP27, empêchant la détoxification des ROS par cette HSP qui est principalement sous forme non phosphorylée. Phospho-HSP27 pourrait principalement interagir ainsi avec la protéine STAT5 afin de promouvoir la prolifération.

Annexe 5 :

Liste des publications et participations aux congrès

✓ Publications internationales avec comité de lecture

- **Sevin M**, Pernet N, Causse C, Vitte F, Kubovcakova L, Villeval JL, Lacout C, Cordonnier M, Rodrigues-Lima F, Chanteloup G, Mosca M, Chrétien ML, Bastie JN, Audia S, Sagot P, Ramla S, Martin L, Gleave M, Mezger V, Skoda R, Plo I, Garrido C, Girodon F and de Thonel A, Impact of HSP27 in myelofibrosis : a new partner of JAK2/STAT5. *Nature Communications*. 2017, In submission
- Gastou M *, Rio S*, Dussiot M, Karboul N, Moniz H, Leblanc T, **Sevin M**, Gonin P, Larghero J, Garrido C, Narla A, Mohandas N, Vainchenker W, Hermine O, Solary E, Da Costa L. The severe phenotype of Diamond Blackfan Anemia is modulated by Heat Shock Protein 70. *Blood Advances*. 2017, In press
- Park JH, **Sevin M**, Ramla S, Truffot A, Verrier T, Bouchot D, Courtois M, Bas M, Benali S, Bailly F, Favre B, Guy J, Martin L, Maynadié M, Carillo S, Girodon F. Calreticulin Mutations in Myeloproliferative Neoplasms : Comparison of Three Diagnostic Methods. *PLoS One*. 2015 Oct 26 ;10(10):e0141010.
- **Sevin M**, Girodon F, Garrido C, de Thonel A. HSP90 and HSP70 : Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators Inflamm*. 2015 ;2015:970242.
- Arlet JB, Ribeil JA, Guillem F, Negre O, Hazoume A, Marcion G, Beuzard Y, Dussiot M, Moura IC, Demarest S, de Beauchêne IC, Belaid-Choucair Z, **Sevin M**, Maciel TT, Auclair C, Leboulch P, Chretien S, Tchertanov L, Baudin-Creuzat V, Seigneuric R, Fontenay M, Garrido C, Hermine O, Courtois G. HSP70 sequestration by free α -globin promotes ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia. *Nature*. 2014 Oct 9;514(7521):242-

✓ Participation aux congrès et prix

Communication orale :

Sevin M, Garrido C, Girodon F, de Thonel A ; HSP27 as a potential new target in myelofibrosis, MPN & MPNr-EuroNet 11th Meeting, Diagnostic of sporadic and hereditary myeloproliferative diseases (Poznań - Pologne, 27-29 Avril, 2016)

Communication internationale sous forme de poster :

Sevin M, Pernet N, Vitte F, Ramla S, Sagot P, Martin L, Villeval JL, Lacout C, Plo I, Garrido C, Girodon F and de Thonel A ; HSP27: A Therapeutic Target in Myelofibrosis, 58th ASH Annual Meeting & Exposition (San Diego - USA, 3-6 Décembre, 2016)

Prix de l'abstract: Prize of American Society of Hematology, **ASH Abstract Achievement Award** (San Diego - USA, 3-6 Décembre, 2016)

La myélofibrose (MF) est la plus agressive des néoplasies myéloprolifératives (NMP). Elle porte à elle seule le plus mauvais pronostic pour les patients puisqu'elle s'accompagne d'une fibrose de la moelle osseuse évoluant vers une insuffisance médullaire. Les inhibiteurs de la kinase JAK2 ont apporté de nouveaux espoirs pour le traitement des NMP mais leurs effets ont été essentiellement bénéfiques sur les symptômes et non sur la fibrose elle-même ni sur le cours de la maladie. Plus récemment, la protéine de choc thermique 90 (HSP90) - connue pour stabiliser JAK2 - est apparue comme une cible thérapeutique prometteuse pour les NMP. Cependant, les inhibiteurs de la HSP90 ont montré une toxicité importante accompagnée d'une expression compensatoire des HSPs inductibles (i.e HSP70, HSP27), connues pour favoriser l'émergence de phénomène de résistance. Par ailleurs, des études ont montré que HSP27 était fortement exprimée chez les patients présentant une fibrose pulmonaire idiopathique ou rénale montrant l'importance de HSP27 dans les processus fibrotiques. Sur la base de l'ensemble de ces données, nous avons évalué d'une part l'efficacité chez l'animal d'un oligonucléotide inhibiteur spécifique de HSP27 appelé OGX-427 (en essai clinique dans plusieurs cancers). D'autre part, nous avons déterminé le niveau d'expression intra- et extracellulaire de HSP27 chez des patients atteints de MF. L'effet de l'OGX-427 a été évalué dans deux modèles murins de myélofibrose, laquelle est induite soit par la sécrétion excessive de thrombopoïétine (TPO^{high}) soit par la mutation *JAKV617F*. Nous avons mis en évidence dans les souris traitées par l'OGX-427, une réduction de la taille de la rate, de la prolifération mégacaryocytaire et de l'hématopoïèse extramédullaire par rapport aux souris contrôles, révélant ainsi un effet bénéfique de l'inhibition de HSP27 sur la progression de la maladie. De toutes récentes observations complémentaires à ce travail ont également montré une diminution de la fibrose réticulinique dans la moelle osseuse de souris *JAKV617F*. Au niveau moléculaire, nous démontrons que l'effet prolifératif induit par la voie de signalisation exacerbée - JAK2/STAT5 - est régulé par HSP27 *via* des interactions directes. Pour finir, nous avons détecté une augmentation de l'expression de HSP27 aussi bien dans les progéniteurs circulants CD34⁺ que dans le sérum des patients atteints de NMP avec MF. Ce travail révèle pour la première fois le rôle intra et extracellulaire de HSP27 dans la physiopathologie de la MF et le bénéfice thérapeutique potentiel de l'utilisation des inhibiteurs de HSP27 dans cette maladie.

Mots clés : Myélofibrose, protéines de choc thermique, HSP27, thérapie

Myelofibrosis (MF) is the most aggressive myeloproliferative neoplasms (MPN) with the highest degree of morbidity and mortality, including progressive bone marrow fibrosis resulting into bone marrow failure. JAK2 kinase inhibitors have been successfully used for a few years in MPN and more particularly for MF treatment. Nevertheless, their beneficial effects are mainly restricted on symptoms and not on the course of the disease. Recently, heat shock protein 90 (HSP90) - known to stabilize JAK2 - has been reported as a promising therapeutic target in MPN. However HSP90 inhibitors show toxicity and induce the expression of stress-inducible proteins such as HSP70 and, most likely HSP27 as previously shown in other cancers. In addition, we and others have shown that HSP27, was strongly expressed in patients with idiopathic pulmonary or kidney tubulointerstitial fibrosis, underlying a relevant role of HSP27 in fibrotic processes. Taking into account both the beneficial effects of HSP inhibitors in leukemia and in MPN, and the possible implication of HSP27 in fibrosis, we have evaluated here the status of HSP27 in MF patient's samples and assess the effectiveness of an HSP27 oligonucleotide inhibitor called OGX-427 in murine models. We report here the effect of OGX-427 in two murine models of thrombopoietin- and *JAKV617F*-induced myelofibrosis. OGX-427 limited the progression of the disease associated with a reduction of spleen weight and of megakaryocytic expansion. And more recently, our additional results show a decrease of reticulin fibrosis in *JAK2V617F*'s bone marrow. We show that HSP27 regulates JAK2/STAT5 proliferative effect through direct interactions, and we report an increase expression of HSP27 both in CD34⁺ circulating progenitors and in the serum of patients with NMP with fibrosis. Taking altogether, this work supports that extra and intracellular HSP27 plays a key role of in the pathophysiology in MF and highlight the potential therapeutic benefit of HSP27 inhibitors in this disorder.

Keys words: Myelofibrosis, heat shock protein, HSP27, therapy