

UNIVERSITE DE LILLE – NORD DE FRANCE

Ecole Doctorale « Biologie Santé »

THESE DE DOCTORAT

Biologie Moléculaire et Cellulaire
-Spécialité Génétique-

Présentée par **Mélanie LAMBERT**

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE-NORD DE FRANCE



Etude de l'inhibition fonctionnelle
du facteur de transcription HOXA9 par des ligands de l'ADN
dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes.



Soutenue le 23 mars 2018

Devant le jury composé de :

Pr Bruno QUESNEL

Président du Jury

Dr Dominique PAYET-BORNET

Rapporteur

Dr Isabelle PLO-AVEZEDO

Rapporteur

Dr Marie-Hélène DAVID-CORDONNIER

Directeur de thèse

Dr Nicolas JONCKHEERE

Membre invité

CONFIDENTIEL

**Etude de l'inhibition fonctionnelle du facteur de
transcription HOXA9 par des ligands de l'ADN
dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes.**

RÉSUMÉ

Le traitement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) repose encore principalement sur la chimiothérapie conventionnelle alliant aracytine (AraC) et dérivé d'anthracycline conduisant à environ 30% de guérison chez les patients de 65 ans et plus. Ce mauvais pronostic est essentiellement lié aux fréquentes rechutes, souvent chimiorésistantes, et au peu de thérapies ciblées en clinique. Seuls certains sous-types de LAM bénéficient de nouveaux traitements ciblés (Midostaurin, Mylotarg, Enasidenib). HOXA9 est un facteur de transcription surexprimé dans environ 70% des LAM de différents sous-types moléculaires et cytogénétiques, et associé à un mauvais pronostic. Malgré son implication dans une grande majorité des LAM, HOXA9 n'est pas encore ciblé en clinique. La propension leucémique d'HOXA9 est associée à son activité de liaison à l'ADN essentielle à l'induction du blocage de la différenciation et au maintien de l'auto-renouvellement des cellules leucémiques. Nous avons sélectionné des ligands de l'ADN, les composés DB818 et DB1055 comme inhibiteurs compétitifs pour la liaison à l'ADN d'HOXA9. Ces composés ont été évalués en comparaison à l'inactivation d'HOXA9 par ARN interférent et ont montré une modulation commune de l'expression globale des gènes, une diminution de la prolifération cellulaire, une induction de la mort et de la différenciation. De plus, le composé DB1055 a démontré *in vivo* des activités anti-leucémiques sur lignées de LAM humaines et sur blastes issus de patients LAM injectés dans des souris immunodéficientes. Ces résultats montrent que l'inhibition de la liaison directe d'HOXA9/ADN représente une nouvelle stratégie thérapeutique de différenciation pour le traitement des leucémies aiguës myéloïdes exprimant HOXA9.

Mots clefs : Leucémies aiguës myéloïdes, thérapie ciblée, facteur de transcription, différenciation.

ABSTRACT

Demonstration of the leukemogenic effects of the HOXA9 transcription factor and validation of its inhibition by DNA ligands.

The treatment of acute myeloid leukemia (AML) is still mainly based on conventional chemotherapies associating aracytine (AraC) with an anthracycline derivative for 30% cures for patients under 65 and much lesser beyond. This bad forecast is essentially due to frequent relapses, chemoresistance and very few targeted therapies that were recently approved but only for some AML sub-types (Midostaurin, Mylotarg, Enasidenib). HOXA9 is a transcription factor that is overexpressed in around 70% AML of different FAB and molecular/cytogenetic subtypes with poor prognosis but is not yet targeted in clinic. HOXA9 leukemic propensity is associated with its DNA binding activity that is essential for its induction of differentiation blockade resulting in AML. We selected DB818 and DB1055 DNA ligands as two HOXA9/DNA binding competitors and evaluated them in comparison with HOXA9 knockdown, for cell growth, cell death, cell differentiation and global gene expression. Moreover, we showed that DB1055 proved potent in vivo anti-leukemic activities against human AML cell lines as well as patient-derived xenografted in NSG immunodeficient mice. These results first evidenced that inhibiting direct HOXA9 function at the DNA binding level could represent a new differentiation therapy for treatment of HOXA9-expressing AML.

Keys words: Acute myeloid leukemia, targeted therapy, transcription factor, differentiation

« Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »

Leonard de vinci

REMERCIEMENTS

Ma reconnaissance va en premier lieu au Dr Marie-Hélène David-Cordonnier. Travailler avec elle a été une expérience enrichissante aussi bien dans le travail qu'humainement. Elle a dirigé les recherches en me permettant de développer autonomie et rigueur scientifique. J'ai énormément appris et je lui en suis très reconnaissante.

Je remercie les membres du jury,

Tout d'abord, le Professeur Bruno Quesnel, directeur de l'équipe, et le Docteur Nicolas Jonckheere, qui m'ont soutenus et ont suivi mes travaux de thèse tout au long de ces années.

Je remercie le Docteur Dominique Payet-Bornet et le Docteur Isabelle Plo-Avezedo qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail de recherche.

Je tiens à remercier le Professeur Pierre Formstecher, pour son accueil à mon arrivée dans le Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert mais surtout je le remercie de son soutien.

Je remercie l'ensemble des membres du groupe, les anciens, les présents mais aussi ceux de passage, merci à vous Sabine, Raja, Amine, Diane, Alison, Remco, Amandine, Elise ... pour votre soutien et votre précieuse aide. Je remercie particulièrement Samy, merci pour ton soutien, pour ton aide mais surtout pour ton amitié, je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse de sciences et pour la suite de ta carrière.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe, les anciens, les présents, pour leur gentillesse, leur écoute et leur soutien. Je souhaite particulièrement aux futurs docteurs Julie et Alexia, le meilleur qu'il soit dans leur vie professionnelle et personnelle et je les remercie de leur aide et de leur amitié pendant toutes ces années.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de l'Institut pour la Recherche sur le cancer de Lille (IRCL) pour leur gentillesse et leur dévouement nous permettant de travailler dans un environnement particulièrement chaleureux. Je remercie également l'Université de Lille et la société Française d'hématologie pour l'aide financière apportée.

Je remercie Nathalie Jouy pour son aide, sa gentillesse et sa disponibilité à toute épreuve. Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du plateau de cytométrie et de l'animalerie nous permettant de travailler dans d'aussi bonnes conditions.

Merci au Docteur Samuel Meignan pour son aide, ses précieux conseils, son écoute et son soutien. Je remercie également Christine, Nicole, Mélanie. Bien plus qu'un soutien vous êtes de véritables amies. Je souhaite à Quentin le meilleur pour sa thèse qui j'en suis certaine ne pourra être qu'exceptionnelle.

Je remercie le Professeur Dominique Collard et l'ensemble de son équipe Catagay, Ueno, Grégoire, pour votre gentillesse et votre aide.

Je remercie mes collègues enseignants de travaux pratiques et dirigés de la faculté de pharmacie pour leur accueil, Claude, Barbara, Yasmine, Benoît, l'enseignement fût une expérience formidable à vos côtés.

Je n'en serai pas là sans vous... c'est pourquoi je vous dédie ce travail. Je remercie ma grand-mère pour toute la force qu'elle m'a tant donnée, merci Maman, dont le courage est inégalable, merci à vous Geoffrey et Véronique pour tout votre soutien et votre aide, merci à toi Emeline, tu m'as portée jusqu'ici... Je n'oublie pas min conducteur personnel ed'bio frère! Merci à mes trésors d'avoir embelli ma vie mon grand Kévin, je suis tellement fière de toi, ma princesse Manon, mon petit cœur Armand et ma belle petite Constance.

Enfin je remercie mon tout jeune Docteur, Simon, toutes ces années d'étude ensemble, nous y sommes tous les deux, main dans la main, tu as toujours cru en moi. Ett nytt liv börjar!

A tous un grand merci.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	9
AVANT-PROPOS	10
<u>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</u>	11
<i>I) Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), un besoin d'avancée thérapeutique</i>	12
<u>I.I) Généralités</u>	12
I.I.A) Découverte historique des leucémies aiguës myéloïdes	13
I.I.B) Définition générale et présentation clinique	14
I.I.C) Epidémiologie et facteurs pronostics	15
<u>I.II) Etiologie des leucémies aiguës myéloïdes</u>	18
I.II.A) Leucémogénèse	18
I.II.B) Facteurs environnementaux	20
I.II.C) Evolution d'hémopathies chroniques en LAM	20
I.II.D) Facteurs génétiques constitutionnels	20
I.II.E) Altérations géniques et classification des LAM	22
I.II.E.1) Classification des leucémies aiguës myéloïdes	23
I.II.E.2) Anomalies chromosomiques et mutations génétiques	25
<u>I.III) Traitements des leucémies aiguës myéloïdes</u>	33
I.III.A) Chimiothérapie d'induction et traitement post-rémission	33
I.III.B) Lever le blocage de la différenciation : la révolution du traitement des leucémies aiguës promyélocyaires.	35
I.III.C) Nouvelles thérapies ciblées	38
I.III.C.1) Ciblage d'effecteurs oncogéniques mutés	39
I.III.C.2) Immunothérapies, réveil du système immunitaire	40
I.III.C.3) Ciblage d'effecteurs de désordres métaboliques et de grandes voies cellulaires	43
<i>II) HOXA9, cible thérapeutique des leucémies aiguës myéloïdes</i>	47
<u>II.I) Rôles physiologiques d'HOXA9</u>	48
II.I.A) Structure du gène <i>HOXA9</i>	48
II.I.B) Interactions avec ses cofacteurs	50
II.I.B.1) PBX	50
II.I.B.2) MEIS1	51
II.I.C) Le contrôle physiologique de l'expression des gènes <i>HOX</i>	52
II.I.C.1) 1 ^{ère} vague de contrôle de l'expression des gènes <i>HOX</i> : mise en place du profil d'expression	52
II.I.C.2) 2 ^{ème} vague de contrôle de l'expression des gènes <i>HOX</i> : maintien du profil d'expression	54
II.I.D) Régulation de la protéine HOXA9	56
II.I.D.1) Modifications post-traductionnelles	57
II.I.D.2) Modification de sa localisation cellulaire	57
II.I.E) Rôle physiologique des gènes <i>HOX</i>	57
II.I.E.1) Rôle dans le développement embryonnaire et le renouvellement tissulaire	57
II.I.E.2) Rôle des gènes <i>HOX</i> au cours de l'hématopoïèse	58

<u>II.II) HOXA9, un facteur de transcription oncogène</u>	59
II.II.A) HOXA9 un oncogène leucémique	59
II.II.A.1) Anomalies associées à la surexpression d' <i>HOXA9</i>	61
II.II.A.2) HOXA9 régule l'expression de gènes leucémogènes	64
II.II.A.3) Des cofacteurs qui accentuent le développement des leucémies	68
II.II.B) Implication d' <i>HOXA9</i> dans les autres cancers	69
II.II.B.1) Hémopathies malignes	69
II.II.B.2) Cancers solides	69
<u>II.III) Essais de ciblage d'<i>HOXA9</i></u>	70
II.III.A) Ciblage indirect d' <i>HOXA9</i>	70
II.III.B) Ciblage direct d' <i>HOXA9</i>	71
<i>III) Nouvelle stratégie de ciblage du facteur de transcription HOXA9</i>	72
<u>III.I) Stratégies de ciblage de facteurs de transcription par compétition directe de la liaison à l'ADN</u>	72
<u>III.II) Ciblage direct de l'interaction HOXA9/ADN par des composés DB</u>	74
III.II.A) Activité anti- parasitaire	74
III.II.A.1) Développement de molécules pour lutter contre la trypanosomiase africaine	74
III.II.A.2) Mode d'action anti-parasitaire	76
III.II.A.3) Développement clinique	77
III.II.B) De nouveaux modulateurs transcriptionnels	79
III.II.B.1) Relation structure/affinité, structure/activité	79
III.II.B.2) Mode d'action	81
III.II.C) Inhibiteurs de l'interaction HOXA9/ADN	82
III.II.C.1) Sélection <i>in vitro</i> des DB1055 et DB818	82
III.II.C.2) Preuves de concept <i>in cellulo</i>	83
<u>HYPOTHESES ET OBJECTIFS</u>	88
<u>CHAPITRE 2 : RESULTATS</u>	91
<i>PARTIE I. Validation et sélection des modèles d'étude</i>	92
I.I) Choix des modèles cellulaires.	92
I.I.A) Lignées cellulaires	92
I.I.B) Prélèvements de patients LAM.	93
I.II. Invalidation d' <i>HOXA9</i> par shRNA.	94
CONCLUSION PARTIE I	96
<i>PARTIE II. Evaluation transcriptomique de l'inhibition d'<i>HOXA9</i> dans des modèles de LAM.</i>	97
II.I) L'inhibition d' <i>HOXA9</i> , par les traitements au DB1055 ou au DB818 ou par shRNA, module l'expression de gènes cibles d' <i>HOXA9</i> connus dans la littérature.	98
II.II) Inhiber <i>HOXA9</i> entraîne une dérégulation de grandes fonctions cellulaires.	100
II.II.A) Analyse globale avec le logiciel GSEA	100
II.II.B) Analyse globale avec le logiciel IPA (Ingenuity Pathway Analysis)	101
CONCLUSION PARTIE II	110
<i>PARTIE III. Evaluations cellulaires de l'inhibition d'<i>HOXA9</i> dans des modèles de LAM.</i>	111
III.I) Inhiber <i>HOXA9</i> impacte-t-il la prolifération cellulaire ?	111
III.II) Empêcher l'activité d' <i>HOXA9</i> conduit-il à la mort des cellules ?	116

III.III) L'inhibition d'HOXA9 permet-elle de lever le blocage de la différenciation ?	118
CONCLUSION PARTIE III	127
<i>PARTIE IV : Evaluation du composé DB1055 sur des modèles murins implantés de cellules issues de lignées de LAM et sur des modèles de PDX (patient-derived-xenografts)</i>	129
IV.I) Validation de l'impact de l'expression d'HOXA9 dans des modèles murins leucémiques par l'injection de cellules issues de lignées cellulaires.	129
IV.II) Effet anti-leucémique du composé DB1055 sur des modèles murins de lignées de LAM humaines	135
IV.III) Evaluation de l'effet anti-leucémique du composé DB1055 dans des modèles de PDX (patient-derived-xenografts)	137
CONCLUSION PARTIE IV	140
<u>CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	142
■ Face à la multiplicité des anomalies génétiques conduisant au développement de LAM, est-il pertinent de cibler HOXA9 pour le traitement des leucémies aiguës myéloïdes ?	144
■ Le ciblage de l'ADN est-il une stratégie efficace pour le traitement des LAM ?	146
■ Les composés DB818 et DB1055 sont-ils spécifiques et efficaces pour le traitement des LAM ?	148
■ Quel futur thérapeutique pour les composés DB1055 et DB818 ?	153
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	155
<u>MATERIEL ET METHODE</u>	157
<i>I) Composés étudiés</i>	158
<i>II) Biologie moléculaire</i>	158
II.I) Vecteurs plasmidiques	158
I.II) Système lentiviral	159
I.III) Expression génique et protéique	160
I.IV) Analyse transcriptomique	163
<i>III) Biologie cellulaire</i>	164
III.I) Culture cellulaire	164
III.II) Prélèvement de sang ou de moelle osseuse de patients atteints de LAM	165
III.III) Mesure des effets cytotoxiques des composés	165
III.V) Tests clonogéniques	166
III.VI) Cytométrie en flux	166
III.VI) Tests ELISA	168
<i>IV) Expérimentations animales</i>	168
IV.I) Transplantation dans les souris	168
IV.II) Analyse de l'inhibition d'HOXA9	168
IV.III) Traitement au DB1055 et à l'ARAC	169
<i>V) Analyses statistiques</i>	170
<u>REFERENCES</u>	171
<u>ANNEXES</u>	199

LISTE DES ABREVIATIONS

2HG 2hydroxyglutarate	BMI1 RING finger protein 4 (PCGF4)	DNMT3A DNA méthyltransférase 3A
5mc 5-méthylcytosine	BRCA1 breast cancer 1	DOT1L Disrupter of telomeric silencing1
ABCB1 ATP binding cassette subfamilyB member 1	BRD4 Bromodomain-containing protein4	E1A-PBX1 Adenovirus early region 1A-Pre-B-cell leukemia homeobox
ADN acide désoxyribonucléique	BSA Bovine serum albumin	E2F facteur de transcription E2F
AKT protéine kinase B	CAR-T T cells with chimaeric antigen receptor	EGR Early Growth Response
ALDH1A1 aldehyde dehydrogenase 1	CBFB Core-binding factor subunit beta	EMP1 epithelial membrane protein 1
AMM autorisation de mise sur le marché	CCL2/4 Chemokine ligand 2/4	EMSA Electrophoretic mobility shift assay
AraC aracytine	CD3/11b/14/19/33/34/36/38/123 cluster of differentiation	ERG ETS-related gene
ARF1 ADP-ribosylation factor 1	CDK7 Cyclin Dependent Kinase 7	ETV6 ets variant 6
ARN acide ribonucléique	CDX (1/4) caudal type homeobox	ETS E26 transformation-specific
ARNnc acide ribonucléique non codant	CEBPA CCAAT/enhancer-binding protein alpha	EVI1 ecotropic virus integration site 1
APAF1 apoptotic peptidase activating factor 1	CFU Colony-Forming-Unit	EZH2 enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit,
ASB2 ankyrin repeat and SOCS box protein 2	CHEK2 Checkpoint kinase 2	FAB classification franco-américano-britannique
ASH2L absent-Small-Homeotic-2-like Protein	ChIP Immunoprécipitation de la chromatine	FDA Food and Drug Administration
ASXL1 additional Sex Combs Like 1	ChIP-on-ChIP Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip	FDR false discovery rate
ATO trioxyde d'arsenic	ChIP-seq Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing	FGF fibroblast growth factor
ATRA acide <i>tout-trans</i> rétinolique	CLL1 C-type lectin-like molecule-1	FLT3 Fms-like tyrosine kinase 3
ATU autorisation temporaire d'utilisation	CREB1 CAMP Responsive Element Binding Protein 1	FRANCIM France Cancer Incidence et Mortalité
BAK Bcl-2 homologous antagonist/killer	CREBBP CREB Binding Protein	GATA-1/2 GATA Binding Protein 1/2
BAX protéine Bcl-2-associated X	CSF2 Colony Stimulating Factor 2	GEP Gene expression profile
BCL-2 B-cell lymphoma 2	CSH cellule souche hématopoïétique	GFP Green fluorescent protein
BCR-ABL Breakpoint Cluster Region-Abelson	CSL cellule souche leucémique	GDP Guanosine diphosphate
BET Bromodomain and Extra-Terminal motif	CTCF CTC-Binding Factor	GM-CSF Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
BH3 BCL-2 homology	CTLA-4 Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4	GO gemtuzumab ozogamicine
BID BH3 interacting-domain death agonist	CTSG Cathepsin G	GSEA Gene Set Enrichment Analysis
BIM1 BES1-interacting Myc-like protein 1	CUL-4A cullin-4A	GST Glutathione-S-transferase
BLM Bloom Syndrome RecQ Like Helicase	CYBB cytochrome b beta	GTP Guanosine triphosphate
	DKC1 dyskerin pseudouridine synthase 1	HAPT1 high affinity pentamidine transporter 1
		HAT histone acétyltransférase

HAX1 HCLS1-associated protein X-1	LMC leucémies myéloïdes chroniques	NPM1 Nucleophosmin 1
HD homéodomaine	LMO2 LIM domain only 2	NPM1-ALK Nucleophosmin 1-Anaplastic lymphoma kinase
HDAC histone désacétylase	LPS lipopolysaccharide	NPM1-MLF1 Nucleophosmin 1-myeloid/ myelodysplastic leukemia factor1
HIF1/2α hypoxia inducible factor	LSD1 histone lysine-specific demethylase1	NPM-RARA Nucleophosmin 1-Retinoic acid receptor alpha
HMT histone méthyltransférase	MAFB MAF BZIP Transcription FactorB	NSD1 Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1
HOTAIR HOX transcript antisense intergenic RNA	MAPK mitogen-activated protein kinase	NUP 214/98 Nucleoporin 214/98
HOTTIP HOXA transcript at the distal Tip	MDR MultiDrug Resistance	hOCT1/2 organic cation transporter 1/2
HOX Homeobox protein	MEF2C Myocyte-specific enhancer factor 2C	OMS Organisation Mondiale de la Santé
HOXA9 Homeobox protein Hox-A9	MEIS1 myeloid ectopic insertion site 1	ORL Oto-Rhino- Laryngologie
ID2 inhibitor of DNA binding 2	MENIN multiple endocrine neoplasia type 1	P21/CDN1A cyclin-dependent kinase inhibitor 1
IDH1/2 isocitrate déshydrogénase de type1/2	miRNA micro-ARN	P300/CBP CREB-binding protein
IFNγ Interferon gamma	MKL1 MKL/megakaryoblastic leukemia 1	PBX1/3 Pre-B cell leukemia 1/3
IGF1 insulin-like growth factor-1	MLL Mixed-Lineage Leukemia	PBS Phosphate-buffered saline
IGF1/2R insulin-like growth factor-1/2 receptor	MLL-AF4/9/10/17 Mixed-Lineage Leukemia-ALL-1 fused gene from chromosome 4/9/10/17	PD1 Programmed cell death 1
ITD duplication interne en tandem	MLL-ENL Mixed-Lineage Leukemia - eleven-nineteen-leukemia	PDL1 Programmed death-ligand 1
IL1B interleukin 1 beta	MLL-PTD Mixed-Lineage Leukemia - partial tandem duplication	PDGFR Platelet-derived growth factor receptor
IL-3/5/6/8 interleukin 3/5/6/8	MPO Myeloperoxidase	PDX patient-derived-xenografts
INK4a/b p16/p15 protein	MRKH Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser	P-gp P-glycoprotéine
IPA Ingenuity Pathway Analysis	mTOR mechanistic target of rapamycin	PI3K phosphoinositide 3-kinase
IRF1/8 Interferon regulatory factor1/8	MTSS1 metastasis suppressor-1	PID PBX interacting domain
IRX3 Iroquois-class homeodomain protein 3	MTT mitochondrial tetrazolium test	PIM1 Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
JAK2 janus kinase 2	MYH11 Myosin Heavy Chain 11	PKNOX1 PBX/Knotted 1 Homeobox 1
KCNA3 Kv1.3 potassium channel	MYST3 MOZ, YBFR2, SAS2, TIP60 family of histone acetyltransferases	PLK1 polo-like kinase 1
KIT Mast/stem cell growth factor receptor (SCFR)	NADP nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	PMA Phorbol-12-myristate-acétate
KMT2A lysine N-méthyltransférase 2A	NES normalized enrichment score	PML Promyelocytic Leukemia
LA leucémies aiguës	NF1 neurofibromin 1	PLZF-RARA promyelocyte leukemia zinc finger- Retinoic acid receptor alpha
LAL leucémies aiguës lymphoïdes	NFκB nuclear factor-kappa B	PRC1/2 Polycomb Repressor 1/2
LAM leucémies aiguës myéloïdes	NGS Next Generation Sequencing	P-TEFb Positive Transcription Elongation Factor b
LAP leucémies aiguës promyélocyaires		H Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
LAPT1 low affinity pentamidine transporter 1		

RAC1 Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	SET su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax	TALE Three Amino Acid Loop Extension
RAR Retinoic acid receptor	shRNA short hairpin RNA	TCR T cell receptor
RARE Retinoic Acid Response Element	SLC7A7 Solute carrier family 7 member7	TERC Telomerase RNA component
RARA Retinoic acid receptor alpha	SMAD4 Mothers against decapentaplegic homolog 4	TET2 Ten eleven translocation 2
RAS Family of retrovirus-associated DNA sequences	SMD syndromes myéodysplasiques	TGFB Transforming growth factor beta
RBM15 RNA binding motif protein 15	SMP syndromes myéoprolifératifs	TLE transducin-like Enhancer of split
RBBP5 Retinoblastoma-Binding Protein5	SOX4 SRY-Box 4	TLR (4/9) Toll-like receptor 4/9
RHD Runt Homology Domain	SPR surface plasmon resonance	TNFα Tumor necrosis factor alpha
RUNX1/3 Runt Related Transcription Factor 1	STAT5 signal transducer and activator of transcription 5	TREM1 Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
SBDS ribosome maturation factor	SYK Spleen associated Tyrosine Kinase	WASP Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
SCF stem cell factor	P53 Tumor Protein of 53 kDa	WDR5 WD repeat-containing protein 5
SEPT7 Septin 7	TAD1 tRNA-specific adenosine deaminase 1	WNT (4) wingless (wg) and integration-1(int)
SEC super elongation complex		WT1 Wilms' Tumor

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Les leucémies aiguës myéloïdes : blocage de la différenciation et prolifération accrue des cellules progénitrices leucémiques. *Page 13*
- Figure 2 :** Envahissement blastique de la moelle osseuse. *Page 14*
- Figure 3 :** Survie nette, en France, en fonction de l'âge des patients atteints de LAM entre 1989 et 2007. *Page 16*
- Figure 4 :** Vue panoramique des anomalies génétiques conduisant au développement de LAM. *Page 23*
- Figure 5 :** Coopération des anomalies génétiques conduisant au développement des LAM. *Page 26*
- Figure 6 :** Implication de PML-RARA. *Page 37*
- Figure 7 :** Nouvelles thérapies ciblées pour le traitement des LAM. *Page 46*
- Figure 8 :** Organisation des gènes homéotiques et patron de leur expression chez la drosophile et l'Homme. *Page 48*
- Figure 9 :** Représentation schématique des ARN et des protéines HOXA9 et HOXA9T. *Page 49*
- Figure 10 :** Interaction des protéines HOX avec l'ADN. *Page 50*
- Figure 11 :** Liaison à l'ADN du complexe HOXA-PBX1. *Page 51*
- Figure 12 :** Première vague de contrôle de l'expression des gènes *HOX*. *Page 53*
- Figure 13 :** Deuxième vague de contrôle de l'expression des gènes *HOX*. *Page 56*
- Figure 14 :** Régulation de l'hématopoïèse par les facteurs HOX. *Page 59*
- Figure 15 :** Régulation d'*HOXA9* dans l'hématopoïèse normale *versus* LAM. *Page 60*
- Figure 16 :** Régulation de l'expression d'*HOXA9* par le complexe MLL réarrangé dans l'hématopoïèse normale *versus* dans les leucémies aiguës myéloïdes. *Page 62*
- Figure 17 :** Hypothèses de régulation de l'expression d'*HOXA9* dans les LAM associées aux dérégulations de NPM1. *Page 63*
- Figure 18 :** Implication de la protéine NUP98-HOX dans les LAM. *Page 64*
- Figure 19 :** Accélération de l'induction de la leucémie *in vivo* par la co-expression d'*HOXA9* et de ses cofacteurs PBX3 et MEIS1. *Page 68*
- Figure 20 :** Essais de ciblage du facteur de transcription HOXA9 de manière indirecte ou directe. *Page 71*
- Figure 21 :** La trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil. *Page 75*
- Figure 22 :** Structure des composés administrés pour le traitement de la maladie du sommeil. *Page 76*
- Figure 23 :** Détection par microscopie de fluorescence à différents temps de la localisation du DB75 et du DB820 dans le parasite *Trypanosoma brucei* après injection intra-veineuse des composés dans des souris infectées. *Page 77*
- Figure 24 :** Bioconversion du DB289 en DB75 chez le rat et le singe. *Page 78*
- Figure 25 :** Structure des composés DB820 et DB829 ainsi que leur pro-drogue respectives les DB848 et DB868. *Page 79*
- Figure 26 :** Structures du bérénil, de la pentamidine, du DB75 et des dérivés DB. *Page 80*

Figure 27 : Représentation des sites de liaison du DB293 pour l'inhibition des complexes Pit1/ADN, Brn3/ADN et IRF1/ADN. *Page 82*

Figure 28 : Sélection *in vitro* et validation des inhibiteurs de la liaison à HOXA9/ADN. *Page 84*

Figure 29 : Effet des DB818 et DB1055 sur la viabilité cellulaire et la clonogénicité des lignées cellulaires murines et humaines. *Page 86*

Figure 30 : Implication d'HOXA9 dans les LAM. *Page 88*

Figure 31 : Stratégies d'étude de l'inhibition du facteur de transcription HOXA9. *Page 90*

Figure 32 : Choix des lignées cellulaires pour l'étude de l'inhibition fonctionnelle d'HOXA9 par les composés DB818 et DB1055. *Page 93*

Figure 33 : Evaluation des effets des composés DB1055 et DB818 sur la survie de blastes de patients. *Page 94*

Figure 34 : Validation de l'inactivation par shRNA d'HOXA9 par les shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 sur la lignée THP-1. *Page 95*

Figure 35 : Expression d'HOXA9 évaluée par western-blot dans la lignée THP-1-TYHOXA9. *Page 96*

Figure 36 : Validation de l'inhibition d'HOXA9 par l'analyse GSEA dans la lignée THP-1. *Page 99*

Figure 37 : Impact transcriptionnel de l'inhibition d'HOXA9 par shRNA et par le traitement avec les composés DB818 et DB1055 dans la lignée THP-1. *Page 100*

Figure 38 : Impact de l'inhibition d'HOXA9 sur les voies cellulaires par l'analyse GSEA dans la lignée THP-1. *Page 101*

Figure 39 : Grandes voies cellulaires impactées par l'inhibition d'HOXA9 dans la lignée THP-1. *Page 102*

Figure 40 : Gènes communément dérégulés, suite à l'inhibition d'HOXA9 dans la lignée THP-1, impliqués dans les fonctions cellulaires « Differentiation of cells » et « Activation of cells ». *Page 104*

Figure 41 : Grandes voies canoniques impactées par l'inhibition d'HOXA9 dans la lignée THP-1. *Page 106*

Figure 42 : Etude des régulateurs potentiels impliqués suite à l'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par le traitement au DB818 ou au DB1055 dans la lignée THP-1. *Page 108*

Figure 43 : Conclusion partie II. *Page 110*

Figure 44 : Numération des cellules au cours du temps suite à l'inhibition d'HOXA9. *Page 112*

Figure 45 : Etude de la prolifération cellulaire. *Page 114*

Figure 46 : Etude du cycle cellulaire au cours du temps suite à l'inhibition d'HOXA9. *Page 115*

Figure 47 : Etude de la mort cellulaire par marquage à l'iodure de propidium. *Page 117*

Figure 48 : Etude de la différenciation cellulaire des cellules U937 par l'expression de CD11b à la surface des cellules par cytométrie en flux. *Page 119*

Figure 49 : Etude de la différenciation cellulaire des cellules EOL-1 par l'expression de CD11b à la surface des cellules par cytométrie en flux. *Page 121*

Figure 50 : Etude de la différenciation cellulaire des cellules THP-1 par l'expression des marqueurs CD11b et CD14 à la surface des cellules par cytométrie en flux. *Page 123*

Figure 51 : Etude de la sécrétion de cytokines des cellules THP-1 suite à l'inhibition d'HOXA9 à 48 et 72 h. *Page 126*

Figure 52 : Conclusion partie III. *Page 128*

Figure 53 : Survie des souris injectées de cellules LAM inhibées ou non pour l'expression d'HOXA9. *Page 130*

Figure 54 : Suivi de l'implantation au cours du temps des cellules THP-1 Luciférase shHOXA9. *Page 132*

Figure 55 : Implantation des cellules de lignées LAM transduites pour l'expression du shHOXA9-1F2 ou -1F3 dans la rate et la moelle osseuse de souris NSG. *Page 134*

Figure 56 : Effets anti-leucémiques du composé DB1055 sur les modèles de souris EOL-1 et THP-1. *Page 136*

Figure 57 : Mise en place des modèles de xéno greffe de blastes de patients (*patient-derived-xenograft*), PDX pour le traitement au DB1055 ou à l'AraC. *Page 138*

Figure 58 : Effet du traitement au DB1055 dans des modèles de xéno greffe de blastes de patients (*patient-derived-xenograft*), PDX. *Page 139*

Figure 59 : Conclusion partie IV. *Page 140*

Figure 60 : Conclusion générale. *Page 156*

Figure 61 : Schéma d'administration de traitement des modèles de lignées LAM, de PDX-1 et PDX-2. *Page 170*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau clinique associé aux LAM. *Page 15*

Tableau 2 : Facteurs pronostics des LAM. *Page 17*

Tableau 3 : Origine des LAM dites familiales. *Page 22*

Tableau 4 : Classification FAB. *Page 24*

Tableau 5 : Classification OMS 2016 des LAM. *Page 25*

Tableau 6 : Tableau des gènes cibles d'HOXA9 décrits dans la littérature, fonctions et implications. *Page 66*

Tableau 7 : Genesets issus de l'analyse avec le logiciel GSEA impliquant HOXA9 communément enrichis après inhibition d'HOXA9 par shRNA, traitement au DB1055 ou traitement au DB818. *Page 98*

Tableau 8 : Liste des amorces de RT-qPCR (SYBR®Green et TaqMan®). *Page 162*

Tableau 9 : Listes des anticorps utilisés pour le western blot et la cytométrie en flux. *Page 163*

Tableau 10 : Liste des lignées cellulaires et de leurs caractéristiques. *Page 165*

AVANT-PROPOS

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'UMRS-1172, dans l'équipe du Professeur Bruno Quesnel, qui s'intéresse aux facteurs de persistance des cellules leucémiques et sous la direction du Docteur Marie-Hélène David-Cordonnier dont le groupe étudie les mécanismes d'action moléculaire et cellulaire de nouvelles molécules anti-tumorales ciblant l'ADN en particulier pour le traitement des Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM).

Les LAM sont caractérisées par un arrêt de la différenciation et une prolifération des progéniteurs myéloblastiques devenus malins par acquisition d'anomalies génétiques, dont 70 % sont associées à la surexpression d'HOXA9. Ce facteur de transcription est connu pour son rôle indispensable dans le développement embryonnaire et dans la mise en place de l'hématopoïèse. Sa surexpression est responsable de la régulation d'un programme transcriptionnel oncogénique qui, jusqu'à présent, n'est pas encore clairement élucidé, conduisant au développement des leucémies.

Des stratégies indirectes (ciblant en amont les anomalies conduisant à la surexpression d'HOXA9) ou directes (ciblant l'interaction protéine-protéine d'HOXA9 avec son cofacteur PBX) ont été décrites dans la littérature, mais aucun ciblage direct de l'activité d'HOXA9 n'a jusqu'alors été développé. Aussi, le laboratoire, spécialiste de l'étude de nouvelles molécules anti-tumorales ciblant spécifiquement l'ADN, a sélectionné deux composés compétiteurs de l'interaction d'HOXA9 à l'ADN.

Ce travail de thèse avait pour but d'évaluer au niveau moléculaire, cellulaire et sur modèles animaux les effets des inhibiteurs d'HOXA9 sélectionnés.

CHAPITRE 1 :

INTRODUCTION

D) Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), un besoin d'avancée thérapeutique

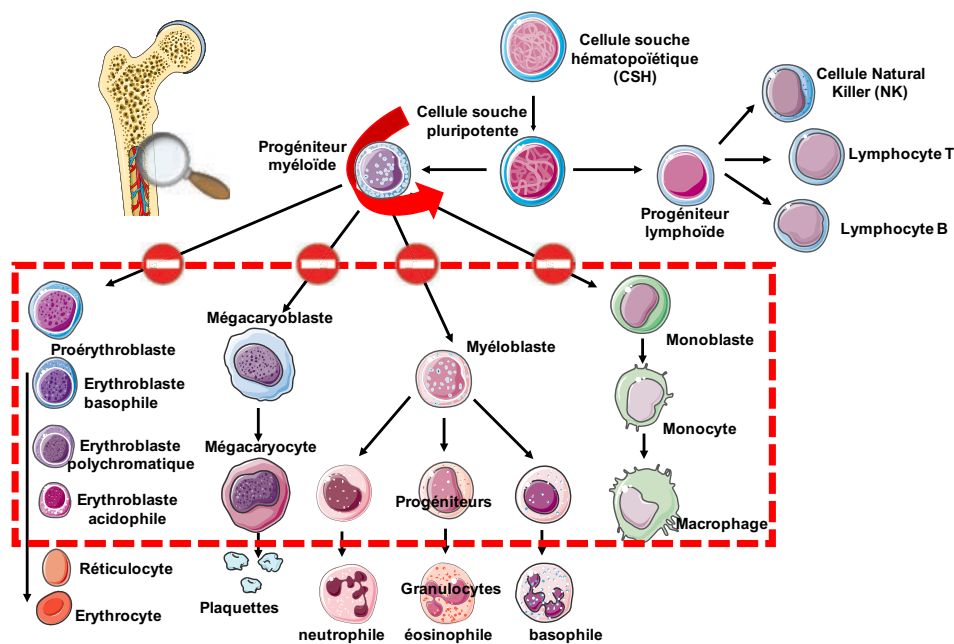
I.I) Généralités

Le terme « hématopoïèse » est issu du grec ἄϊματ[ο]ς [aïmatos] « sang » et ἀντίρ[ο]σις [poiësis] « création ». Il s'agit de l'ensemble des processus participant au maintien de l'homéostasie des cellules sanguines par la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaire programmée (apoptose) permettant la fabrication et le renouvellement continu et contrôlé de toutes les cellules sanguines matures. La durée de vie de ces cellules est limitée : 120 jours pour les érythrocytes, 2 à 10 jours pour les leucocytes et 10 jours pour les thrombocytes. L'hématopoïèse permet la production quotidienne d'environ 800 milliards de cellules différenciées (Douay, 2003).

L'hématopoïèse commence lors du développement fœtal dans le sac vitellin générant les premières cellules erythro-myéloïdes, puis elle continue dans le compartiment intra-embryonnaire appelé splanchnopleure para-aortique (P-Sp), puis l'aorte-gonades-mésonephros (AGM) produit des cellules souches hématopoïétiques multipotentes. Au cours du développement, les CSH colonisent le foie fœtal pour produire l'hématopoïèse définitive. C'est au cinquième mois du développement que la moelle osseuse commence à produire des leucocytes, des plaquettes et plus tardivement des hématies. Chez l'adulte, le renouvellement des lignées sanguines est assuré par une différenciation finement régulée de progéniteurs dans la moelle osseuse (crâne, fémur proximal, vertèbres, bassin et côtes) puis le tissu lymphoïde (thymus, ganglions, rate et autres formations lymphoïdes terminales telles que le foie ou encore les intestins). L'hématopoïèse est assurée par les cellules souches de la moelle osseuse et est régulée par le microenvironnement médullaire (fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales et épithéliales et adipocytes) sécrétant des facteurs de croissance qui permettent l'adhésion des cellules souches à la matrice extracellulaire ainsi produite. La lymphopoïèse (production des cellules lymphoïdes) et la myélopoïèse (production des hématies, polynucléaires, monocytes et plaquettes) nécessitent des étapes de différenciation successives se terminant par la maturation des cellules. La prolifération des lymphocytes T est orchestrée dans les organes lymphoïdes secondaires et leur maturation s'effectue dans le thymus (Zon, 1995).

Les hémopathies sont des pathologies qui impactent la production des érythrocytes, des leucocytes et/ou des thrombocytes, qu'elles soient bénignes ou malignes. Les hémopathies malignes correspondent aux lymphomes (cancers des ganglions ou de la rate),

myélomes (cancers de la moelle osseuse), syndromes myélodysplasiques (SMD) et myéloprolifératifs (SMP) (production anormale des cellules sanguines) et leucémies ou « cancers du sang ». Les leucémies sont caractérisées par la prolifération accrue de blastes indifférenciés affaiblissant le système immunitaire. Les leucémies aiguës (LA) se distinguent des leucémies chroniques par leur rapidité d'évolution. Les LA sont caractérisées selon le type de progéniteurs dont elles proviennent : myéloïde (LAM) ou lymphoïde (LAL) (*Figure 1*). Le caractère agressif des LAM est causé par une aggravation rapide des signes cliniques et biologiques du patient et une évolution fatale en l'absence de traitement efficace.



Leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Figure 1 : Les leucémies aiguës myéloïdes : blocage de la différenciation et prolifération accrue des cellules progénitrices ou précurseurs leucémiques. Le progéniteur myéloïde et les types de cellules sanguines qui en dérivent sont impactés par un blocage de la différenciation.

I.I.A) Découverte historique des leucémies aiguës myéloïdes

La première description d'un cas de leucémie date de 1827 lorsque le médecin Français Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau fit état du cas d'un fleuriste de 63 ans ayant développé une maladie caractérisée par de la fièvre, des faiblesses, des calculs urinaires et une hypertrophie substantielle du foie et de la rate. Il nota que le sang de ce patient avait un aspect granuleux dû aux corpuscules blancs présents. En 1845, Edimbourg-Basé J.H. Bennet décrivit le cas de patients morts pour cause de rates volumineuses. Il avait l'habitude d'employer le terme « leucocythemia » pour décrire cet état pathologique. Mais c'est en 1856 que le

médecin pathologiste allemand, Rudolf Virchow, créa le terme de « Leukämie » (littéralement « sang blanc ») qu'il décrit comme un excès anormal de globules blancs associé aux manifestations cliniques décrites par Velpeau et Bennett (Gaynon *et al.*; Schultz 2008).

En pratiquant l'autopsie d'un patient atteint de leucémie, Ernst Christian Neumann identifia, en 1869, la présence des globules blancs dans la moelle osseuse, du Grec μυελός, [myelos] « moelle ». Cette découverte de la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse conduisit au concept de « leucémie myélogène » et à une classification en trois formes : (1) myélogène pure, (2) splénique ou (3) lymphatique. En 1889, Wilhelm Ebstein différencia les « leucémies aiguës » dont l'évolution est rapide et mortelle des « leucémies myéloïdes chroniques » (LMC). Enfin, c'est en 1900 que Otto Naegeli caractérisa le myéloblaste comme étant la cellule maligne responsable des LAM, ce qui permit de différencier les leucémies «myéloïdes» des leucémies « lymphoïdes » (Gaynon *et al.*; Moticka).

I.I.B) Définition générale et présentation clinique

Les LAM sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes, défini par une prolifération médullaire clonale de précurseurs myéloïdes appelés blastes et par un blocage de leur différenciation. La cellule myéloïde initiatrice acquiert des modifications génétiques qui lui confèrent un avantage prolifératif de survie et entraîne un blocage de sa maturation. Cette prolifération accrue perturbe l'hématopoïèse physiologique et provoque un envahissement de la moelle osseuse, du sang et des tissus périphériques par les blastes (Döhner *et al.* 2015).

Le dysfonctionnement de l'hématopoïèse physiologique peut être dû à un encombrement physique de l'espace médullaire par les blastes en prolifération ou à l'inhibition de la différenciation des progéniteurs normaux (Adimy *et al.* 2008; Beris 2008)

(*Figure 2*).

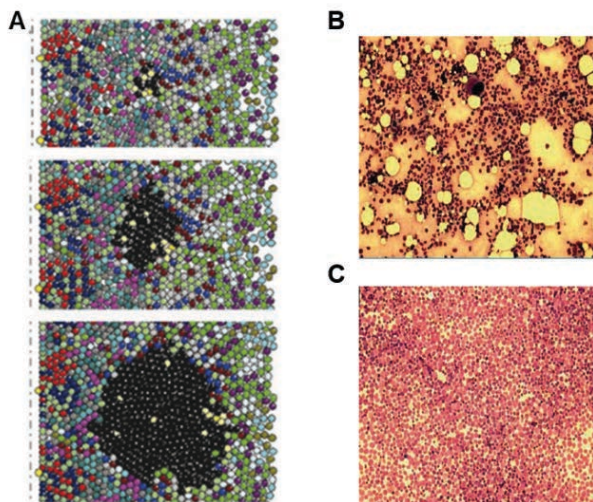


Figure 2 : Envahissement blastique de la moelle osseuse. A. Exemple de propagation de cellules leucémiques (noires) dans la moelle osseuse grâce à un logiciel mathématique. Les cellules souches leucémiques (ici en jaune clair) prolifèrent afin de donner des cellules leucémiques matures qui progressivement envahissent et encombrement l'espace médullaire. Tiré de Adimy *et al.*, 2008. B. Moelle normale avec précurseurs hématopoïétiques et adipocytes. C. Moelle osseuse infiltrée à 100% par des cellules blastiques. Tiré de Beris, 2008.

Les signes cliniques révélateurs sont le plus souvent une fatigue inhabituelle et durable ou une altération inexplicée de l'état général (**Tableau 1**). Un hémogramme révélera des anomalies évocatrices telles que l'anémie, la neutropénie, la thrombopénie ou la présence de blastes circulants. Le diagnostic de LAM repose essentiellement sur un examen de la moelle osseuse appelé myélogramme où une petite quantité de moelle est aspirée au niveau de l'os du bassin ou du sternum. Le myélogramme permet l'analyse visuelle des cellules anormales par coloration et permet d'établir une première gradation de la LAM selon des critères morphologiques. L'analyse cytogénétique du caryotype et l'analyse moléculaire des mutations/amplifications/translocations des gènes seront déterminantes pour le choix du traitement (Löwenberg *et al.* 1999).

Ici sont succinctement répertoriés les éléments du tableau clinique associé aux LAM :

ELEMENTS	CARACTERISTIQUES
L'insuffisance médullaire	Anémie ; infections d'origine ORL ou pulmonaires ; signes hémorragiques (thrombopénie) : purpura cutanéomuqueux, épistaxis, gingivorragies, hémorragies digestives et hémorragies neuroméningées souvent fatales.
Le syndrome tumoral	Hypertrophie des organes hématopoïétiques, avec surtout une splénomégalie, une hépatomégalie, plus rarement des adénopathies ; infiltration cutanée ; atteinte du système nerveux central ou périphérique ; hypertrophie gingivale en particulier dans les LAM à composante monocyttaire.
Les signes cliniques d'extrême gravité	Syndrome hémorragique diffus, leucostase responsable d'une détresse respiratoire ("poumon hyperleucocytaire") ou de complication métabolique (insuffisance rénale par hyperuricémie).

Tableau 1 : Tableau clinique associé aux LAM. Inspiré de Herrera 2015.

I.I.C) Epidémiologie et facteurs pronostics

Les données épidémiologiques sont issues des registres de population qui prennent en compte tous les patients d'une population géographiquement définie, ce qui diffère des essais thérapeutiques où les patients sont inclus selon des critères particuliers d'inclusion. Les données classiques d'épidémiologie descriptive sont l'incidence (nombre de nouveaux cas pour 100 000 habitants par an) et la survie globale (Maynadié & Troussard 2015). Ainsi, selon les données du réseau FRANCIM (*France Cancer Incidence et Mortalité*), les LAM, tous types confondus, ont un taux d'incidence brute de 4,7/100 000 habitants/an en France.

En 2012, 1 470 cas chez les Hommes et 1 514 chez les femmes ont été décrits en France. Par ailleurs, le risque de développer une LAM au cours du temps augmente

indépendamment du sexe (Estey 2007; Klepin & Balducci 2009). Ceci s'observe actuellement dans tous les pays occidentaux (Europe et USA) (Jemal *et al.* 2010).

La survie des LAM a été analysée en France sur la période 1989-2007 (**Figure 3**). La survie brute (patients ayant survécu après le diagnostic) à 5 ans est de 18 % et de 14 % à 10 ans quelque soit le sexe de l'individu. On observe également des différences importantes en fonction de l'âge avec une survie nette (survie observée pour laquelle la seule cause de décès possible serait la maladie) à 5 ans de 48 % entre 15 et 45 ans mais qui n'est plus que de 10 % chez les sujets âgés de 65 à 75 ans. Cela peut s'expliquer par le terrain poly-pathologique des sujets âgés ne permettant pas l'utilisation de thérapeutiques agressives.

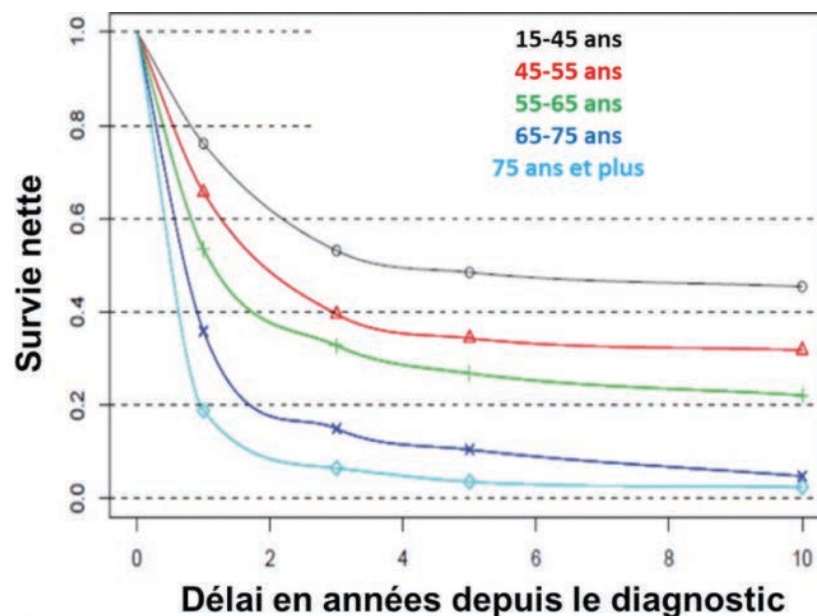


Figure 3 : Survie nette, en France, en fonction de l'âge des patients atteints de Leucémies aiguës myéloïdes entre 1989 et 2007. Modifié de Maynadié & Troussard 2015.

La survie nette varie en fonction de l'âge mais également en fonction d'autres facteurs pronostics répertoriés dans le tableau suivant :

FACTEURS PRONOSTICS	CARACTERISTIQUES
L'âge	Facteur pronostic péjoratif (globalement les patients âgés présentent un plus mauvais pronostic que les patients jeunes). D'autres facteurs liés à l'âge restent à identifier, par exemple, des différences de pharmacocinétique ou de pharmacodynamique des drogues cytotoxiques.
Etat général et comorbidités	La mise en place d'un traitement intensif dépend de l'état général du patient et de la présence ou non de comorbidités.
Leucocytose initiale	L'hyperleucocytose au diagnostic, définie par un taux de leucocytes supérieur à 50 ou 100 g/L, est considérée comme un facteur de mauvais pronostic pour la réponse au traitement, le risque de rechute, et la survie globale. Les hyperleucocytoses supérieures à 100 g/L sont associées à un risque élevé de leucostase avec un risque accru de décès précoce au moment de l'induction en raison de la survenue d'hémorragies cérébrales ou d'une défaillance pulmonaire.
Caractère secondaire	Les LAM dites secondaires à un syndrome myélodysplasique sont généralement de plus mauvais pronostic que les LAM <i>de novo</i> .
Caractère induit par un traitement	Le pronostic des LAM compliquant un traitement antérieur par agents cytotoxiques et/ou par radiothérapie est globalement péjoratif par rapport à celui des LAM <i>de novo</i> .
Dysplasie multi-lignées	Présence d'une dysmyélopoïèse sur plus de 50 % des cellules d'au moins 2 des 3 lignées hématopoïétiques (granulocytaire, érythroïde, et mégacaryocytaire).
Phénotype MDR (MultiDrug Resistance)	Expression à la surface des cellules leucémiques de la P-glycoprotéine (P-gp) ou ABCB1, protéine qui assure l'efflux de différents xénobiotiques, parmi lesquels un grand nombre de cytotoxiques. Le phénotype MDR est déterminé en cytométrie de flux par un test fonctionnel d'efflux.
Marqueurs cytogénétiques	Le caryotype des cellules leucémiques est le facteur pronostic le plus puissant pour la réponse à la chimiothérapie d'induction et la survie.

Tableau 2 : Facteurs pronostics des LAM. Inspiré de Leith *et al.* 1999; Slovak *et al.* 2000; Greenwood *et al.* 2006; Estey 2007; Larson 2007; Borthakur *et al.* 2009; Miesner *et al.* 2010.

I.II) Etiologie des leucémies aiguës myéloïdes

Plusieurs facteurs individuels, génétiques ou environnementaux sont, à l'heure actuelle, identifiés comme favorisant le développement d'une LAM.

I.II.A) Leucémogénèse

La différenciation hématopoïétique répond à une hiérarchie par la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en progéniteurs, précurseurs puis en cellules matures (**Figure 1**). Les greffes de moelle osseuse ont permis de répondre à la question suivante : les différents types de cellules sanguines proviennent-ils de précurseurs distincts ou d'un progéniteur commun ?

Les recherches sur les mécanismes permettant le renouvellement des cellules sanguines se sont développées considérablement suite aux bombardements nucléaires d'Hiroshima et de Nagasaki. Certains survivants du bombardement ou « hibakusha » mouraient quelques temps plus tard à cause des dommages subis par leur système sanguin déplété en leucocytes suite à l'irradiation. Ces victimes ne pouvaient reformer assez rapidement les globules blancs nécessaires pour se défendre des agents infectieux normalement inoffensifs pour un organisme sain. C'est en 1951 qu'Egon Lorenz démontra que l'injection de cellules de moelle osseuse dans une souris irradiée permettait la reconstitution d'une hématopoïèse normale. La même année, Leon Jacobson démontra que la protection, grâce à un tablier de plomb, de la rate d'une souris irradiée à dose létale permettait sa survie en conservant une hématopoïèse efficace (Jacobson *et al.* 1951; Lorenz & Congdon 1954).

Dix années plus tard, deux chercheurs (James Till et Ernest McCulloch de l'Université de Toronto) ont montré l'existence, au sein de la moelle osseuse, de rares cellules fournissant des colonies capables de se différencier en tout type de cellules sanguines (à l'exception des lymphocytes). L'expérience consistait en l'injection par voie intraveineuse à des souris irradiées de cellules de moelle osseuse de souris normale. Quelques jours plus tard, les rates des souris présentaient des boursouflures à leur surface. Till et Mc Culloch émirent l'hypothèse que chaque boursouffure de la rate était une colonie et provenait de l'implantation puis de la prolifération d'une seule cellule de la moelle osseuse greffée. Ces colonies qu'ils appelèrent CFU-S (*colony-forming-unit in the spleen*) étaient composées de cellules des différents lignages érythrocytaires, granulocytaires et mégacaryocytaires. Ils montrèrent

ensuite que l'injection d'une de ces colonies spléniques conduisait à la restauration de l'hématopoïèse d'une souris irradiée. Ces différents travaux ont démontré l'existence d'une population cellulaire médullaire à capacité de pluripotence et d'auto-renouvellement (Till & McCulloch 1961). C'est en 1965 et 1966 que fut mis en évidence de manière indépendante, à partir de suspensions de cellules de moelle osseuse, l'établissement d'une hiérarchie dans le lignage et la présence de facteurs que sont les cytokines assurant la survie, la prolifération et la différenciation de chacune des catégories de cellules (Douarin and Dieterlen-Lièvre, 2008).

Les CSH proviennent des précurseurs mésodermaux embryonnaires appelés hémangioblastes (Lancrin *et al.* 2009). Seule une part minime des CSH est en phase active de prolifération et de différenciation. L'autre partie est en quiescence (phase G0 du cycle cellulaire) expliquant leur relative résistance aux radiations ionisantes et aux agents chimiothérapeutiques, efficaces sur les cellules cyclantes. Deux modèles ont été proposés afin d'expliquer l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH : le modèle dit « de lignage » (on parle de division asymétrique) et le modèle dit de « population » (on parle alors de division symétrique). En provenance directe des CSH, les progéniteurs immatures multipotents présentent, quant à eux, des propriétés de différenciation variables et une prolifération importante (Spradling *et al.* 2001).

Les mécanismes à l'origine de l'engagement d'une cellule souche ou d'un progéniteur dans une des voies de différenciation hématopoïétique ne sont pas encore clairement élucidés. Deux modèles sont à ce jour proposés, le modèle dit « instructif » qui stipule que le micro-environnement médullaire aurait un rôle déterministe par l'action de facteurs de croissance et d'interactions cellulaires ; et le modèle dit « stochastique » qui suppose que ces étapes se déroulent en l'absence de tout signal extérieur, de façon intrinsèque au programme génétique de la cellule (Spradling *et al.* 2001; Wilson & Trumpp 2006).

La population leucémique est hétérogène et composée de cellules dites souches leucémiques (CSL), de cellules leucémiques progénitrices et de blastes en différenciation (Bonnet & Dick 1997; Lane & Gilliland 2010). Ces cellules seraient altérées génétiquement conférant leur capacité proliférative. Des expériences de xénotransplantation de cellules leucémiques chez la souris ont permis de les identifier. En fait, les CSL s'auto-renouvellent et se différencient, tout comme les CSH, par divisions asymétriques et la quiescence d'une partie des CSL explique les nombreuses rechutes observées après rémission consécutive à des traitements chimiothérapeutiques ne ciblant que les cellules cyclantes. Ces cellules initiatrices de leucémie peuvent être des CSL ou des progéniteurs altérés. En 1990, John Dick décrivit

pour la première fois la capacité des CSL (CD34⁺/CD38⁺) à reconstituer une leucémie après plusieurs xélogreffes successives dans un modèle murin. Ces travaux ont également montré que les CSL étaient rares au sein de la population leucémique totale. Les CSL peuvent dériver de la transformation d'une CSH normale ou d'un progéniteur engagé dans la différenciation ayant subi une transformation oncogénique qui a provoqué la réactivation du programme d'auto-renouvellement propre aux CSH (Lapidot *et al.* 1994).

I.II.B) Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans la leucémogénèse (Bowen 2006; Belson *et al.* 2007). Parmi les causes extérieures identifiées comme responsables du développement de LAM se trouvent :

- L'exposition chronique au benzène notamment présent dans la fumée de cigarette ;
- L'exposition aux radiations ionisantes (accidents du travail, bombes nucléaires, traitement par radiothérapie) ;
- Les traitements par chimiothérapies cytotoxiques (agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérase II).

I.II.C) Evolution d'hémopathies chroniques en LAM

Certaines hémopathies dites chroniques peuvent aboutir au développement de LAM. C'est notamment le cas de SMD et de SMP. Dans 2 cas sur 3, une leucémie myéloïde chronique non traitée évolue vers une leucémie aigüe, le plus souvent de type LAM (Shi *et al.* 2004).

I.II.D) Facteurs génétiques constitutionnels

L'apparition familiale de LAM est rare et souvent associée aux altérations des gènes *RUNX1* (*runt related transcription factor 1*) et *CEBPA* (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*). Les mutations germinales de *RUNX1* aboutissent à des troubles plaquettaires avec prédisposition à la transformation maligne myéloïde. Les mutations héréditaires du gène *CEBPA* prédisposent aux LAM (Koeffler & Leong 2017). Les facteurs GATA dont le facteur GATA-2 est également associé aux formes familiales de LAM (Saliba *et al.* 2015, Plo *et al.*, 2016). Des mutations de DDX41 impliqué dans le complexe de régulation du spliceosome ont également été identifiées (Hahn *et al.*, 2011).

Malheureusement, dans la plupart des cas, la cause génétique reste encore obscure et nécessiterait une connaissance des antécédents familiaux (Owen *et al.* 2008). Dans la trisomie 21 (syndrome de Down), l'incidence de LAM est beaucoup plus importante que la normale et semblerait être associée à des mutations du facteur de transcription *GATA-1* (Wechsler *et al.* 2002). D'autres syndromes accroissent la survenue de cancers et en particulier de leucémies aiguës tels que : le syndrome de Bloom, conséquence d'une mutation du gène *BLM* (*bloom syndrome recq like helicase*) modifiant l'interaction des chromosomes les uns avec les autres (Poppe *et al.* 2001) ; le syndrome de Li-Fraumeni causé par une mutation des gènes suppresseurs de tumeur *P53* ou *CHEK2* (*checkpoint kinase 2*) (Ruijs *et al.* 2009) ; le syndrome de Shwachman-Diamond lié à des mutations du gène *SBDS* impliqué dans le métabolisme des ARN et en particulier dans les étapes finales de maturation de la sous-unité 60S (Myers 1993; Warren 2017) ; le syndrome de Wiskott-Aldrich causé par des mutations du gène codant la protéine WASP (*Wiskott-Aldrich syndrom protein*) qui régule la polymérisation de l'actine (Braun *et al.* 2014) ou encore le syndrome de Klinefelter causé par la présence d'une copie supplémentaire du chromosome X chez l'Homme (XXY) (Bchir *et al.* 2016).

D'autres pathologies génétiques favorisent le risque de survenue de LAM telles que l'anémie de Fanconi caractérisée par une insuffisance médullaire ; l'ataxie télangiectasie qui présente un déficit immunitaire sévère ; la neurofibromatose de type 1 définit par l'apparition de tumeurs situées le long des nerfs, appelées neurofibromes ; la dyskératose congénitale qui ressemble à un vieillissement prématuré et est caractérisée par des anomalies de la pigmentation cutanée et d'une leucoplasie buccale ; ou encore le syndrome de Kostmann caractérisé par une neutropénie congénitale sévère (Horwitz 1997) (**Tableau 3**).

ORIGINE	SYNDROMES GENETIQUES	Gène	% AML ou SMD
Syndrômes héréditaires d'aplasie médullaire	Syndrome de Shwachman-Diamond	<i>SDBS</i>	10
	Neutropénie congénitale sévère	<i>ELA2, GFII, HAX1</i>	10
	Thrombocytopénie mégacaryocytaire congénitale	<i>MPL</i>	nd
	Dyskératose congénitale	<i>DKC1, TERC</i>	5
Réparation de l'ADN	Anémie de Fanconi	<i>FANC/BRCA</i>	50
	Syndrome de Bloom	<i>BML</i>	25
Gène suppresseur de tumeur	Syndrome de Li-Fraumeni	<i>P53</i>	7
	Neurofibromatose de type 1	<i>NF1</i>	1<
-	Trisomie 21	-	5
Hémopathies myéloïdes malignes familiales	Troubles plaquettaires	<i>RUNX1</i>	50
	Monosomie 7 associée à CEBPA	<i>CEBPA</i>	nd
	-	<i>GATA-2</i>	
	-	<i>DDX41</i>	

Tableau 3 : Origine des LAM dites familiales. Les leucémies familiales proviennent de syndromes génétiques héréditaires ou non-héréditaires (leucémies familiales « pures »). Inspiré d' Owen *et al.* 2008.

I.II.E) Altérations géniques et classification des LAM

Sauf dans de très rares cas, plusieurs mutations sont nécessaires au développement des LAM. L'événement clef du développement des LAM peut conférer aux CSH ou au progéniteur touché un avantage prolifératif - on parle de mutation de classe I - ou un blocage de la différenciation – on parle alors de nouvelles mutations de classe II. Ainsi, du fait de leur prolifération accrue, les CSH deviennent des CSL incapables de se différencier.

Chaque cellule accumule différentes mutations successives lui conférant des capacités leucémogènes créant des clones distincts, il s'agit de l'hétérogénéité clonale (Jan *et al.* 2012; de Rooij *et al.* 2015). Les gènes altérés sont généralement impliqués dans des voies de signalisation cellulaire ou sont des facteurs de transcription, des suppresseurs de tumeurs, des régulateurs épigénétiques ou encore des acteurs de l'épissage tels que OTT/RBM15 qui est

impliqué dans l'export des ARN messagers vers le cytoplasme ou encore les protéines du nucléopore telle que NUP98 (de Rooij *et al.* 2015) (**Figure 4**).

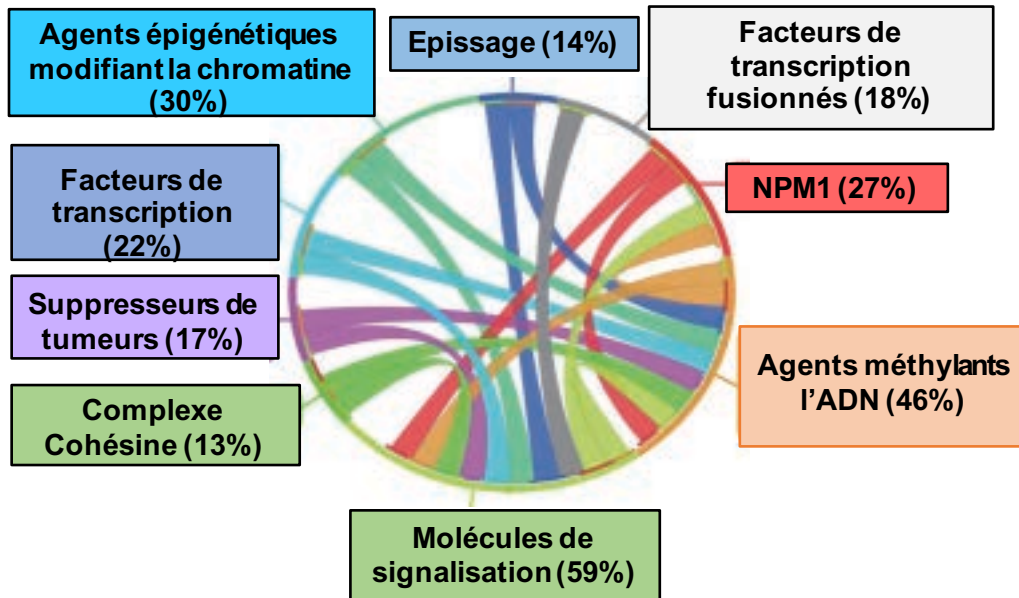


Figure 4 : Vue panoramique des principaux événements génétiques conduisant au développement de LAM. Tiré de Chen *et al.* 2013.

I.II.E.1) Classification des leucémies aiguës myéloïdes

Les LAM sont maintenant classées selon le système de classification de l'OMS (*Organisation Mondiale de la Santé*), plus récent, que le système de classification Franco-Américano-Britannique (FAB) qui reste toutefois utilisé.

I.II.E.1.1) Classification FAB

Au début des années 1970, un groupe international constitué de chercheurs français, américains et britanniques a travaillé sur une classification des leucémies aiguës en compilant des centaines de dossiers médicaux : la classification FAB. Celle-ci classe 3 types de leucémies aiguës lymphoblastiques : L1, L2 et L3 et 7 sous-types de LAM : M1, M2, M3, M4 et M4Eo, M5 et M6. Ont été ajoutés par la suite les sous-types M0 et M7 (**Tableau 4**).

LEUCEMIES AIGUËS MYELOIDES		% LAM	CARACTERISTIQUES
LAM0	LAM différenciation minimale	2%	> 90 % de blastes dans la moelle osseuse ; myéloblastes sans granulations ni corps d'Auer ni positivité pour la MPO.
LAM1	LAM sans maturation	20%	> 90 % de blastes dans la moelle osseuse ; myéloblastes avec quelques granulations, un corps d'Auer, ou les 2.
LAM2	LAM avec maturation	30%	20-90 % de blastes dans la moelle osseuse ; les myéloblastes ont parfois un corps d'Auer volumineux, persistance d'une lignée granulocytaire (rechercher les signes éventuels de dysplasie, ou un excès de granulocytes basophiles).
LAM3	LA dite à promyélocytes	10%	Les blastes (20-100 %) sont souvent hypergranuleux et quelques-uns contiennent des corps d'Auer très nombreux (= fagots). Il existe une forme classique, plutôt leucopénique, et une forme "variante" ou LAM3v, souvent hyperleucocytaire, dont les blastes sont pauvres ou dépourvus de granulations.
LAM4	Leucémie myélomonocytaire aiguë	15%	Ressemble à une LAM2, mais avec monocytose sanguine > 5 G/L ou monocytose médullaire > 20% (ou lysozyme sérique ou urinaire > 3N ; N dans le sérum = 5-15 mg/l).
LAM5	LA monoblastique	15%	Cellules monocytaires > 80 % dans la moelle. Selon la différenciation des blastes monoblastes ou promonocytes / monocytes), on définit les LAM5 peu différenciées (LAM5a) ou différenciées (LAM5b).
LAM6	Erythroleucémie	5%	N'existe plus dans la classification OMS 2016.
LAM7	LA mégacaryocytaire	2%	> 20 % de blastes dans la moelle osseuse, dont au moins la moitié sont des mégacaryoblastes. On observe souvent des micromégacaryocytes plus ou moins différenciés.

Tableau 4 : Classification FAB. Inspiré de Bennett *et al.* 1976.

1.II.E.1.2) Classification de l'OMS

Les critères de l'OMS pour la classification des LAM incluent des données non prises en compte par la classification FAB, telles que les anomalies cytogénétiques. L'accumulation de nouvelles données provenant d'études cliniques et scientifiques a rendu nécessaire la révision des critères. Le développement de technologies performantes, telles que le NGS (*next generation sequencing*) ou le GEP (*gene expression profil*) a permis l'identification de nouveaux biomarqueurs moléculaires spécifiques de pathologies. Ces derniers ont permis d'améliorer les critères diagnostiques et pronostics afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques. L'édition 2016 présentée ci-après est une révision de la classification OMS 2008 (*Tableau 5*).

LEUCEMIES AIGÜES MYELOIDES	CARACTERISTIQUES
LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes	<ul style="list-style-type: none"> t(8;21) (q22;q22) ; <i>RUNX1 - RUNX1T1</i> inv(16) (p13.1q22) ou t(16;16) (p13.1q22) ; <i>CBFB - MYH11</i> t(9;11) (p22;q23) ; <i>MLLT3 - KMT2A (MLL)</i> t(6;9) (p23;q34) ; <i>DEK - NUP214</i> inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; <i>GATA2, MECOM</i> mutation <i>NPM1</i> mutation bi allélique <i>CEBPA</i> <i>BCR-ABL1</i> mutation <i>RUNX1</i> mégacaryoblastique avec t(1;22) (p13;q13) ; <i>RBM15 - MKL1</i> LA promyélocytaire avec <i>PML - RARA</i>
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies	<ul style="list-style-type: none"> Post- SMD ou post-SMP avec anomalie(s) cytogénétique(s) typique de syndrome myélodysplasique
Néoplasies myéloïdes post chimiothérapie	Correspondent soit à une LAM-t soit à un SMD
LAM sans autre spécification par ailleurs (NOS)	<ul style="list-style-type: none"> LA Myéloblastique avec différenciation minime LA Myéloblastique sans maturation LA Myéloblastique avec maturation LA myélomonocytaire LA monoblastique / monocytaire LA érythroïde pure LA mégacaryoblastique LA Myéloblastique à composante basophile LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)
Sarcome granulocytaire	Uniquement les sarcomes myéloïdes <i>de novo</i> sans évidence de maladie médullaire
Associées à la trisomie 21 constitutionnelle	<ul style="list-style-type: none"> Réaction leucémoïde transitoire LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle

Tableau 5 : Classification OMS 2016 des LAM. Inspiré d'Arber *et al.* 2016.

I.II.E.2) Anomalies chromosomiques et mutations génétiques

Au cours des dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans la caractérisation moléculaire des LAM. Les anomalies cytogénétiques et moléculaires sont des facteurs pronostics majeurs et jouent un rôle essentiel dans la prise en charge thérapeutique (Renneville *et al.* 2008). Trois groupes pronostics sont admis : favorable, intermédiaire et défavorable. Les anomalies t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), et t(15;17)(q22;q12) sont unanimement considérées comme des facteurs de bon pronostic. Les caryotypes complexes (\geq à 3 ou 5 anomalies selon les études) sont considérés comme particulièrement défavorables, sauf en présence d'une t(8;21), inv(16)/t(16;16) ou t(15;17). Le groupe de risque cytogénétique intermédiaire, défini par défaut, regroupe toutes les anomalies

cytogénétiques non classées comme favorables ou défavorables, ainsi que les caryotypes normaux, qui représentent environ 45 % de toutes les LAM.

Les événements à l'origine de la leucémogénèse sont classés en deux catégories, les anomalies de classe I conférant un avantage prolifératif et les anomalies dites de classe II touchant des gènes codant des facteurs de transcription ou des co-activateurs transcriptionnels impliqués dans le développement hématopoïétique normal et notamment dans la différenciation et l'auto-renouvellement (*Figure 5*).

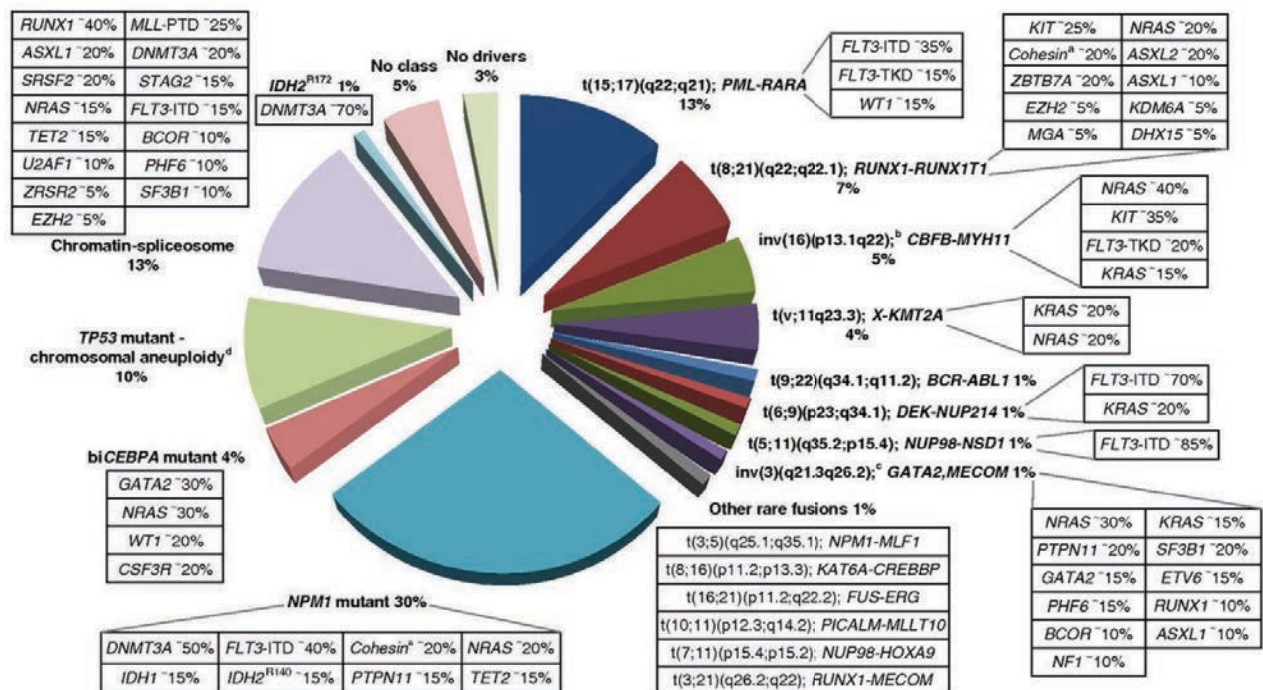


Figure 5 : Coopération des anomalies génétiques conduisant au développement des LAM. Classes moléculaires de l'ensemble des LAM et mutations coopératives associées chez des patients âgés de plus de 65 ans. Tiré de Döhner *et al.* 2017.

La leucémogénèse découlerait de l'accumulation des mutations de classe I et des mutations de classe II. Toutefois, il est parfois difficile d'attribuer les anomalies génétiques survenues à l'une ou l'autre de ces classes. Le nombre d'anomalies génétiques impliquées dans les LAM est important et divers et sont présentées ci-après les plus fréquemment identifiées.

I.II.E.2.1) Anomalies conférant un avantage prolifératif :

- Mutations de *N-RAS* et *K-RAS*

Les gènes de la famille RAS sont des oncogènes codant des protéines ayant la capacité de se lier à de nombreux récepteurs membranaires tels que FLT3 (*fms-like tyrosine kinase 3*) ou KIT. Les protéines RAS ont donc un rôle de régulation des processus de prolifération, différenciation ou d'apoptose. Il existe un équilibre entre la forme active-GTP (*guanosine triphosphate*) et la forme inactive-GDP (*guanosine diphosphate*) de la protéine RAS. Les mutations *N-RAS* et *K-RAS* impactent des gènes codant des protéines constitutivement actives retrouvées dans environ 10 % et 5 % des LAM respectivement. Ces mutations sont fréquemment associées aux LAM avec inv(16) ou inv(3), secondaires, induites ou *de novo* (Beaupre & Kurzrock 1999; Bowen *et al.* 2005; Bacher *et al.* 2006).

- Les mutations de *FLT3*

Le gène *FLT3* se trouve sur le chromosome 13q12 et code un récepteur tyrosine kinase. *FLT3* est exprimé dans les précurseurs myéloïdes et lymphoïdes et son expression décroît au cours de la différenciation. Il existe majoritairement deux types de mutation de *FLT3* : FLT3-ITD (20 à 25 % des LAM) ou FLT3-TKD (5 à 10 % des LAM) (Stirewalt & Radich 2003; Lane & Gilliland 2010). La duplication interne en tandem (ITD) des exons 14 et 15, codant la région juxta-membranaire, est rencontrée chez 25-35 % des adultes et 10-15 % des enfants atteints de LAM. Les mutations ponctuelles faux-sens situées dans l'exon 20, codant la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase (TKD), sont retrouvées dans 5 à 10 % des LAM (Schnittger *et al.* 2002). La présence concomitante d'une mutation FLT3-ITD et FLT3-TKD est possible mais peu fréquente. Les mutations de *FLT3* provoquent une phosphorylation constitutive du récepteur, avec activation des voies de signalisation PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) / AKT (*protéine kinase B*), RAS / MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et JAK2 (*janus kinase 2*) / STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*). Aucune des deux mutations n'est suffisante à elle seule pour induire le développement d'une LAM mais est un facteur associé à une plus forte agressivité de la leucémie. Ces mutations sont associées aux LAM *de novo* (Lee *et al.* 2007; Pratz & Levis 2017).

- Les mutations de *KIT*

Le gène *KIT* se trouve en 4q12 et code, tout comme *FLT3*, un récepteur tyrosine kinase dont le ligand est le SCF (*stem cell factor*). La liaison du SCF provoque la dimérisation du récepteur et sa phosphorylation conduit à l'activation d'une cascade de signalisation impliquée dans la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire. Plusieurs types de mutations peuvent affecter *KIT* : au niveau de la partie extra-cellulaire impliquée dans la dimérisation, au niveau de la partie juxta-membranaire mais aussi au niveau du domaine tyrosine kinase lui-même induisant l'activation constitutive du récepteur. Les mutations du gène *KIT* sont retrouvées dans 2 à 8 % des LAM (Boissan *et al.* 2000; Boissel *et al.* 2006).

I.II.E.2.2) Anomalies génétiques provoquant le blocage de la différenciation

- Anomalies du gène *CEBPA*

Le gène *CEBPA* est localisé en 19q13.1 et code un facteur de transcription essentiel dans la différenciation granulocytaire et monocytaire par la régulation de gènes essentiels tels que *PU.1* ou *c-MYC*. L'ARNm de *CEBPA* permet l'expression de deux isoformes : la pleine longueur de 42 kDa et une forme tronquée de 30 kDa. Cette dernière ne possède pas le domaine de transactivation TAD1 permettant la répression du facteur E2F impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Il existe deux mutations pouvant coexister : l'une en région 5' du gène décalant le cadre de lecture et empêchant l'activité du facteur, et l'autre altérant sa capacité de liaison à l'ADN et/ou sa dimérisation en modifiant son domaine carboxy-terminal. Ces mutations se situent entre les deux ATG initiant la synthèse respective des isoformes p42 et p30 et par conséquent conduisent à l'expression exclusive de l'isoforme p30 à partir de l'allèle affecté. Les mutations du gène *CEBPA* sont retrouvées dans environ 10 % des LAM caractérisées *de novo* (Pabst *et al.* 2001; PreudHomme *et al.* 2002; Taskesen *et al.* 2011; Ohlsson *et al.* 2016).

- Anomalies du gène *RUNX1*

Le gène *RUNX1* (*AML1*, *CBFA2*, *PEBPCβ*) est localisé en 21q22. *RUNX1a* (250 acides aminés), *RUNX1b* (453 acides aminés) et *RUNX1c* (480 acides aminés) ont en commun le domaine RHD (*runt homology domain*) (codé par les exons 3 à 5) mais diffèrent par leur partie C-terminale. La régulation de leurs activités est commune mais elles n'exercent pas les mêmes fonctions. *RUNX1* régule l'expression de nombreux gènes tels que *GM-CSF*,

IL-3 et *MPO* en coopération avec des co-activateurs (p300 / CBP (*CREB-binding protein*)) ou des co-répresseurs (mSin3A, histones desactétylases (HDAC), et TLE). RUNX1 est majoritairement dérégulé dans les LAM *de novo* ou induites par un traitement, par des translocations chromosomiques, des mutations ponctuelles ou des amplifications géniques. La translocation t(8;21)(q22;q22) impliquée dans 5-10 % des LAM est l'altération la plus fréquente. La protéine de fusion RUNX1-ETO (ou AML1-ETO) générée est composée de la partie N-terminale fusionnée avec la majeure partie d'ETO qui est une protéine nucléaire. RUNX1-ETO peut alors entrer en compétition avec la protéine RUNX1 normale et en diminuer l'activité. Elle peut agir comme répresseur ou activateur par le recrutement de partenaires transcriptionnels (Tang *et al.* 2009a; Gaidzik *et al.* 2016).

I.II.E.2.3) Anomalies génétiques impliquées dans le cycle cellulaire ou l'apoptose

- Altérations de *P53*

P53 est un gène suppresseur de tumeur localisé en 17p13 codant un facteur de transcription responsable de l'arrêt du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose. *P53* peut être altéré par délétion ou mutation ponctuelle touchant principalement les exons 4 à 8 et entraînant une perte de sa fonction d'alarme lorsque l'ADN est endommagé en induisant la mort des cellules. Les mutations de *P53* sont peu fréquentes dans les LAM mais elles sont associées à un pronostic défavorable et coopèrent avec d'autres mutations telles que celles impactant *N-RAS* (Vainchenker & Plo 2017). Puisque *P53* est impliquée dans le maintien de la stabilité des chromosomes, son altération pourrait être un événement primaire de la dérégulation de l'intégrité de l'ensemble du génome conduisant à une forme sévère de LAM. Les mutations du gène *P53* sont retrouvées dans environ 10 % des LAM secondaires ou induites par un traitement (Peller & Rotter 2003; Rucker *et al.* 2012; Quintás-Cardama *et al.* 2017).

- Mutations de *NPM1*

Le gène *NPM1* (*nucleophosmin 1*), localisé en 5q35, est constitué de 12 exons et code une protéine chaperonne de 294 acides aminés. La région N-terminale contient une séquence de signal d'export nucléaire, 5 séquences d'oligomérisation lui permettant de former des pentamères et des séquences de liaison à d'autres protéines. La région C-terminale permet à *NPM1* de s'associer à des structures nucléolaires en se liant préférentiellement aux acides

nucléiques formant le G-quadruplex. NPM1 est ainsi impliqué dans la biogenèse des ribosomes, le transport de petites protéines vers le nucléole et dans le contrôle de l'activité de P53 de par son interaction (Box *et al.* 2016).

La translocation t(2;5)(p23;q35) conduit à la fusion NPM1-ALK, la translocation t(3;5)(q25;q34-q35) aboutit à la fusion NPM1-MLF1 et la translocation t(5;17)(q35;q21) crée la fusion NPM1-RARA. Ces translocations ont lieu au niveau de l'exon 12 qui correspond à la région protéique C-terminale, créant une nouvelle séquence de signal d'export nucléaire. Ainsi, ces réarrangements favorisent l'exportation nucléaire et par conséquent une délocalisation de la protéine NPM1 vers le cytoplasme qui dès lors ne peut plus exercer ses fonctions normales pour le transport nucléo-cytoplasmique. Les mutations de *NPM1* sont retrouvées dans 20 à 30 % des cas de LAM, caractérisées *de novo*, et en font un des gènes les plus communément mutés dans les LAM (Colombo *et al.* 2002; Döhner *et al.* 2005; Verhaak *et al.* 2005; Becker *et al.* 2010; Heath *et al.* 2017).

- Altérations de *WT1*

Le gène *WT1* (*Wilms' Tumor 1*) est localisé en 11p13 et code un facteur de transcription à doigts de zinc appartenant à la famille EGR (Early Growth Response) conduisant à 24 isoformes différentes. Dans les cellules hématopoïétiques, *WT1* permettrait l'induction de la différenciation ou la quiescence des progéniteurs multipotents selon leur stade cellulaire. Les mutations de *WT1* sont généralement des insertions/délétions entraînant une diminution, voire à une perte de fonction totale du gène. La mutation de *WT1* qui est présente dans 10 à 15 % des cas de LAM serait en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur de ce gène. Cependant, d'autres arguments sont en faveur d'un rôle oncogénique de *WT1*, notamment sa surexpression au diagnostic. Bien que le doute persiste quant à son rôle, la quantification de son expression est désormais courante pour l'évaluation de la maladie résiduelle (Renneville *et al.* 2008).

I.II.E.2.4) Anomalies génétiques impliquées dans la régulation épigénétique

- Anomalies de *MLL*

Le gène *MLL* (*mixed lineage leukemia*) (11q23) contient 36 exons et code une histone méthyl-transférase qui joue un rôle clef dans la régulation épigénétique de l'hématopoïèse. La protéine *MLL* participe à la formation de complexes épigénétiques orchestrant l'expression de gènes nécessaires au cours du développement et de la différenciation des tissus. Le gène *MLL*

contrôle notamment la régulation de l'expression des gènes *HOX* (*HOXA4*, *A5*, *A7*, *A9* et *A10*) et *MEIS1* (Kawagoe *et al.* 1999).

Plus de 100 translocations ont été décrites et il existe plus de 70 gènes partenaires de *MLL* dont *AF4* (*ALL-1 fused gene from chromosome 4*), *AF6*, *AF9*, *AF10*, *AF17* et *ENL* (*eleven-nineteen-leukemia*). *MLL* peut être également dupliqué en tandem partiel (PTD) consistant en des répétitions de plusieurs exons de *MLL*. Les translocations MLL-PTD sont retrouvées dans 5 à 10 % des LAM (secondaires, induites ou *de novo*) (Armstrong *et al.* 2002; Krivtsov *et al.* 2006).

Les protéines de fusion générées ne possèdent plus de domaine SET (*su(var)3-9*, *enhancer of zeste trithorax*) qui porte l'activité histone méthyl-transférase (HMT) mais conservent l'extrémité N-terminale permettant l'interaction avec les nucléosomes. Elles perdent également leur bromodomaine / PHD, domaine d'interaction avec ASB2 (*ankyrin repeat and SOCS box protein 2*) permettant la dégradation de la protéine par ubiquitinylation. Les partenaires de fusion les plus fréquents appartiennent au complexe de super-élongation SEC (*super elongation complex*) qui permet d'activer l'élongation transcriptionnelle (Muntean *et al.* 2010; Muntean & Hess 2012). Les protéines de fusion recrutées sur les gènes cibles de *MLL* sont ainsi transcrites grâce à l'intervention des facteurs du complexe SEC (Smith *et al.* 2011; Luo *et al.* 2012). D'autres fonctions des protéines de fusion sont connues notamment celles de *MLL-ENL*, *MLL-AF9*, *MLL-A10* ou encore *MLL-ENL* qui répriment l'expression de *P53* (Wiederschain *et al.* 2005).

Les réarrangements du gène *MLL* sont retrouvés dans la plupart des cas de LAM pédiatriques et sont caractérisés par une hétérogénéité clinique avec un pronostic associé défavorable et variable selon le type de translocation, le partenaire associé, l'état et l'âge du patient. Par exemple, les translocations $t(6;11)(q27;q23)$ et $t(10;11)(p2;q23)$ sont associées à un pronostic défavorable alors que la translocation $t(9;11)(p22;q23)$ présente un taux de survie significativement plus long (Hess 2004; Ilencikova & Kolenov 2013).

- Mutations de *TET2*

Le gène *TET2* (*ten eleven translocation 2*) situé en 4q24 code une oxygénase dépendante du α -cétoglutarate et du Fe (II) capables d'hydroxyler les cytosines méthylées en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmc), étape indispensable dans le processus de déméthylation de l'ADN, intervenant dans la régulation de l'expression génique (Tahiliani *et al.* 2009;

Mahfoudhi *et al.* 2015). Les mutations de *TET2* sont majoritairement des insertions, des délétions ou des mutations ponctuelles non-sens, conduisant à une perte de fonction de la protéine et au blocage de la différenciation (Delhommeau *et al.* 2009; Ko *et al.* 2010; Langlois *et al.* 2014; Chiba 2017). Les mutations de *TET2* sont retrouvées dans 15 à 25 % des LAM secondaires ou *de novo* (Metzeler *et al.* 2011).

- Mutations d'*IDH1* et d'*IDH2*

Les gènes *IDH1* (*isocitrate deshydrogénase de type 1*) (2q33) et *IDH2* (15q26) codent des isocitrates deshydrogénases NADP (*nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*) dépendantes catalysant la conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate. Dans les LAM, les mutations d'*IDH1/2* touchent majoritairement le codon R132 d'*IDH1* et les codons R140 et R172 d'*IDH2* provoquent la perte de l'activité enzymatique normale par l'acquisition d'une nouvelle activité enzymatique qui consiste en la réduction de α -cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate. Cet onco-métabolite est un inhibiteur compétitif de *TET2* provoquant donc une diminution de la synthèse de 5hmc. Les mutations d'*IDH1/2* représentent 15-20 % des LAM secondaires et *de novo* (Schnittger *et al.* 2010; Boissel *et al.* 2011; Llopis *et al.* 2011).

- Mutations de *DNMT3A*

Le gène *DNMT3A* (*DNA méthyltransférase 3A*), situé en 2p23, code une enzyme catalysant la conversion de la cytosine en 5-méthylcytosine (5mc) participant donc à la méthylation *de novo* de l'ADN. Les mutations surviennent essentiellement dans le domaine à activité méthyltransférase. Elles engendrent une hypométhylation de l'ADN et touchent 20 % des LAM secondaires ou *de novo* (Thol *et al.* 2011; Hou *et al.* 2012; Renneville *et al.* 2012).

- Mutations d'*ASXL1*

Le gène *ASXL1* (*additional sex combs like 1*) situé en 20q11 n'a pas de rôle connu. Les mutations décrites sont ponctuelles, non-sens ou consistent en des insertions/délétions aboutissant à la synthèse d'une protéine tronquée dans sa partie C-terminale. Les mutations d'*ASXL1* sont retrouvées dans 5-10 % des LAM, aussi bien secondaires que *de novo* (Gelsi-Boyer *et al.* 2009; Chou *et al.* 2010).

- Altérations d'*EZH2*

Le gène *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*), situé en 7q35-q36, code la sous-unité catalytique du complexe *PRC2* (*polycomb repressor 2*) qui catalyse la triméthylation de

l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3). Celle-ci est impliquée dans la régulation épigénétique des gènes du cycle cellulaire. Retrouvées dans environ 5 % des LAM, les mutations d'*EZH2* entraînent une activité oncogénique ou suppresseur de tumeur en fonction du contexte cellulaire. Les altérations d'*EZH2* modifient l'expression de facteurs de transcription responsables du blocage de la différenciation (Lund *et al.* 2014; Gao *et al.* 2016; Herviou *et al.* 2016).

I.III) Traitements des leucémies aiguës myéloïdes

Le traitement des LAM repose essentiellement sur la chimiothérapie. L'ajout d'un agent différenciant améliore le traitement chimiothérapeutique. Les patients souffrants de LAM étant en moyenne assez âgés (généralement 60 ans et plus), l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques n'est réalisée que dans 10 % des cas.

I.III.A) Chimiothérapie d'induction et traitement post-rémission

Le traitement des LAM a pour but de détruire les blastes leucémiques pour permettre la reconstitution de la moelle osseuse. Le traitement de référence repose à l'heure actuelle sur l'utilisation d'agents cytotoxiques et comporte plusieurs phases :

- L'induction

Ce traitement par chimiothérapie dure de sept à dix jours. Le schéma de traitement est le « 3+7 », c'est-à-dire l'administration en perfusion continue de 3 jours d'une anthracycline (daunorubicine 45 à 60 mg/m²) et de 7 jours d'aracytine (AraC, 100 à 200 mg/m²). Son objectif est d'obtenir une rémission complète, c'est-à-dire la disparition des signes de la maladie (blastose médullaire < 5 %, maturation normale des lignées). Les blastes leucémiques ne sont plus ou peu détectables, ni dans la moelle osseuse, ni dans le sang par analyse cytomorphologique (Sekeres *et al.* 2009). Si la première cure d'induction n'a pas suffi à obtenir une rémission complète, une deuxième cure d'induction de même type peut être réalisée.

- La consolidation

Le but est de maintenir la rémission en administrant de fortes doses de chimiothérapie. Plusieurs cycles de consolidation (1 à 4 cures de chimiothérapie) sont habituellement nécessaires (Mayer *et al.* 1994).

- L'intensification

Ce traitement est proposé en fonction du risque de rechute associé au statut génétique. Il est variable d'un sujet à l'autre. Il repose sur plusieurs cures d'une chimiothérapie proches ou identiques à celles administrées pendant la consolidation ou sur une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Il peut s'agir d'une greffe effectuée à partir d'un donneur (allogreffe) ou à partir des cellules souches du patient lui-même qui sont recueillies à la fin du traitement de consolidation (autogreffe) (Burnett *et al.* 2011).

Ces trois phases de traitement varient selon l'âge et sont adaptées en fonction de l'état de santé du patient :

- Traitement de l'enfant

Le traitement comporte 4 étapes : (1) un traitement d'induction intensif (corticoïdes, asparaginase, vincristine ou anthracyclines) pendant 4 semaines avec une surveillance particulière de l'état cérébral. S'en suit une phase d'intensification (2) puis de consolidation (3) reprenant les mêmes médicaments que ceux utilisés lors de l'induction. Enfin, un traitement d'entretien (4) est poursuivi pendant 2 à 3 ans afin d'éviter les récurrences (Stary *et al.* 2014; Maloney & Gore 2017).

- Traitement de l'adulte (18 - 60 ans)

Le traitement d'induction « 3+7 » anthracycline + aracytine est donnée dans un premier temps pour obtenir une rémission complète. Trois options majeures sont envisageables pour le traitement de post-rémission : une chimiothérapie intensive, généralement 3 cures de consolidation par AraC à haute dose ; l'allogreffe de CSH ou l'autogreffe de CSH à conditionnement standard (destruction complète de la moelle osseuse par chimiothérapie qui peut être complétée par de la radiothérapie afin de traiter la maladie résiduelle et favoriser la prise de greffe) (Burnett *et al.* 2011).

- Traitement du sujet âgé (60 – 75 ans)

Pour les patients dont l'état de santé est stable, l'induction par chimiothérapie intensive est majoritairement préconisée et permet d'obtenir 40 à 60 % de rémission complète avec un taux de décès précoce inférieur à 15 %. Comme chez l'adulte jeune, l'induction consiste en 3 jours d'anthracycline et 7 jours d'aracytine. Pour les patients en bon état général, l'administration séquentielle de cures de chimiothérapie à dose intermédiaire est l'option majeure. Enfin, selon leur état général, il est possible pour ces patients de bénéficier d'une allogreffe de CSH à conditionnement atténué, non myéloablatif (Dohner *et al.* 2010).

➤ Traitement du sujet âgé (> 75 ans)

La prise en charge est dépendante de l'état général et du souhait du patient. Il est recommandé de recourir à des traitements non intensifs tels que l'AraC à faible dose (20 mg deux fois par jour en sous-cutané, pendant 10 jours) ou encore les agents déméthylants l'ADN tels l'azacitidine ou la décitabine (Dohner *et al.* 2010).

Ces traitements ne concernent pas le sous-groupe des LAP (classification FAB M3), caractérisé dans 97 % des cas par la translocation t(15;17)(q22;q12) et correspondant à une entité indépendante. Les phases d'induction et de consolidation sont réalisées par traitement à l'acide *tout-trans* rétinoïque (ATRA) en combinaison avec une anthracycline ou du trioxyde d'arsenic dans le cadre d'une thérapie d'induction de la différenciation.

I.III.B) Lever le blocage de la différenciation : la révolution du traitement des leucémies aiguës promyélocyaires.

A l'heure actuelle, il n'existe que peu de thérapies différenciatrices possédant une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France telles que celle par l'ATRA. Les LAP représentent 5 à 8 % des LAM et sont caractérisées par un blocage de la différenciation au stade promyélocytaire (Lanotte *et al.* 1991). Les blastes sont de grande taille et riches en granulations caractéristiques morphologiquement proches des promyélocytes. Le cytoplasme est rempli de granules pourpres dont certaines granulations sont plus fines, en forme de bâtonnets, appelées corps d'Auer ou fagots. Les symptômes des LAP sont les mêmes que ceux de l'ensemble des LAM (fièvre, malaise, etc) mais le risque d'hémorragie est plus élevé.

Les LAP sont caractérisées dans 97 % des cas par une translocation t(15;17)(q12;q21), une partie du gène codant le récepteur alpha de l'acide rétinoïque (*RARA*) en 17q12 est fusionnée en 3' du gène localisé en 15q22 (gène *PML*) délété de sa partie 3', permettant ainsi l'expression de la protéine de fusion PML-RARA sous le contrôle constitutif du promoteur *PML* (de Thé *et al.* 1990; Melnick & Licht 1999) (**Figure 6.A**). D'autres translocations, rares, ont été décrites dans les LAP et conduisent, entre autres, aux protéines de fusion PLZF-RARA, NPM-RARA ou encore STAT5β-RARA (Melnick & Licht 1999). Des événements secondaires touchant en particulier les gènes *FLT3* ou *RAS* sont nécessaires au développement des LAP (Sohal *et al.* 2003; Chan *et al.* 2006).

La protéine PML (*promyelocytic leukemia*) possède un rôle de suppresseur de tumeur, elle est impliquée dans l'apoptose, la sénescence, la réparation des dommages à l'ADN et la différenciation cellulaire (Zhu *et al.* 2007). Les récepteurs aux acides rétinoïques sont de deux catégories : les récepteurs aux acides rétinoïques RAR et les récepteurs aux acides rétinoïques RXR (*retinoid X receptor*). L'ATRA a une plus grande affinité pour les récepteurs RAR que RXR (Heyman *et al.* 1992; Melnick & Licht 1999). Le récepteur RARA s'hétérodimérise avec le récepteur RXR en absence de ligand et permet le recrutement de co-répresseurs entraînant la répression transcriptionnelle de gènes cibles.

La liaison de l'ATRA à concentration physiologique induit la dissociation des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs entraînant l'activation des gènes cibles. En absence de ligand, la protéine de fusion PML-RARA s'homodimérise et ne requière plus l'hétérodimérisation avec RXR pour interagir avec l'ADN. PML-RARA recrute ainsi de nombreux co-répresseurs et HDAC, réprimant la transcription de gènes cibles de sorte qu'à dose physiologique ($10^{-8}/10^{-9}$ M) la liaison de l'ATRA n'induit plus la dissociation des co-répresseurs. Pourtant, la protéine de fusion PML-RARA possède la même affinité que le récepteur RARA pour l'ATRA et se fixe, associée ou non à RXR, sur la séquence de liaison à l'ADN RARE (*retinoic acid response element*). Aussi les doses pharmacologiques ($>10^{-6}$ M) d'ATRA permettent la sensibilisation du récepteur et la dissociation des co-répresseurs (Lin & Evans 2000; Licht 2006; Zhu *et al.* 2007) (**Figure 6.B**). Les gènes cibles de PML-RARA sont impliqués dans le cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose, le métabolisme ou encore la synthèse protéique (Martens *et al.* 2010). Son activité dépend de son interaction avec les protéines des complexes PRC1 et PCR2 (de Thé *et al.* 1990; Villa *et al.* 2007; Boukarabila *et al.* 2009).

Le traitement à l'ATRA permet de lever le blocage de la différenciation. Plusieurs mécanismes ont été rapportés : l'ATRA active la protéine kinase A (PKA) nécessaire à la maturation des cellules et engendre la dégradation de la protéine PML-RARA par son ubiquitinylation afin de l'adresser au protéasome (Yoshida *et al.* 1996; Nguyen *et al.* 2013).

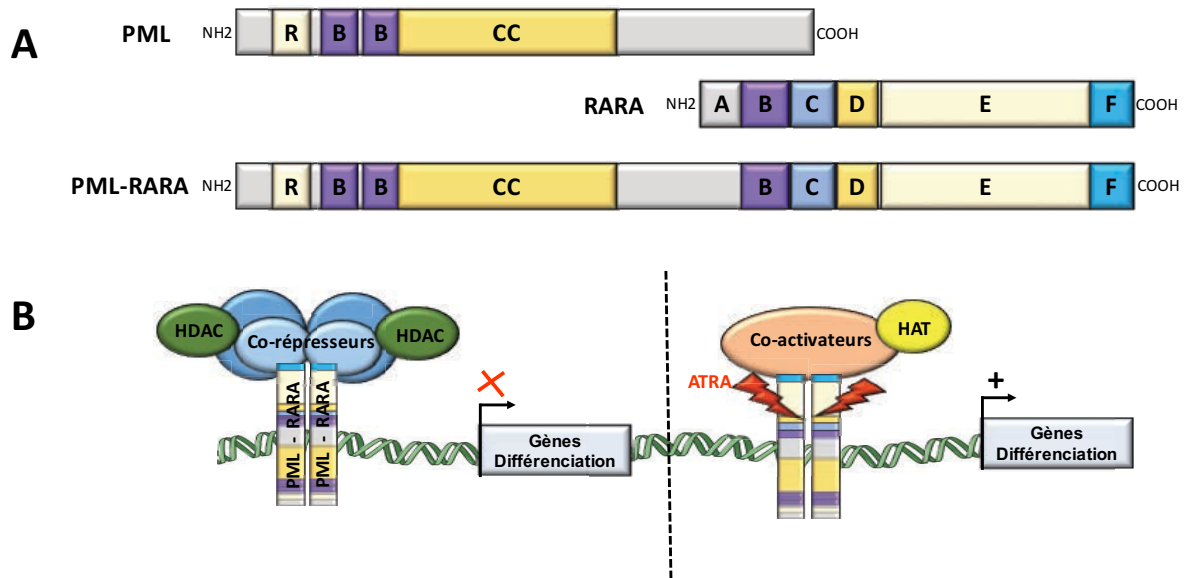


Figure 6 : Implication de PML-RARA dans les LAP. A. Représentation des protéines PML, RARA et PML-RARA. La protéine PML possède un domaine RING (R) en doigt de zinc, deux domaines B-BOX (B) et un domaine coiled Coil (CC). La protéine RARA possède 6 domaines A à F, dont le domaine E qui est à la fois le site d'interaction avec le ligand et celui d'homo- ou hétéro-dimérisation avec les autres récepteurs aux acides rétinoïques (RAR ou RXR) alors que le domaine C permet la liaison à l'ADN B. Mécanismes d'action de l'ATRA. HDAC : histone déacétyltransférases, HAT : histone acétyltransférase. Inspiré de : de Thé *et al.* 1990; Heyman *et al.* 1992; Melnick & Licht 1999; Zhu *et al.* 2007.

Jusque dans les années 80, le traitement des LAP reposait sur l'utilisation de la chimiothérapie conventionnelle avec une survie qui ne dépassait pas les 2 à 5 ans. Les premières expériences *in vitro* sur lignées cellulaires (Breitman *et al.* 1980) puis le traitement des patients ont permis de démontrer l'efficacité de l'ATRA en tant qu'agent différenciateur (Huang *et al.* 1988; Liu *et al.* 2003).

Actuellement, le traitement des LAP repose sur la combinaison de chimiothérapie conventionnelle et d'ATRA permettant une rémission complète des patients dans 90 % des cas. Lors de rechutes et afin de limiter les résistances, le trioxyde d'arsenic (ATO) peut être administré en association avec l'ATRA. Contrairement à l'ATRA qui agit sur la partie RARA, l'ATO agit sur la partie PML de la protéine de fusion PML-RARA et provoque la sumoylation sur la tyrosine 160 et sa dégradation par le protéasome (Lallemand-Breitenbach & de Thé 2013) ou encore par voie autophagique (Isakson *et al.* 2010). La combinaison ATRA/ATO permet la dégradation complète de la protéine PML-RARA, l'élimination des

cellules leucémiques et la rémission des patients. Mais, dans certains cas, des complications ont été décrites suite au traitement ATRA/ATO telles que le syndrome de différenciation.

En effet, les agents différenciateurs engendrent une accumulation excessive de cellules différenciées dans le sang causant fièvre, gain de poids dépassant les 5 kg, détresse respiratoire due à des infiltrations pulmonaires et dysfonctionnement des reins (Montesinos & Sanz 2011). Les causes du syndrome de différenciation ne sont pas à ce jour connues. Cependant, certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α (*Tumor necrosis factor alpha*), l'IL1B (*interleukin 1 beta*) ou encore l'IL8 (*interleukine 8*), associées ou non au processus même de différenciation, joueraient un rôle primordial dans le développement de ce syndrome de différenciation (Patatianian & Thompson 2008). A l'heure actuelle, le syndrome de différenciation est pris en charge par l'administration de corticoïdes associée à un arrêt du traitement à l'ATRA jusqu'à résolution du syndrome (Lo-Coco *et al.* 2013). L'ATRA et l'ATO sont également évalués dans les autres LAM non LAP mais ont montré des résultats variables.

I.III.C) Nouvelles thérapies ciblées

Les thérapies ciblées actuellement en cours de développement, en essais cliniques ou récemment approuvés peuvent être classées en 4 catégories : (1) les agents ciblant des effecteurs oncogéniques mutés, par exemple les inhibiteurs de FLT3 et d'IDH ; (2) les agents ciblant des effecteurs non mutés impliqués dans les désordres métaboliques ou les grandes fonctions cellulaires, par exemple le ciblage d'effecteurs épigénétiques ; (3) les stratégies permettant une meilleure disponibilité des agents cytotoxiques ; (4) l'immunothérapie par des stratégies de stimulation du système immunitaire contre les cellules cancéreuses.

En 2017, la FDA (*Food and Drug Administration*) a autorisé la commercialisation de trois nouveaux médicaments pour le traitement des LAM et qui sont sous autorisation temporaire d'utilisation en France : (1) la midostaurine, inhibiteur de FLT3, (2) l'enasidenib, inhibiteur d'IDH2 muté et (3) le gemtuzumab ozogamicine, conjugué drogue-anticorps dirigé contre le CD33. D'autres molécules sont en essais cliniques tels que les inhibiteurs de BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), de PLK1 (*polo-like kinase 1*) et les immunothérapies telles que les anticorps anti-PD1 (Stahl *et al.* 2017).

I.III. C.1) Ciblage d'effecteurs oncogéniques mutés

Le séquençage du génome et l'identification des mutations associées aux LAM permettent aujourd'hui d'orienter la prise en charge des patients. Le profil moléculaire permet d'adapter la phase d'induction de traitement et le développement de nouveaux agents facilite le ciblage spécifique d'effecteurs oncogéniques mutés.

I.III. C.1.1) Les inhibiteurs de FLT3 muté

FLT3 est un récepteur exprimé dans tous les tissus hématopoïétiques. Les mutations en tandem (FLT3-ITD) du récepteur sont retrouvées dans 25 % des LAM et d'autres mutations touchant le domaine d'activation tyrosine kinase sont présentes dans 5 à 10 % des LAM. Ces mutations conduisent à l'activation des voies de signalisation MAPK / PI3K / AKT / mTOR et STAT5. Les agents de première génération (sunitinib, sorafenib, midostaurine, lesaurtinib) ont été développés à l'origine pour une utilisation dans d'autres pathologies. A titre d'exemple, le sunitinib a été développé pour son activité anti-PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) dans le carcinome rénal (Mendel *et al.* 2003). Les études initiales réalisées en monothérapie ont montré que ces agents se sont avérés efficaces à court terme et avec de fortes toxicités. Deux longues études de phase III ont été réalisées pour le lesaurtinib et ont montré des améliorations en terme de réponse au traitement et un taux de rechute réduit pour les patients présentant un taux d'inhibition d'au moins 85 % de l'activité de FLT3 (Grunwald & Levis 2013).

Une seconde génération d'agents (quizartinib, crenolanib, gilteritinib) a été développée. Ces composés sont en phase III d'essais cliniques. Malheureusement, si ces composés sont mieux tolérés et plus spécifiques sur FLT3, ils ont malheureusement engendré rapidement des résistances au traitement par l'acquisition de nouvelles mutations du récepteur. Les combinaisons de traitement des agents de première génération et de la chimiothérapie ont montré des résultats prometteurs (taux de survie augmenté de 25 %) et une toxicité bien moindre (Stone 2017). C'est pourquoi l'administration de la midostaurine est autorisée pour le traitement de patients présentant une mutation de *FLT3* en association avec la chimiothérapie standard (Perl 2017; Stone *et al.* 2017) (**Figure 7.1**).

I.III. C.1.2) Les inhibiteurs de IDH muté

IDH est une famille d'enzyme qui catalyse la décarboxylation de l'isocitrate en α -cétooglutarate. Les mutations touchant IDH1 ou IDH2 apparaissent précocement au cours de la leucémogénèse (Shlush *et al.* 2014) et perturbent la méthylation de l'ADN et des histones par la production d'un métabolite anormal, le 2-hydroxyglutarate (2-HG) (Ward *et al.* 2010). Les mutations d'*IDH* sont généralement associées aux mutations de *TET2* et/ou de *WT1*. Il a été montré que la coopération des mutations d'*IDH* et de *NPM1* était associée à l'activation d'*HOXA9* (Ogawara *et al.* 2015). Le premier agent développé comme inhibiteur d'*IDH2* muté est l'enasidenib (Stein *et al.* 2017a) qui induit une différenciation terminale des cellules leucémiques (Amatangelo *et al.* 2017). Les résultats des essais cliniques de phase I et II sont prometteurs. Cependant, les patients présentent un syndrome de différenciation aigu accompagné d'effusions pulmonaires et pleuropéricardiques comme observé avec des LAP traitées par ATRA (Stein *et al.* 2017a). Des inhibiteurs d'*IDH1* muté sont en cours de développement tels que l'ivosidenib (Stone 2017). D'autres essais pour combiner ces inhibiteurs d'*IDH* à la chimiothérapie et aux agents hypométhylants de l'ADN sont en cours (DiNardo *et al.* 2014) (**Figure 7.2**).

I.III. C.2) Immunothérapie, réveil du système immunitaire

Les nouvelles stratégies utilisant le système immunitaire pour le traitement des LAM ne se sont développées que récemment (Lichtenegger *et al.* 2017), ce qui est étonnant puisque la greffe de CSH est l'une des plus anciennes stratégies immunothérapeutiques pour le traitement post-rémission.

L'immunomarquage des cellules leucémiques a permis de les caractériser par cytométrie en flux. Le marqueur CD33 a ainsi été identifié comme étant une cible intéressante pour le traitement des LAM de par son expression dans les cellules progénitrices et blastiques. Le Gemtuzumab ozogamicine (GO), commercialisé par Pfizer sous le nom de MYLOTARG®, est un anticorps monoclonal anti-CD33 couplé à un agent cytotoxique, la calichéamicine. Le GO, dont la mise sur le marché avait été autorisée par la FDA, a été retiré en juin 2010 dû, entre autres, à des complications sévères de maladie veino-occlusive et des complications hépatiques (Burnett *et al.* 2011). Il est réintroduit sur le marché américain en 2017 pour une administration beaucoup plus faible et en combinaison avec la chimiothérapie (Gamis *et al.* 2014; Hills *et al.* 2014) et, est ré-évalué sous autorisation temporaire

d'utilisation (ATU) en Europe. D'autres agents ciblant le CD33 sont actuellement en cours d'essai clinique et notamment en association avec des agents hypométhylants l'ADN. C'est le cas du vadastuximab talirine (SGN-33A) pour lequel l'anticorps anti-CD33 est attaché à un dimère de pyrrolobenzodiazepine liant l'ADN (Stein *et al.* 2017b) (**Figure 7.3**).

Un autre anticorps couplé à un agent cytotoxique actuellement en phase I d'essai clinique est le SGN-CD123A dirigé contre le récepteur CD123 exprimé dans les leucémies (Ehninger *et al.* 2014; Testa *et al.* 2014) (**Figure 7.4**).

Par l'immunisation *via* l'injection de molécules composées de deux anticorps variables liés par un peptide, les lymphocytes sont recrutés au niveau des cellules cancéreuses. La molécule composée de deux anticorps permet de faire la liaison entre, d'une part, la cellule cancéreuse et, d'autre part, le lymphocyte T. Une de ces stratégies, le blinatumomab CD19/CD3 spécifique, s'avère efficace dans le ciblage des précurseurs B des LAL (Kontermann & Brinkmann 2015). Dans les LAM, le flotetuzumab (MGD006), molécule reconnaissant le CD123 exprimé dans les cellules cancéreuses et le CD3 exprimé par les lymphocytes T, est actuellement en phase I d'essai clinique (Chichili *et al.* 2015) (**Figure 7.5**).

Un autre espoir de traitement des LAM par immunothérapie repose sur la vaccination avec des cellules dendritiques dont la fonction est de déclencher la réponse immunitaire par leur fonction de cellules présentatrices d'antigène. Les cellules dendritiques peuvent être différenciées *in vitro* à partir de monocytes puis modifiées pour présenter à leur surface l'antigène tumoral qui sera reconnu par les lymphocytes T. Des études cliniques de phase II ont permis l'évaluation de ces vaccins de cellules dendritiques contre l'antigène WT1 (Van Tendeloo *et al.* 2010).

Un autre moyen de réactiver l'activité des lymphocytes T est la génération de cellules CAR-T (*chimaeric antigen receptor*). Les CAR sont des récepteurs membranaires génétiquement modifiés combinant la liaison extérieure à un antigène tumoral et l'activité intracellulaire du lymphocyte augmentant son activité. Les CAR-T sont des lymphocytes T prélevés du patient et génétiquement modifiés *in vitro* pour leur faire exprimer le récepteur CAR. À ce jour, l'antigène le plus étudié pour la thérapie des CAR-T est le CD19. Cette thérapie a donné des résultats particulièrement prometteurs dans les LAL (Turtle *et al.* 2016; Locke *et al.* 2017). L'utilisation des cellules CAR-T dans les LAM est particulièrement

délicate du fait de la non-expression spécifique de marqueurs de ces cellules. Le ciblage non spécifique des cellules non cancéreuses par les cellules CAR-T est à risque puisque les cellules CAR peuvent persister jusqu'à 4 ans dans le corps humain (Porter *et al.* 2015).

CD33 est un antigène cible pour le traitement des LAM par les cellules CAR-T. Dans un modèle murin de LAM, le traitement avec des cellules CAR-T anti-CD33 s'est avéré efficace avec la diminution de la charge leucémique et un gain de survie. Cependant, une toxicité impacte les cellules myéloïdes non leucémiques (O'Hear *et al.* 2015). Le CD123 est également un marqueur intéressant pour la thérapie utilisant les CAR-T, de même évaluée *in vivo*, cette stratégie a montré une éradication de la myélopoïèse normale (Gill *et al.* 2016; Thokala *et al.* 2016). D'autres antigènes semblent particulièrement intéressants et sont en cours d'évaluation préclinique tels que CLL1 (*C-type lectin-like molecule-1*) ou encore FLT3 (Chien *et al.* 2016; Kenderian *et al.* 2016). L'utilisation des CAR-T pour le traitement des LAM est jusqu'alors restreinte par le ciblage d'antigène spécifique des cellules de LAM. Le ciblage non spécifique des cellules cancéreuses peut induire des effets secondaires systémiques.

Les cellules CAR-T sont des « médicaments vivants » et leur effet *in vivo* est dépendant du conditionnement du patient et du protocole de génération de ces cellules (Dotti *et al.* 2014). Jusqu'à maintenant, l'expression des récepteurs CAR à la surface des lymphocytes T est permise par l'utilisation de vecteurs viraux et rétroviraux. L'intégration virale peut engendrer de la toxicité par l'insertion non contrôlée, c'est pourquoi de plus en plus d'études s'intéressent à l'électroporation pour l'expression transitoire de ces récepteurs CAR à la surface des cellules CAR-T (Dai *et al.* 2016) (**Figure 7.6**).

Ces dernières années, l'immunothérapie s'est essentiellement tournée vers l'inhibition des « *checkpoints* immunitaires ». La liaison de la protéine PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), présente à la surface des cellules cancéreuses à son récepteur PD-1 (*programmed cell death 1*) exprimé par les lymphocytes T, entraîne leur inactivation. En bloquant le récepteur PD-1 ou son ligand PD-L1, l'inactivation des lymphocytes T est levée (**Figure 7.7**). Dans les lymphomes notamment, les anticorps anti-PD-1 ont montré des résultats remarquables et de plus en plus de données montrent que cette stratégie est applicable aux patients atteints de LAM (Alatrash *et al.* 2016). Le premier inhibiteur de *checkpoint* approuvé par la FDA en 2011 pour le traitement des mélanomes est un anti-CTLA-4 (**Figure 7.8**). Tout comme PD-1, CTLA-4 est un régulateur négatif de la fonction des lymphocytes T (Buchbinder & Desai

2016). L'évaluation des molécules anti-PD-1 en combinaison de traitement par chimiothérapie est actuellement en cours d'essais cliniques de phase II.

Une autre stratégie à l'étude est de combiner ces inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires avec des agents hypométhylants. En effet, les patients traités par ces agents présentent une expression élevée de la protéine PD-L1 (Yang *et al.* 2014; Daver *et al.* 2016). Aussi, les combinaisons de traitement alliant ces inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires s'avéreront probablement être un pas important pour la prise en charge des patients atteints de LAM et dans la récurrence aux traitements classiques liée à la dormance tumorale causée entre autres par l'inhibition du système immunitaire (Quesnel 2013).

I.III. C.3) Ciblage d'effecteurs de désordres métaboliques et de grandes voies cellulaires

I.III. C.3.1) Agents pro-apoptotiques et régulateurs du cycle cellulaire

La mort cellulaire programmée est un processus hautement régulé nécessitant l'intervention des protéines anti ou pro-apoptotiques de la famille BCL-2. La protéine BCL-2 inhibitrice de l'apoptose se localise dans la membrane mitochondriale où elle empêche l'oligomérisation des protéines BAX (*BCL-2-associated X*) et BAK (*BCL-2 homologous antagonist/killer*) par la séquestration des protéines pro-apoptotiques de la famille BH3-only telles que BIM (*BCL-2-like protein 11*) et BID (*BH3 interacting-domain death agonist*). La fixation à la membrane mitochondriale de l'homodimère de BAX provoque une perforation de celle-ci et un relargage du cytochrome C dans le cytosol. Ce dernier va alors se fixer à la protéine APAF1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) et à la caspase 9 formant ainsi l'apoptosome. Ce complexe va alors permettre l'activation des caspases effectrices 3 et 7 entraînant la mort cellulaire (Cory *et al.* 2016). La surexpression de BCL-2 conduit à l'inhibition de l'apoptose et contribue à la chimiorésistance. Des agents thérapeutiques antagonistes ont été développés et interagissent avec BCL-2 en mimant le domaine de liaison des protéines BH-3. Ainsi, les protéines BIM et BID peuvent de nouveau agir et conduire à l'apoptose des cellules. Le venetoclax, antagoniste de BCL-2, est actuellement en phase III d'essai clinique, pour le traitement des LAM, seul ou en combinaison de traitement avec la chimiothérapie classique et des agents hypométhylants (Konopleva *et al.* 2016; Pollyea & Jordan 2017) (**Figure 7.9**).

I.III. C.3.2) Le ciblage d'effecteurs épigénétiques

Dans les LAM, un nombre important de mutations impacte des gènes codant des protéines régulatrices de la méthylation et/ou de l'hydroxyméthylation de l'ADN tels que *DNMT3A*, *WT1*, *IDH* ou encore *TET2* (50 % LAM). Les mutations des gènes altérant la transcription par l'intermédiaire des modifications des histones sont également fréquentes dans les LAM telles que les mutations de *ASXL1*, *EZH2* ou encore *MLL* (**Figure 7.10**).

- Agents hypométhylants

Les inhibiteurs d'histone méthyltransférase, l'azacitidine et la decitabine ont une AMM pour le traitement des SMD et sont indiqués pour les patients ne pouvant bénéficier de chimiothérapie standard (Kantarjian *et al.* 2017). Peu d'études cliniques ont jusqu'alors été réalisées mais celles-ci ont montré des résultats encourageants (Berthon *et al.* 2016).

- Les inhibiteurs de protéines à bromodomaine

Les protéines à bromodomaine de la famille BET (*bromodomain and extra-terminal motif*) se lient au niveau de résidus lysine acétylés des histones. De nombreux oncogènes sont régulés par ces protéines à bromodomaine tels que l'oncogène c-MYC régulé par la protéine à bromodomaine BRD4 (*bromodomain-containing protein 4*) (Delmore *et al.* 2011). L'inhibition de BRD4 par ARN interférent dans un modèle murin MLL-AF9 induit un arrêt de la prolifération et une induction de la différenciation des cellules (Zuber *et al.* 2011).

- Les inhibiteurs d'histone méthyltransférases

MLL participe à l'activation de la transcription par la triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3). Les translocations du gène *MLL* conduisent à la perte de sa fonction d'histone méthyltransférase et au recrutement d'autres complexes. Ceux-ci peuvent avoir une action antagoniste à celle de MLL non fusionnée, c'est notamment le cas de LSD1 (*histone lysine-specific demethylase 1*) qui déméthyle les lysines 4 (H3K4) et 9 (H3K9) des histones 3, réprimant ainsi la transcription de certains gènes et engendrant un blocage de la différenciation (Harris *et al.* 2012; Lynch *et al.* 2012). Des inhibiteurs de LSD1 (GSK2879552, S2101, etc.) ont été développés et permettent une réactivation de la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la différenciation (Feng *et al.* 2016). Des essais cliniques sont actuellement initiés pour ces composés.

Les protéines de fusion MLL peuvent être également associées à des complexes histone méthyltransférases tels que DOT1L (*disrupter of telomeric silencing 1*) conduisant à une surexpression de gènes leucémogènes tels que *HOXA9* et *MEIS1* (*myeloid ecotropic viral integration site 1*). Des inhibiteurs de DOT1L ont été développés tels que le pinometostat (EPZ-5676) (Daigle *et al.* 2013) et font l'objet d'essais cliniques chez les patients adultes et chez les enfants présentant des récurrences ou des leucémies réfractaires aux traitements. Ces deux études ont montré des résultats prometteurs avec une diminution de la méthylation des locus des cibles *HOXA9* et *MEIS1*.

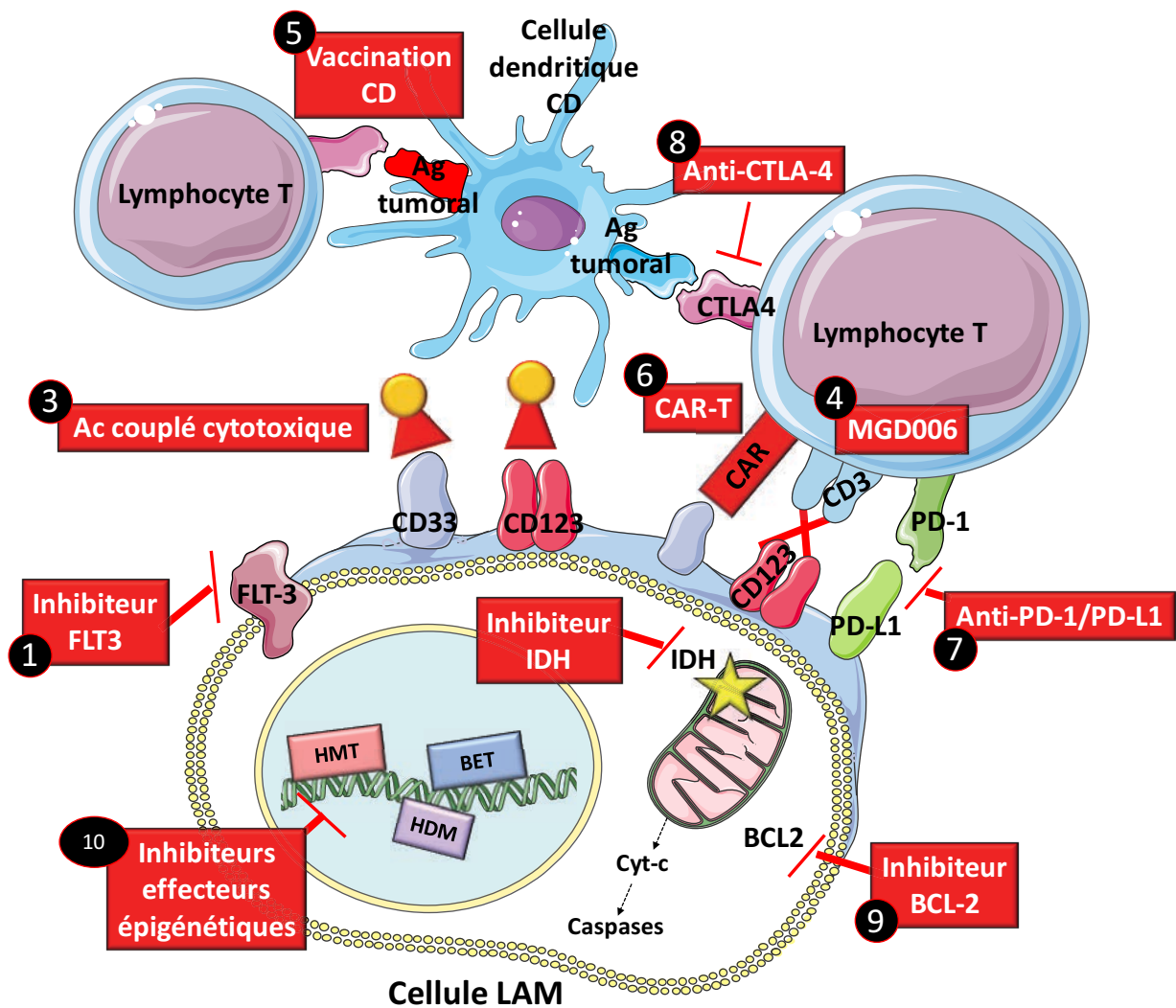


Figure 7 : Nouvelles thérapies ciblées pour le traitement des LAM.

1. Inhibiteurs de FLT3 (midostaurine approuvée par la FDA en 2017) *Partie I.III. C.1.1*
2. Inhibiteurs d'IDH2 muté (enasidenib approuvée par la FDA en 2017) *Partie I.III. C.1.2*
3. Anticorps anti-CD33 (GO approuvée par la FDA en 2017), anti-CD123 (SGN-CD123A) en essai clinique de phase I. *Partie I.III. C.2*
4. Immunisation par injection de molécules composées de deux anticorps variables *Partie I.III. C.2*
5. Vaccination par les cellules dendritiques, activation des lymphocytes T. *Partie I.III. C.2*
6. Les cellules CAR-T, activation des lymphocytes T. *Partie I.III. C.2*
7. Anti PD-1/PD-L1, activation des lymphocytes T. *Partie I.III. C.2*
8. Anti-CTLA-4 (approuvée par la FDA en 2011 pour le traitement du mélanome). *Partie I.III. C.2*
9. Inhibiteur de BCL-2 (venetoclax, phase III d'essai clinique). *Partie I.III. C.3.1*
10. Inhibiteurs d'effecteurs épigénétiques : agents hypométhylants, inhibiteurs de protéines à bromodomaine, d'histone méthyltransférases. *Partie I.III. C.3.2*

II) HOXA9, cible thérapeutique des leucémies aiguës myéloïdes

Les gènes HOX sont des gènes dits homéotiques qui ont été largement étudiés dans la biologie évolutive. Les gènes homéotiques possèdent une séquence appelée homéoboîte d'où le nom « Hox » qui provient de la contraction de l'anglais « *homeobox* ».

Historiquement, les transformations homéotiques ont été identifiées par William Bateson en 1894 utilisant alors le terme « homéosis » faisant référence aux mutations responsables de la transformation d'une structure située au niveau d'un segment du corps en une autre structure homologue. Le premier mutant homéotique fut découvert par Calvin Bridges chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) dans le laboratoire de Thomas Hunt Morgan en 1915 (Krumlauf 1994). Ce mutant présentait une duplication partielle du thorax, appelé ainsi Bithorax (bx) transformant le troisième segment thoracique (T3) vers le second (T2).

Les études génétiques de Morgan ont servi de base aux analyses d'Edward B. Lewis et de Thomas Kaufman sur la définition des gènes homéotiques des complexes Bithorax et Antennapedia. Lewis, Nüsslein-Volhard et Wieschaus identifièrent 15 loci clefs pour la formation des segments du corps de la drosophile et en furent récompensés du prix Nobel de médecine en 1995 (Nüsslein-Volhard & Wieschaus 1980; Lewis 1982). Ces gènes homéotiques plus couramment nommés désormais « gènes HOX » ont été décrits dans nombre de modèles tels que *Caenorhabditis elegans*, *Zebrafish*, *Mus musculus* et, bien évidemment, *Homo sapiens* (Lewis 1978; Duboule 1992; Wilson *et al.* 1994; Schilling & Kinght 2001; Lappin *et al.* 2006).

Chez l'Homme, 39 gènes HOX sont groupés en 4 clusters HOXA, HOXB, HOXC et HOXD localisés sur 4 chromosomes indépendants (7p15, 17q21, 12q12 et 2q31) et classés en 13 groupes paralogues et correspondent à la classe I. Il existe une seconde classe (classe II) réunissant les gènes dits « HOX divergents » car dispersés dans le génome tels que, les partenaires d'HOXA9 que sont PBX (*pre B cell leukemia*) ou MEIS (*myeloid ectopic insertion site*) ou encore HOX11 et HOXL2 impliqués dans l'organogenèse (Owens & Hawley 2002; Shah & Sukumar 2010) (**Figure 8**) ; ou encore les protéines CDX régulant les gènes HOX.

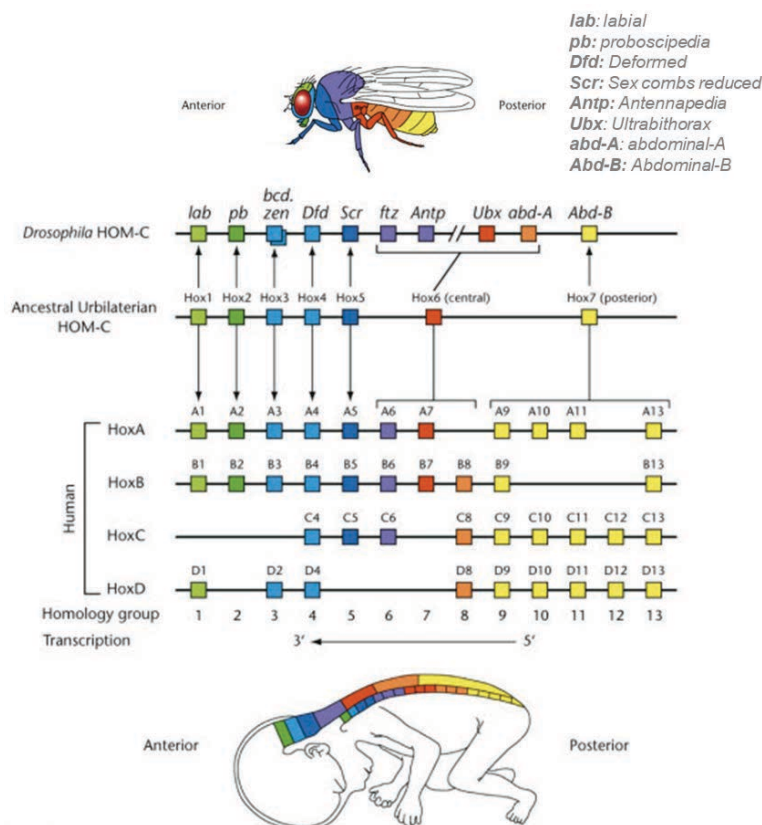


Figure 8: Organisation des gènes homéotiques et patron de leur expression chez la drosophile et l'Homme. La drosophile ne possède qu'un seul groupe de gènes homéotiques appelé *HOM-C* contrairement à l'Homme qui possède 4 complexes homéotiques *HOXA* (sur le chromosome 7), *HOXB* (sur le chromosome 17), *HOXC* (sur le chromosome 12) et *HOXD* (sur le chromosome 2). Le développement antéro-postérieur de l'embryon suit l'expression colinéaire des gènes *HOX*. Modifié de Hox Genes Are Found In The Genomes Of All Animals, Chegg.com.

II.I) Rôle physiologique d'*HOXA9*

II.I.A) Structure du gène *HOXA9*

Chez l'Homme, le gène *HOXA9* est composé de deux exons et se trouve sur le chromosome 7. La protéine *HOXA9* est formée de 272 acides aminés constituant plusieurs domaines fonctionnels :

- Un domaine homéotique ou homéodomaine (HD)
- Un domaine d'interaction avec MEIS1
- Un domaine d'interaction avec PBX

Un autre transcrit issu d'une modification du cadre de lecture a été identifié, il manifeste de manière précoce un codon stop aboutissant à une forme tronquée appelée *HOXA9T*. La protéine tronquée résultante de 105 acides aminés est identique en N-terminal et ne comprend pas le domaine HD (**Figure 9**). Peu de données expérimentales ont permis de mettre en évidence le rôle joué par ce transcrit. Seule sa localisation subcellulaire semble

modifiée : la forme tronquée étant détectée dans le noyau mais également dans le cytoplasme contrairement à la forme longue qui est nucléaire (Fujimoto *et al.* 1998; Dintilhac *et al.* 2004; He *et al.* 2012).

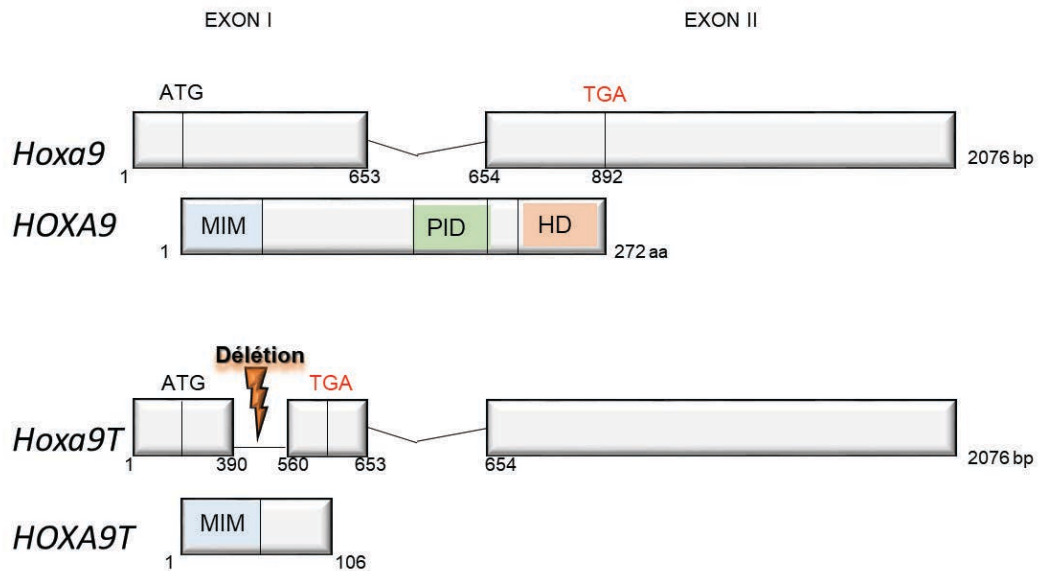


Figure 9 : Représentation schématique des ARN et des protéines HOXA9 et HOXA9T. L'ARNm *Hoxa9* est constitué de 2 exons où les codons START (ATG) et STOP (TGA) sont indiqués. MIM : motif d'interaction à MEIS1, PID : domaine d'interaction à PBX, HD : homéodomaine. Inspiré de He *et al.* 2012.

Le gène *HOXA9* code un facteur de transcription dont l'interaction à l'ADN s'effectue par son domaine homéotique très conservé entre les différents membres de la famille HOX (**Figure 9**). L'homéodomaine est composé de 60 acides aminés organisés en motif Hélice-Tour-Hélice (trois hélices notées $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) (Desplan *et al.* 1988). En partie C-terminale de HD, deux hélices sont antiparallèles ($\alpha 1$, $\alpha 2$) alors que la troisième ($\alpha 3$) perpendiculaire se fixe directement sur le grand sillon de l'ADN. La séquence de reconnaissance à l'ADN des protéines HOX a été défini dans les modèles de drosophile et *in vitro* comme un site « riche en paires de bases AT » de type 5'-ATNAA-3' (ou 5'-TTNAT-3'), la troisième base étant spécifique de chaque facteur HOX. Pour HOXA9, il semblerait que ce soit une base T qui soit prédominante en position 3. De plus, l'interaction avec le petit sillon du bras N-terminal de l'homéodomaine est également indispensable à cette reconnaissance (**Figure 10**). Les données de CHIP-sequencing ont affiné la connaissance du site de fixation d'HOXA9 reconnu comme étant un site tgATT(T)At (Huang *et al.* 2012) (**Figure 10**).

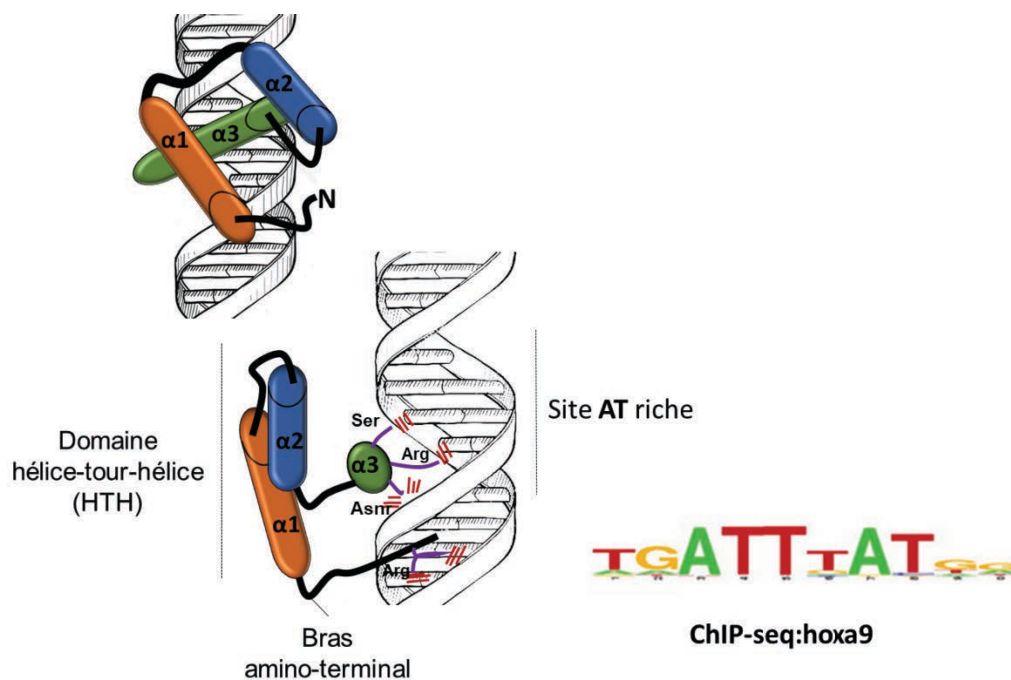


Figure 10 : Interaction des protéines HOX avec l'ADN. L'homéodomaine est constitué de 3 hélices α constituant le motif hélice-tour-hélice (HTH) dont l'hélice $\alpha 3$ qui interagit avec le grand sillon de l'ADN et d'un bras N-terminal qui interagit avec le petit sillon. Le site consensus de liaison à l'ADN du facteur Hoxa9 murin a été évalué in vivo par ChIP-seq par Huang *et al.* 2012.

II.I.B) Interactions avec ses cofacteurs

La spécificité de reconnaissance d'HOXA9 à l'ADN peut être augmentée par l'interaction avec ses cofacteurs MEIS1 et/ou PBX qui appartiennent à la famille des protéines TALE (*three amino acid loop extension*) et possèdent un homéodomaine complété d'une quatrième hélice ($\alpha 4$) en aval des 3 hélices communément présentes mais aussi l'hélice $\alpha 1$ est légèrement modifiée par la présence de 3 acides aminés supplémentaires en C-terminale. De manière générale, les protéines HOX1-10 interagissent avec PBX et HOX9-13 avec MEIS1. HOXA9 peut donc se lier à l'ADN seul ou sous forme d'hétéro-dimère ou -trimère avec ses cofacteurs.

II.I.B.1) PBX

Chez l'Homme, PBX a été identifié en 1990 dans des leucémies lymphocytaires de type B (translocation t (1,19), E2A-PBX1). PBX est l'homologue d'*exd* chez la drosophile (Kamps *et al.* 1990). Il appartient à la famille PBC composée de PBX et de CEH-20. Il existe 4 protéines PBX1 à PBX4 (Monica *et al.* 1991). Le domaine homéotique de PBX possède une

quatrième hélice α en aval des 3 hélices caractéristiques et trois acides aminés supplémentaires sur l'hélice α_1 . Ce domaine est nécessaire pour l'interaction avec les protéines HOX. Une séquence à proximité de l'homéodomaine est nécessaire à l'interaction de PBX avec les protéines HOX. Cette séquence est nommée, selon la protéine HOX associée, « hexapeptide », « pentapeptide », « motif YPWM » ou encore « PID » pour *PBX interacting domain* (Phelan *et al.* 1995) (**Figure 11**). L'étude structurale du complexe HOXA9 avec PBX a permis de montrer qu'HOXA9 interagit avec PBX, *via* les acides aminés ANWL de son motif PID, qui sont directement en contact avec la poche hydrophobe du motif TALE de PBX et son hélice α_3 (LaRonde-LeBlanc & Wolberger 2003) (**Figure 11**). Il a été montré qu'au cours du développement embryonnaire, HOXA9 interagit préférentiellement avec PBX1 (LaRonde-LeBlanc & Wolberger 2003) alors qu'il se lierait davantage avec PBX3 dans les cellules myéloïdes (Shen *et al.* 1999).

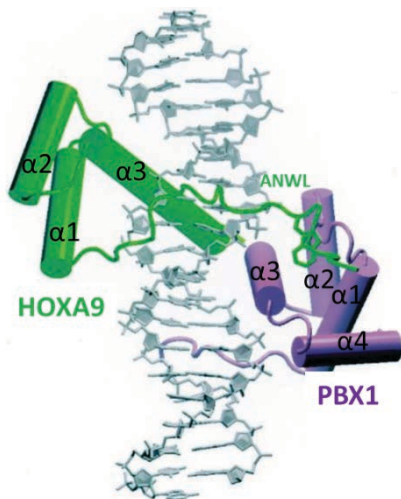


Figure 11 : Liaison à l'ADN du complexe HOXA-PBX1. Le peptide ANWL du domaine PID (*PBX interacting domain*) d'HOXA9 est en contact avec la poche hydrophobe du motif TALE de PBX et son hélice α_3 . Modifié de LaRonde-LeBlanc & Wolberger 2003.

II.I.B.2) MEIS1

Dans des modèles murins, il a été montré que Meis1 agit sur la mise en place de l'axe proximo-distal des membres antérieurs et postérieurs (Mercader *et al.* 1999). MEIS1 est également important pour l'hématopoïèse d'une part, en maintenant les CSH en quiescence par l'activation des gènes *HIF1 α* et *HIF2 α* (Kocabas *et al.* 2012) et d'autre part, en activant la prolifération des progéniteurs (Argiropoulos *et al.* 2007). Malgré sa forte homologie avec PBX, MEIS n'interagit pas avec HOXA9 sur son domaine PID mais au niveau d'un autre motif en N-terminale appelé MIM (*MEIS1 interaction motif*) (**Figure 9**). Sa fonction de transactivateur transcriptionnel est portée par son domaine C-terminal (Mamo *et al.* 2006).

L'interaction de MEIS1 avec PBX et certaines protéines HOX, dont HOXA9, forme ainsi un complexe hétérotrimérique (Shen *et al.* 1999).

II.I.C) Le contrôle physiologique de l'expression des gènes HOX

L'organisation en cluster des gènes *HOX* rend difficile la régulation de leur expression car il existe des séquences activatrices et des promoteurs propres à chacun des gènes alors que pour d'autres les transcrits peuvent être polycistroniques (Simeone *et al.* 1988). Il se produit deux vagues de régulation, la première mettant en place le profil d'expression régie par l'action de facteurs de transcription tels que CDX (*caudal type homeobox*) et/ou par l'action du système endocrinien, et la seconde permettant leur maintien assuré par l'installation de marques épigénétiques (McGonigle *et al.* 2008).

II.I.C.1) 1^{ère} vague de contrôle de l'expression des gènes *HOX* : mise en place du profil d'expression

III.I.C.1.1) Action du système endocrinien

L'ATRA, métabolite du rétinol, se fixe sur le récepteur RAR et permet ainsi son activation. Ces facteurs de transcription RAR forment alors des dimères avec les récepteurs RXR et agissent sur l'expression séquentielle des gènes *HOX* via des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) localisés sur des régions *enhancers* à proximité des gènes *HOX* (Marshall *et al.* 1994; Morrison *et al.* 1996). La délétion de ces RARE entraîne une diminution de l'expression des gènes *HOX* (Dupé *et al.* 1997) (**Figure 12**).

Outre l'ATRA, d'autres médiateurs interviennent dans la mise en place de l'expression des gènes *HOX*. Ces médiateurs primaires agissent indirectement en activant des voies de transduction conduisant à l'activation de facteurs de transcription, tels que CDX (dont l'homologue est Caudal chez la drosophile), contrôlant l'expression des gènes *HOX*. Aussi, il a été montré que de fortes doses de FGF (*fibroblast growth factor*) induiraient, via la fixation à l'un de ses 4 récepteurs, l'activation du facteur de transcription cdx et donc une surexpression des gènes *hox*, chez la souris, le xénope et la drosophile (Pownall *et al.* 1996; Isaacs *et al.* 1998; De Robertis 2008). C'est également le cas de la voie Wnt qui, par l'intermédiaire de Cdx1, contrôlerait l'expression des gènes *HOX* (Pilon *et al.* 2007) (**Figure 12**).

II.I.C.1.2) Activité des facteurs de transcription

Les facteurs CDX appartiennent à la famille des gènes *HOX* de classe II. Ils sont également appelés gènes *paraHOX*, car tout comme les gènes *HOX*, ils sont organisés en cluster et dériveraient d'un cluster ancestral commun. De plus, les gènes *Cdx* participent à la mise en place de l'axe antéro-postérieur et sont importants pour la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques embryonnaires (Holland *et al.* 1998; Young & Deschamps 2009; Rawat *et al.* 2012). Il a été montré qu'il existe des séquences de fixation de CDX au niveau des gènes *HOX*. Par exemple, *Cdx4* se lie à des éléments en *cis* du locus d'*Hoxa9* et en active l'expression dans une lignée murine de CSH (Yan *et al.* 2006). Le gène *CDX2* est par ailleurs impliqué dans la translocation chromosomique CDX2-ETV6 responsable de LAM (Chase *et al.* 1999), contrôlant l'expression aberrante d'*HOXA9* (Lengerke & Daley 2012). Tout comme CDX, il semblerait que le facteur de transcription RUNX1, en particulier sa forme RUNX1a, régulerait directement l'expression des gènes *HOX*, cependant cela n'a pas été clairement démontré à ce jour (Loke *et al.* 2017) (**Figure 12**).

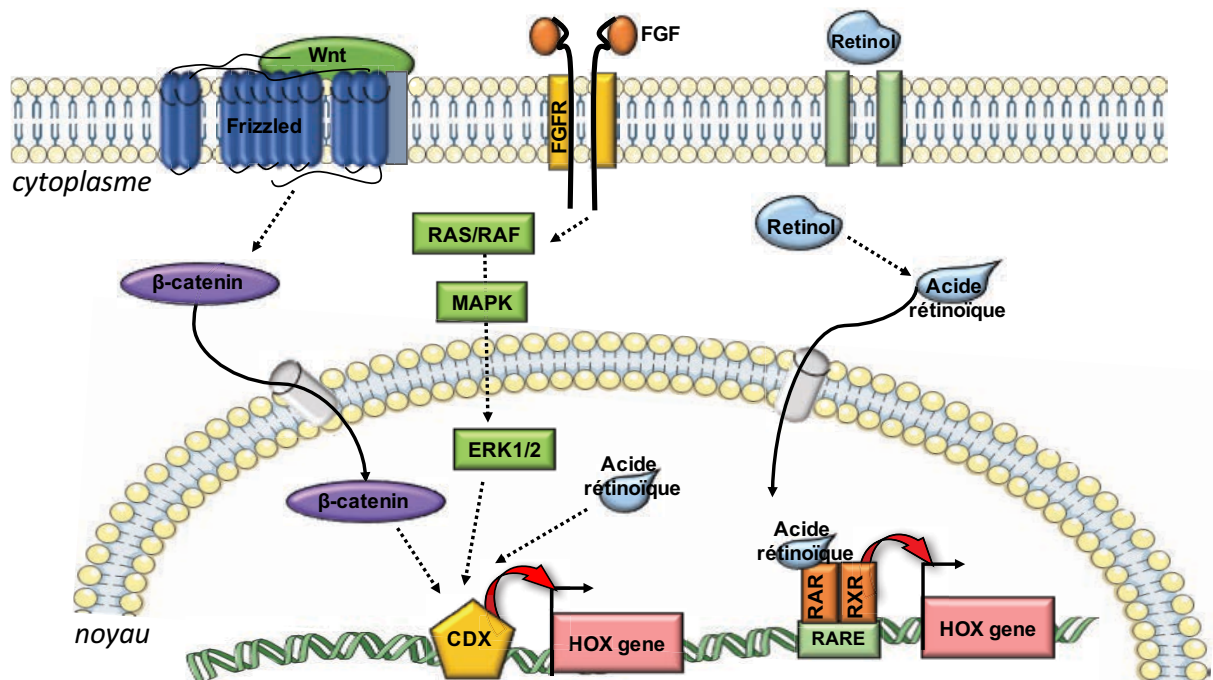


Figure 12 : Première vague de contrôle de l'expression des gènes *HOX*. Inspiré de Frohling *et al.* 2007; Rawat *et al.* 2012; Seifert *et al.* 2015.

II.I.C.2) 2^{ème} vague de contrôle de l'expression des gènes HOX : maintien du profil d'expression

Le maintien de l'expression des gènes *HOX* au cours du développement et dans les tissus adultes est assuré par l'installation de marques épigénétiques (Kouzarides 2007).

II.I.C.2.1) Action des ARN non codants

Les ARN non codants (ARNnc) jouent un rôle clef dans la régulation de l'expression des gènes *HOX* (Brock *et al.* 2009). Ils sont classés en deux catégories : les petits ARNnc et les longs ARNnc.

Les microARN (miRNA) font partie de la famille des petits ARNnc et sont définis comme étant de petits transcrits d'ARN d'environ 22 nucléotides. Le miRNA-196b est transcrit au niveau du locus des gènes *HOXA9* et *HOXA10*. Il interagit directement et spécifiquement avec sa séquence complémentaire au niveau de l'ARNm et réprime alors l'expression d'*HOXA9* au cours du développement pour la mise en place de l'axe antéro-postérieur et lors de l'hématopoïèse (Mansfield & McGlinn 2012).

Les longs ARNnc (mesurant de 300 à plusieurs milliers de paires de bases, épissés et polyadénylés) ont la capacité d'activer ou d'entrer en compétition directe avec la machinerie transcriptionnelle au niveau des gènes situés à proximité, ou, de recruter des complexes dits répresseurs. Tel est le cas du long ARNnc HOTAIR (*HOX transcript antisense intergenic RNA*), situé au sein du cluster HOXC, qui va recruter le complexe répresseur Polycomb (PRC2) (Rinn *et al.* 2007). Un autre long ARNnc fut découvert en 2011, il s'agit de HOTTIP (*HOXA transcript at the distal tip*) localisé au niveau du cluster A et qui contrairement à HOTAIR va permettre le recrutement de WDR5 (*WD repeat-containing protein 5*), un acteur clef pour l'activité du complexe activateur MLL (Wang *et al.* 2011). Outre HOTAIR et HOTTIP, d'autres longs ARNnc ont été identifiés : HOTAIRM1, HOXC5, HOXA-AS3, HOXA10, HOXB-AS3, HOXA10-HOXA9, HOXB-AS5, HOXD-AS2, HOXD-AS1, HOXA-AS3, HOXA-AS4, Pre-B-cell leukemia HOX4. Leur association conduit à une activation ou une répression du gène ou du cluster de gènes *HOX* associé (Brock *et al.* 2009) (**Figure 13**).

II.I.C.2.2) Modifications des histones

Les modifications épigénétiques sont responsables de la régulation de l'expression des gènes par la réorganisation spatiale de complexes nucléoprotéiques de la chromatine. Au sein de cette chromatine, l'ADN est entouré de nucléosomes constitués d'octamères d'histones.

Ces histones sont des protéines basiques riches en lysine et en arginine, dont les extrémités sont les cibles privilégiées de nombreuses modifications à l'origine d'une réorganisation de la chromatine et donc une accessibilité ou non des gènes par la machinerie transcriptionnelle. Il a été montré que le cluster *HOXA* était soumis à ces modifications par l'action d'HMT. En effet, ce locus est caractérisé par la présence de marques dites « activatrices » telles que H3K4me3 (*triméthylation de lysine 4 de l'histone H3*), H3K9me1, H3K36me3 ou encore H4K20me1 associées à une surexpression des gènes *HOXA*. De plus, ces marques trouvées au sein de CSH disparaissent au cours de la différenciation cellulaire, tout comme l'expression des gènes *HOXA*, pour laisser place à des marques dites « répressives » comme H3K27me3 (Atkinson *et al.* 2008; Avraham *et al.* 2010; Barber & Rastegar 2010).

L'étude de la régulation de l'expression des gènes *HOX* a permis la découverte de l'activité de complexes épigénétiques que sont les complexes Trithorax (dont l'homologue est le complexe activateur MLL contenant la protéine MLL) et le complexe répresseur Polycomb (contenant la protéine EZH2). Ces complexes ne sont pas nécessaires à la mise en place de l'expression des gènes *HOX* mais sont indispensables à leur maintien (Schwartz & Pirrotta 2007; Muntean & Hess 2012).

Le gène *MLL* est situé en 11q23 et code une histone méthyltransférase qui interagit directement avec l'ADN, recrute d'autres protéines du complexe appelé « complexe MLL » et méthyle les lysines des histones afin d'activer l'expression des gènes à proximité (Nakamura *et al.* 2002). Le complexe « cœur » de MLL est composé de WDR5, RBBP5 (*retinoblastoma-binding protein-5*), ASH2L (*absent-small-homeotic-2-like protein*) et DPY-30 (*dumpy-30*) (Patel *et al.* 2009). Le dépôt de marques activatrices telles que la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 par ce complexe peut être facilité par la présence de l'ARNnc HOTTIP et son interaction avec WDR5, membre du complexe MLL, par la mise en place de boucles chromatiniennes (Wang *et al.* 2011). MLL s'associe également avec MOF qui est une histone acétyltransférase participant à l'activation de l'expression des gènes tels que *HOXA9* (Dou *et al.* 2005). De plus, l'interaction de MLL avec le locus d'*HOXA9* empêche la méthylation de l'ADN et donc la préservation de son expression (Erfurth *et al.* 2008) (**Figure 13**). L'activité du complexe MLL est contrôlée au cours de la différenciation hématopoïétique des cellules par sa dégradation progressive *via* une ubiquitinylation (Wang *et al.* 2012a).

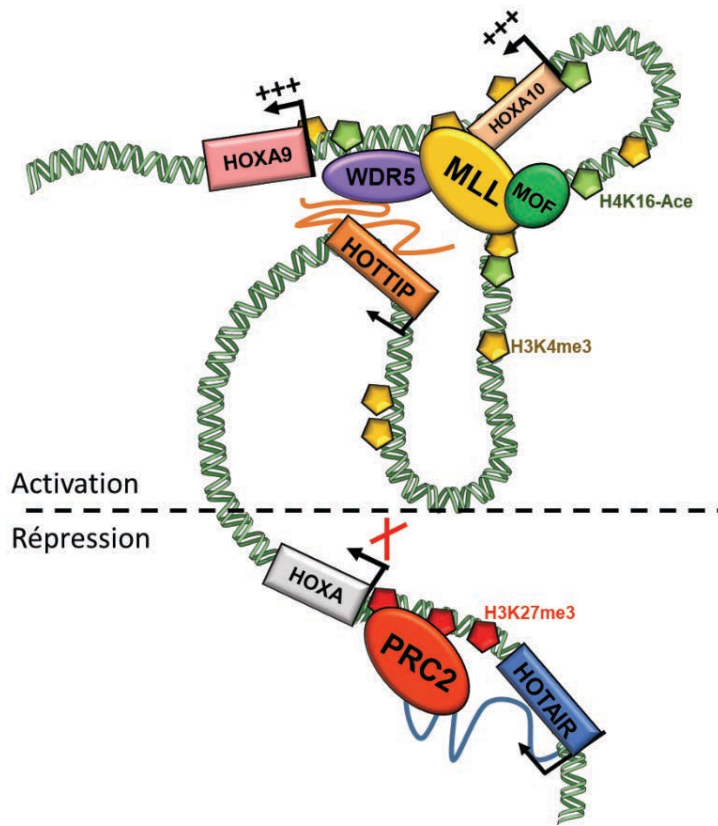


Figure 13 : Deuxième vague de contrôle de l'expression des gènes *HOX*. Inspiré de Brock *et al.* 2009; Guil & Esteller 2012; Kugel & Goodrich 2012; Mansfield & McGlinn 2012; Wang *et al.* 2016.

II.I.C.2.3) Réorganisation spatiale des complexes nucléoprotéiques

La chromatine est capable d'adopter des conformations différentes car son état est modulé par différents acteurs tels que le niveau d'interaction entre les nucléosomes et l'ADN, les forces électrostatiques ou encore les modifications d'histones. Afin de mieux comprendre la dynamique chromatinienne associée à l'expression des gènes *HOX*, des études ont été menées et ont mis en évidence que, par la présence de sites consensus d'interaction, le facteur CTCF (*CTC-Binding Factor*) pourrait être le régulateur de la mise en place de boucles chromatiniennes associées aux gènes *HOX* (Ferraiuolo *et al.* 2010; Dostie & Bickmore 2012).

II.I.D) Régulation de la protéine HOXA9

L'activité de la protéine HOXA9 peut être régulée par des modifications post-traductionnelles pouvant entraîner une modification de son activité (activation, inhibition, dégradation) ou de sa localisation cellulaire (adressage, séquestration dans un compartiment donné).

II.I.D.1) Modifications post-traductionnelles

HOXA9 peut être modifiée post-traductionnellement conduisant, entre autres, à réduire son activité et donc favoriser l'activation de certains processus cellulaires tels que la différenciation. Dans ce contexte, il a été montré qu'HOXA9 pouvait être phosphorylé au niveau de 2 sites : la sérine 204 et la thréonine 205 du site STRK N-terminal de l'homéodomaine. Cette phosphorylation est réalisée notamment par la PKC (*protein kinase C*) et altère les capacités d'interaction d'HOXA9 à l'ADN (Vijapurkar *et al.* 2004). Il a été également montré qu'HOXA9 pouvait être ubiquitinylé par la protéine CUL-4A (*cullin-4A*) avec qui HOXA9 est capable d'interagir directement entraînant sa dégradation par le protéasome (Zhang *et al.* 2003).

II.I.D.2) Modification de sa localisation cellulaire

L'activité nucléaire d'HOXA9 peut être régulée par sa séquestration dans le cytoplasme *via* un complexe protéique cytoplasmique contenant la protéine SMAD4 qui interagit avec le HD d'HOXA9. L'accumulation du complexe [SMAD4-HOXA9] dans le cytoplasme est induite par le TGF- β (*transforming growth factor β*) et contribue à la différenciation des CSH. Si la plupart des mécanismes de régulation de l'activité d'HOXA9 sont à vocation répressive, d'autres favorisent son activité nucléaire. C'est notamment le cas avec l'action de la thrombopoïétine dont la présence augmente l'association MEIS1/HOXA9 dans le noyau (Kirito *et al.* 2004).

II.I.E) Rôles physiologiques des gènes *HOX*

II.I.E.1) Rôle dans le développement embryonnaire et le renouvellement tissulaire

Les gènes *HOX* sont responsables de la mise en place de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Dans les années 1980, Edward B. Lewis identifia chez la drosophile une corrélation entre la localisation des gènes *bithorax* sur le chromosome et leur expression le long de l'axe antéropostérieur. En effet, les gènes en 3' étaient exprimés antérieurement aux gènes en 5' et cette colinéarité spatiale fut également mise en lumière chez les Mammifères (Gaunt 1988). S'il existe une colinéarité spatiale, il existe également une colinéarité temporelle, les gènes situés en 3' s'exprimant de manière plus précoce que ceux situés en 5'. De plus, les gènes se localisant à l'extrémité 5' du complexe ont un phénotype dominant sur ceux en 3' (Duboule & Dollé 1989; Takahashi *et al.* 2004; J. Durston *et al.* 2012) (**Figure 8**).

L'impact des mutations des gènes *HOX* peut être de 2 types : l'une provoquant des modifications structurales et l'autre aboutissant à une perte totale de la fonctionnalité d'une structure ou d'un organe. La fonction des gènes *HOX* ne se restreint pas à la mise en place de l'axe antéro-postérieur. Certaines anomalies sont observées au niveau des organes internes non segmentés chez les souris possédant des mutations des gènes *Hox*. Il a été montré, par exemple, que le gène *Hoxa5* est nécessaire au développement pulmonaire (Boucherat *et al.* 2009). Chez l'Homme, des mutations de ces gènes conduisent à des malformations congénitales notamment dans le cas du syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH), caractérisé par une absence congénitale partielle ou totale de vagin et d'utérus et impliquant les mutations des gènes *WNT4*, *HOXA10* et *HOXA13* (Ekici *et al.* 2013; Watanabe *et al.* 2017; Williams *et al.* 2017).

Les gènes *HOX* sont des acteurs primordiaux dans les tissus adultes dans lesquels s'opèrent un renouvellement cellulaire important (la peau, la muqueuse du colon, le système hématopoïétique). Il a été montré que les reins, le foie, les poumons ou encore la prostate expriment les gènes *HOX* (Takahashi *et al.* 2004). Il a été rapporté également, que l'expression des gènes *HOX* étaient impliqués dans les processus de vascularisation (Skopicki *et al.* 1997; Gorski & Walsh 2000), le développement des glandes mammaires lors de la lactation (Friedmann *et al.* 1994; Chen & Capecchi 1999) et la plasticité tissulaire endométriale au cours de la nidification (Xu *et al.* 2014). Aussi, certaines pathologies, telles que l'endométriose, présentent une expression anormale des gènes *HOXA9/10/11/13* (Du & Taylor 2015; Wang *et al.* 2017).

II.I.E.2) Rôle des gènes *HOX* au cours de l'hématopoïèse

Plusieurs études indiquent que les gènes *HOX* jouent un rôle essentiel dans le contrôle des processus hématopoïétiques. L'expression hématopoïétique des gènes *HOX* répond à une dynamique dépendante du lignage et du stade de différenciation (**Figure 14**). D'abord, *HOXB4* est primordial dans la détermination des CSH (Fan *et al.* 2012). Les gènes du cluster A, B et C sont exprimés principalement dans les cellules les plus primitives (CD34⁺) (Sauvageau *et al.* 1994). Les gènes *HOXA* sont davantage exprimés dans les cellules myéloïdes, *HOXB* dans les cellules érythroïdes et *HOXC* dans les cellules lymphoïdes (Giampaolo *et al.* 1994; Pineault *et al.* 2002). Le rôle des gènes *HOX* a été mis en évidence par des expériences de perte ou de gain de fonction. Ainsi, le gène *HOXA9* est préférentiellement exprimé dans les CSH et son expression décroît au cours de la

différenciation (Sauvageau *et al.* 1994). Des souris *Knock-out* (*Hoxa9*^{-/-}) présentent de graves défauts de l'hématopoïèse avec une diminution du nombre de granulocytes et de lymphocytes circulants et une diminution des progéniteurs myéloïdes, lymphoïdes et érythroïdes, ainsi qu'une rate et un thymus de petite taille (Lawrence *et al.* 1997). À contrario, la surexpression d'*HOXA9*, *in vitro* ou *in vivo* induit l'augmentation du renouvellement des CSH (Thorsteinsdottir *et al.* 2002).

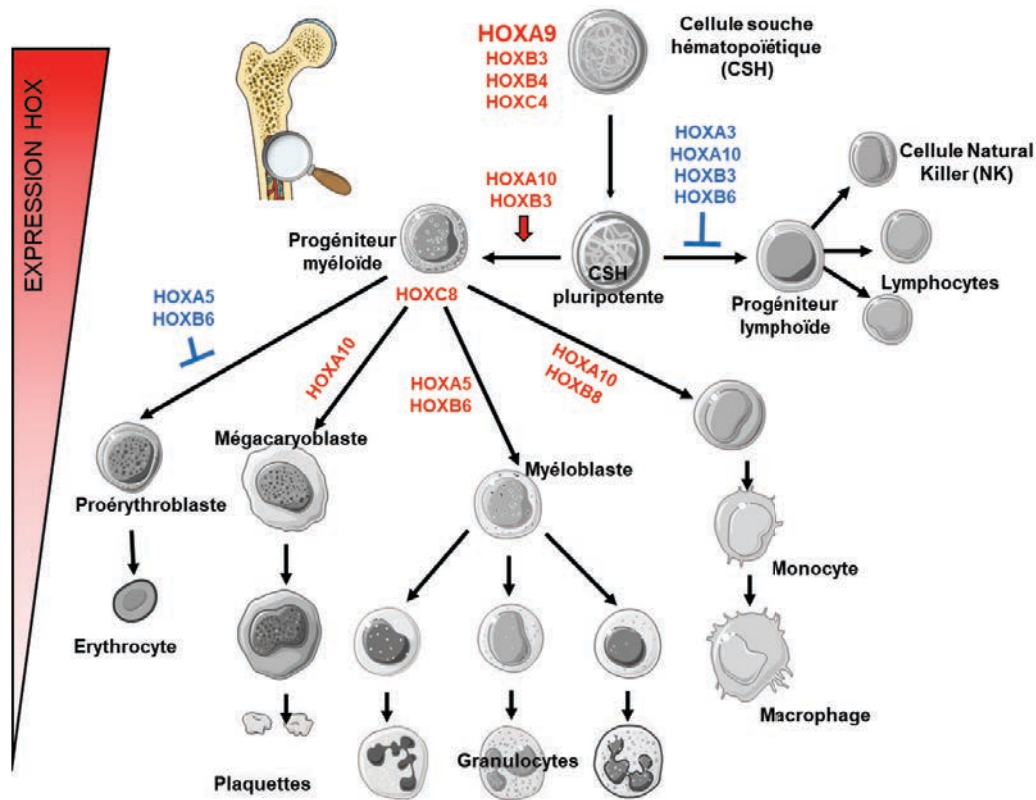


Figure 14 : Régulation de l'hématopoïèse par les facteurs HOX. Le lignage cellulaire est régulé positivement (rouge) ou négativement (bleu) par les gènes *HOX* dont l'expression diminue au cours de la différenciation cellulaire. Inspiré de Mahdipour & Mace 2011.

II.II) HOXA9, un facteur de transcription oncogène

II.II.A) HOXA9, oncogène leucémique

Les expériences menées dans le modèle murin BXH-2, souris développant spontanément des LAM par une intégration rétrovirale endogène, ont montré l'activation de la transcription et le rôle prépondérant de certains gènes *Hox* pour ce développement leucémique, et particulièrement d'*Hoxa9*, et du gène *Meis1* (Nakamura *et al.* 1996). De plus,

la transplantation de cellules surexprimant *Hoxa9* provoque l'apparition tardive de LAM suggérant la présence d'événements ultérieurs (Kroon *et al.* 1998).

HOXA9 est un marqueur pronostic défavorable des LAM (Golub *et al.* 1999; Andreeff *et al.* 2008) et est surexprimé dans ~70 % des LAM (**Figure 16**) (Braekeleer *et al.* 2014) associées, entre autres, à :

- un réarrangement de *MLL* (~5 %) (Faber *et al.* 2009) ;
- des mutations de *NPM1* (~55 %) (Alcalay *et al.* 2005) ;
- des translocations t(7;11)(p15;p15), *NUP98-HOXA9* (~2 %) (Ghannam *et al.* 2004) ;
- des translocations t(5;11), *NUP98-NSD1* (~1%) (Wang *et al.* 2007) ;
- une expression aberrante de *CDX* (Frohling *et al.* 2007) ou la translocation *CDX2-ETV6* (Chase *et al.* 1999);
- des translocations t(8;6) (*MYST3-CREBBP*) (1 %) (Camós *et al.* 2006) ;
- des translocations t(3;21) (*RUNX1-EVI1*) (Jin *et al.* 2007) ;
- des mutations de l'arginine 882 de *DNMT3A* (Koya *et al.* 2016) ;
- des mutations d'*EZH2* (Gao *et al.* 2016).

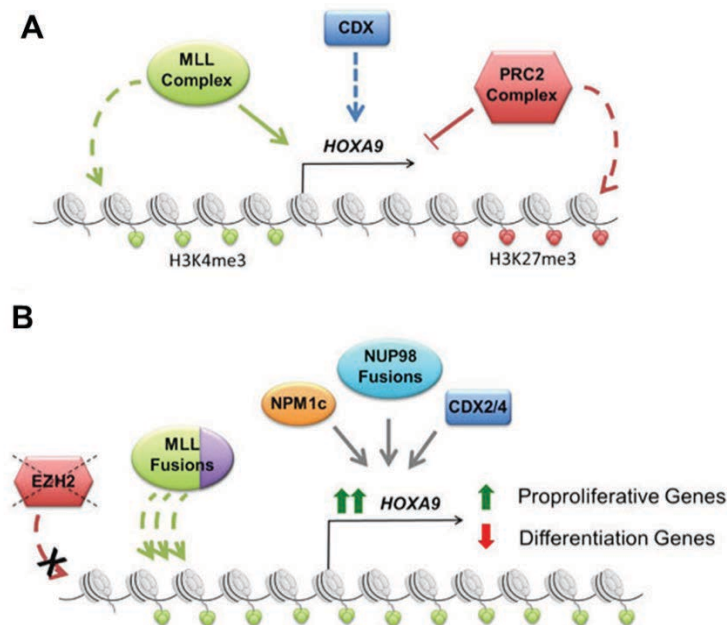


Figure 15 : Régulation d'*HOXA9* dans l'hématopoïèse normale *versus* LAM. **A.** Régulation de l'expression d'*HOXA9* au cours de l'hématopoïèse normale. **B.** Régulation de l'expression d'*HOXA9* dans les leucémies par des altérations épigénétiques (dérégulations d'*EZH2* et *MLL*) ou par d'autres mécanismes tels que les mutations de *NPM1*, les fusions *NUP98* ou les surexpressions de *CDX*. Tiré de Collins & Hess 2016.

HOXA9 est nécessaire pour la prolifération, le blocage de la différenciation et la malignité des cellules leucémiques (Chen *et al.* 2017). Le variant d'épissage *HOXA9T* a perdu sa capacité de liaison à l'ADN mais n'agit pas comme un dominant négatif. Au contraire, il supporte l'activité leucémogène d'HOXA9 (Stadler *et al.* 2014). En effet, de par son extrémité terminale conservée, HOXA9T est capable de se lier à des facteurs favorisant la transcription tels que les protéines CBP et joue le rôle de chaperon afin de permettre la transcription de gènes leucémogènes (Dintilhac *et al.* 2004). Une autre hypothèse de son support à la leucémogénie d'HOXA9 serait la liaison d'HOXA9T à CUL-4A dans le cytoplasme empêchant ainsi la dégradation d'HOXA9.

II.II.A.1) Anomalies associées à la surexpression d'HOXA9

II.II.A.1.1) Surexpression d'HOXA9 et réarrangement MLL

Les modifications épigénétiques peuvent forcer l'expression de gènes jusqu'alors réprimée, c'est notamment le cas dans les LAM associées à des réarrangements du gène *MLL*. Ces réarrangements génèrent une fusion entre la partie N-terminale de la protéine MLL contenant son domaine de fixation à l'ADN et la partie carboxy-terminale de son partenaire protéique (Muntean & Hess 2012).

Ces translocations représentent environ 5 % des LAM dans lesquelles on retrouve plus de 70 translocations différentes de *MLL* dont 9 majoritaires représentant 90 % des translocations *MLL* (*AF1p*, *AF4*, *AF6*, *AF9*, *AF10*, *AF17*, *ENL* et *SEPT7*) (Meyer *et al.* 2009). Ainsi, la protéine MLL va perdre son domaine SET et son domaine de liaison à ASB2, une ubiquitine ligase entraînant sa protéolyse. Les protéines de fusion générées ne seront alors pas dégradées (Muntean *et al.* 2010). Toutes les translocations *MLL* impactent l'expression des gènes du cluster *HOXA*, comme à titre d'exemple la fusion MLL-*AF9* régulant positivement l'expression de *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9* et *HOXA10* (Krivtsov *et al.* 2006) (**Figure 17**). Les translocations *MLL* impactent également l'expression de *MEIS1* généralement corrélée à celle d'*HOXA9* (Li *et al.* 2016). De plus, bien que le rôle du transcrit alternatif *HOXA9T* n'est pas clairement défini, il est co-surexprimé dans les LAM arborant des arrangements *MLL* (He *et al.* 2012).

Outre les fusions, il existe des duplications partielles en tandem dans la région 5' dans le sens 5' vers 3' appelées MLL-PTD initialement découvertes dans des cas de LAM *de novo*. Ces altérations sont retrouvées dans 4 à 8 % des LAM et sont associées à un mauvais pronostic. Il a clairement été montré qu'HOXA9 est nécessaire aux processus leucémogènes

des LAM de sous-type MLL-PTD car son inhibition réduit drastiquement la survie cellulaire (Gao *et al.* 2016) (**Figure 16**).

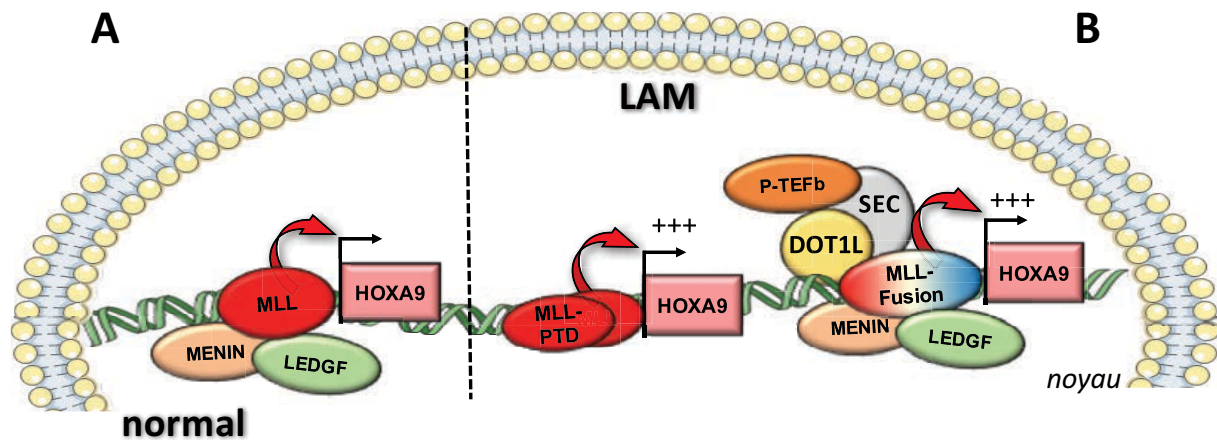


Figure 16 : Régulation de l'expression d'*HOXA9* par le complexe MLL réarrangé dans l'hématopoïèse normale *versus* dans les leucémies aigües myéloïdes. **A.** Régulation de l'expression d'*HOXA9* par le complexe MLL au cours de l'hématopoïèse normale. **B.** Régulation de l'expression d'*HOXA9* dans les LAM associées à des réarrangements MLL. Inspiré de Smith *et al.* 2011; Ilencikova & Kolenov 2013; Collins & Hess 2016.

II.II.A.1.2) Surexpression d'*HOXA9* et mutations de *NPM1*

Les mutations de *NPM1* sont généralement présentes dans les LAM *de novo* de l'adulte à caryotype normal et présentent une surexpression des gènes *HOX* et *MEIS1* (Alcalay *et al.* 2005). En condition normale, la protéine chaperonne Nucleophosmin 1 est localisée dans le noyau. Les mutations de *NPM1* provoquent une délocalisation de la protéine dans le cytoplasme entraînant une surexpression d'*HOXA9*, *HOXA10* et *MEIS1* par des mécanismes jusqu'alors inconnus (Mullighan *et al.* 2007).

Un des mécanismes envisagé est l'activation du complexe transcriptionnel P-TEFb (*Positive-Transcription elongation factor b*), partenaire du complexe MLL, qui induirait alors l'expression d'*HOXA9*. En effet, la protéine NPM1 cytoplasmique séquestrerait HEXIM1 qui lui-même séquestre normalement le complexe P-TEFb permettant ainsi l'action de ce dernier (Gurumurthy *et al.* 2008; Monroe *et al.* 2011). La protéine NPM1 est également impliquée dans le contrôle de la duplication des centrosomes et dans la stabilisation de P53. NPM1 régule la voie ARF-MDM2-P53 et sa mutation entrainerait une déstabilisation du complexe,

NPM1-muté se trouvant dans le cytoplasme, P53 serait séquestré par MDM2 (Colombo *et al.* 2002; den Besten *et al.* 2005; Korgaonkar *et al.* 2005) (**Figure 17**).

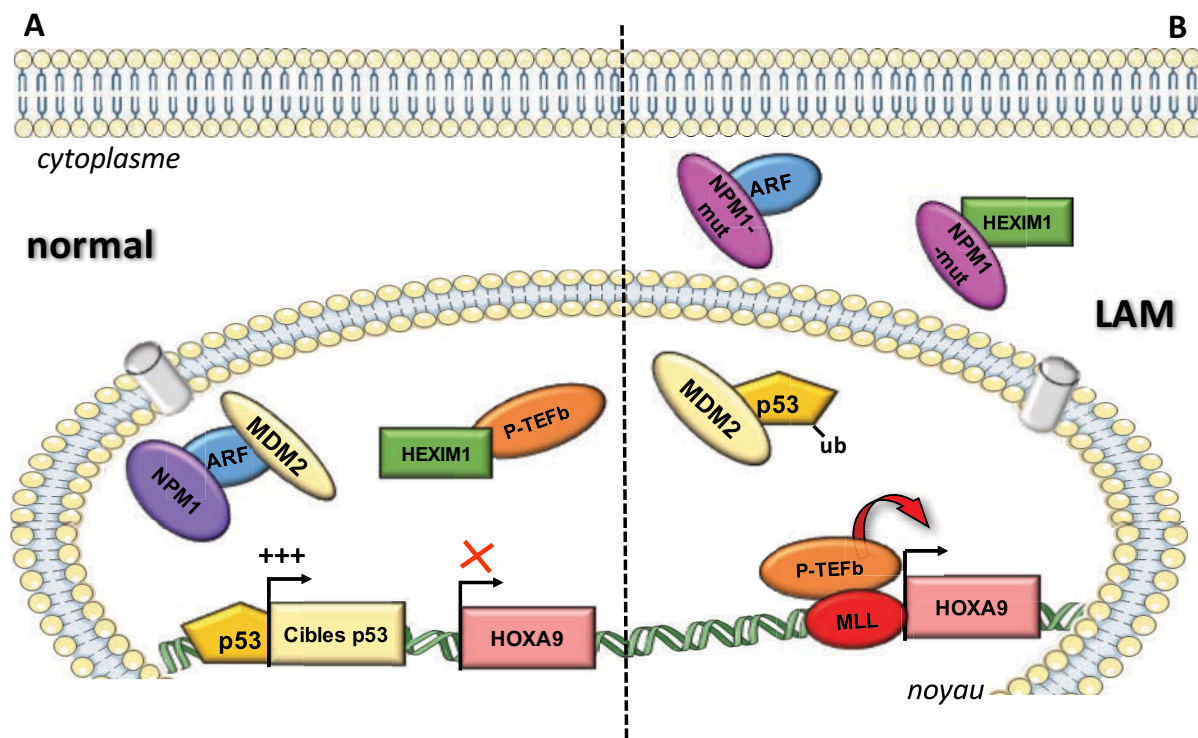


Figure 17 : Hypothèses de régulation de l’expression d’*HOXA9* dans les LAM associées aux dérégulations de *NPM1*. **A.** Régulation de l’expression d’*HOXA9* au cours de l’hématopoïèse normale. **B.** Régulation de l’expression d’*HOXA9* dans les LAM associées aux mutations de *NPM1*. Inspiré de Chen *et al.* 2006; Gurumurthy *et al.* 2008; Falini *et al.* 2009; Chen & Armstrong 2015.

II.II.A.1.3) Rôle de la protéine hybride *NUP98-HOXA9*

Le gène *NUP98* code une nucléoporine de 98 kDa associée au pore nucléaire. *NUP98* possède plusieurs domaines d’interaction avec des coactivateurs transcriptionnels, des ARN et ainsi qu’un domaine d’autoprotéolyse. Ses domaines d’interaction protéine/protéine riches en sites FG/GLFG (phénylalanine-glycine/glycine-leucine-phénylalanine-glycine) sont conservés dans l’ensemble des protéines de fusion impliquant *NUP98* (Griffis *et al.* 2002; Moore *et al.* 2007; Gough *et al.* 2011). Ce pore nucléaire permet le passage des protéines et des ARN du cytoplasme au noyau (Iwamoto *et al.* 2010).

Toutes les protéines de fusion *NUP98* conservent leur domaine N-terminal d’interaction à l’histone acétyl transférase CBP/p300 impliquée dans l’ouverture de la

chromatine. De plus, la protéine NUP98-HOXA9 est plus particulièrement capable de se lier directement à la chromatine *via* l'HD d'HOXA9 (Kasper *et al.* 1999) (**Figure 18**). Il a été montré que la protéine de fusion NUP98-HOXA9 induit l'apparition de syndromes myélodysplasiques précurseurs de LAM après un laps de temps assez long qui se trouve alors réduit par l'expression concomitante du facteur MEIS1 (Kroon *et al.* 2001; Calvo *et al.* 2002). La protéine de fusion NUP98-HOXA9 aurait une activité transcriptionnelle supérieure à la protéine HOXA9 de par sa stabilité (demi-vie 3 fois plus longue que les 26 h pour la protéine HOXA9) due à sa résistance à l'ubiquitinylation médiée par CUL-4A (Zhang *et al.* 2003).

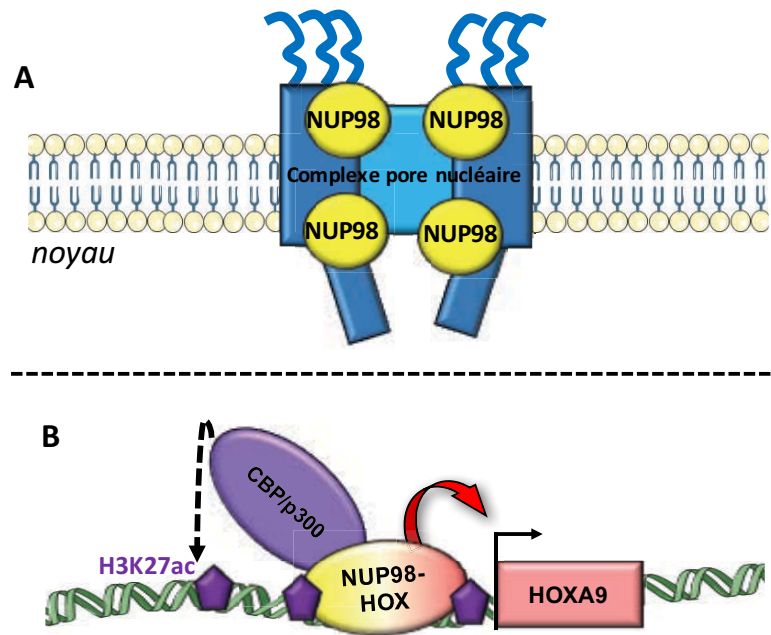


Figure 18 : Implication des protéines NUP98-HOX dans les LAM. **A.** Implication physiologique de la protéine NUP98 constituant le complexe du pore nucléaire **B.** Implication des protéines de fusion NUP98-HOX dans la régulation de l'expression d'*HOXA9*. Inspiré de Calvo *et al.* 2002; Köhler & Hurt 2010; Gough *et al.* 2011.

II.II.A.2) HOXA9 régule l'expression de gènes leucémogènes

Pour certains modèles de LAM, l'activité de liaison à l'ADN d'HOXA9 est responsable du blocage de la différenciation normale et du maintien de l'auto-renouvellement des progéniteurs. De plus, son inhibition induit la différenciation et la mort des cellules leucémiques. L'inactivité d'HOXA9 suffit à provoquer la perte de son effet leucémogène. Les cellules ne prolifèrent plus de manière incontrôlée, se différencient et meurent (Vijapurkar *et al.* 2004). Si ce concept a été clairement démontré dans certains sous-types de LAM, ce n'est pas le cas de tous pour lesquels il conviendrait de déterminer, si la surexpression est en lien

avec l'implication fonctionnelle d'HOXA9, et les mécanismes exacts mis en place conduisant au phénotype leucémique afin d'en identifier les effecteurs.

Des progrès ont été réalisés dans la compréhension de l'induction de la leucémogénèse médiée par HOXA9 par l'identification des sites de liaison d'Hoxa9 et Meis1. Une expérience de ChIP-sequencing utilisant des cellules de moelle osseuse murine transduites pour exprimer *Hoxa9* et *Meis1*, à l'aide de la coexpression d'un tag HA avec la protéine Hoxa9, a permis d'identifier des milliers de régions génomiques de liaison d'Hoxa9, de Meis1 ou des deux. Ces études ont également permis l'identification de plusieurs cibles pro-leucémiques d'Hoxa9 telles qu'*Erg* (*ETS-related gene*), *Flt3*, *Lmo2* (*LIM domain only 2*) et *c-Myb* (*myeloblastosis*) (Huang *et al.* 2012). Mais actuellement, les études de la liaison d'HOXA9 à l'échelle du génome sont rares et limitées aux modèles de surexpression ceci en raison du manque d'anticorps spécifiques reconnaissant la protéine HOXA9 endogène.

Des analyses transcriptomiques par puces à ADN ou RNA-seq dans des modèles de surexpression d'HOXA9 ou d'inactivation par ARN interférent ont mis en évidence des changements significatifs dans l'expression de certains gènes. Il a été retrouvé que, les gènes peuvent être activés ou réprimés de manière équivalente par HOXA9. De nombreuses cibles d'HOXA9 ont aussi été découvertes et étudiées de manière individuelle. C'est notamment le cas de *Lmo2*, *Bcl-2*, *Fgf2*, *Rac1*, *Igf1*, *Ink4a/b* et *c-Myb*. L'ensemble des gènes cibles d'HOXA9 connu à ce jour est répertorié dans le **tableau 6**.































Cibles connues d'HOXA9		Fonction	Implication	Régulées par HOXA9: Référence
	ALDH1A1 Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	<i>Enzyme</i>	Transformation rétinol en acide rétinoïque	Dorsam 2004
	ARF1 ADP-ribosylation factor 1	<i>Activateur phospholipase D</i>	Trafic vésiculaire	Dorsam 2004
	BIM,BCL2L11 Bcl-2-like protein 11	<i>Enzyme</i>	Mort cellulaire programmée	Nagel, 2010
	BMI1, PCGF4 Polycomb group RING finger protein 4	<i>Facteur de transcription</i>	Cycle cellulaire	Dorsam 2004
	BCL2 B-cell lymphoma 2	<i>Protéine mitochondriale</i>	Survie cellulaire	Brumati, 2013
	CCL4 Chemokine (C-C motif) ligand 4	<i>Cytokine</i>	Inflammation	Huang, 2012
	CD33, CD34, CD36 Cluster of differentiation	<i>Récepteurs membranaires</i>	Phagocytose Différenciation	Huang, 2012; Dorsam 2004
	CDK7 Cell division protein kinase 7	<i>Enzyme</i>	Cycle cellulaire	Dorsam 2004
	CDX4 Caudal type homeobox 4	<i>Facteur de transcription</i>	Développement, différenciation	Bei, 2014
	CREB1 CAMP responsive element binding protein 1	<i>Facteur de transcription</i>	Métabolisme	Hu, 2009
	CYBB Cytochrome b-245 heavy chain	<i>Enzyme</i>	Métabolisme, espèces réactives oxygène	Bei, 2005
	ERG ETS-related gene	<i>Facteur de transcription</i>	Prolifération, différenciation, hématopoïèse	Huang, 2012
	FGF2 Basic fibroblast growth factor	<i>Facteur de croissance</i>	Différenciation	Shah, 2012
	FLT3 Fms-like tyrosine kinase 3	<i>Récepteur tyrosine kinase</i>	Mort cellulaire	Takeda, 2006; Huang, 2012; Gwin, 2010
	HOX Homeobox protein	<i>Facteur de transcription</i>	Prolifération, différenciation dans hématopoïèse	Faber, 2009; Takeda, 2006
	ID2 DNA-binding protein inhibitor ID-2	<i>Facteur de transcription</i>	Différenciation	Dorsam 2004
	IFN et partenaires Interferon	<i>Cytokine</i>	Inflammation	Takeda, 2006
	IGF1 Insulin-like growth factor-1	<i>Hormone</i>	Métabolisme	Steger, 2015
	IGF1R Insulin-like growth factor-1 receptor	<i>Récepteur tyrosine kinase</i>	Croissance cellulaire	Whelan, 2008
	IGF2R Insulin-like growth factor-2 receptor	<i>Récepteur membranaire</i>	Transport lysosomal	Dorsam 2004
	IRX3 Iroquois-class homeodomain protein	<i>Facteur de transcription</i>	Développement	Dorsam 2004; Takeda, 2006
	JUN Complexe AP1	<i>Facteur de transcription</i>	Cycle cellulaire	Huang, 2012
	KIT, CSFR Mast/stem cell growth factor receptor	<i>Récepteur tyrosine kinase</i>	Prolifération, différenciation	Takeda, 2006
	LMO2 LIM domain only 2	<i>Facteur de transcription</i>	Hématopoïèse	Calero-Nieto, 2013; Huang, 2012
	MAFB V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	<i>Facteur de transcription</i>	Différenciation myéloïde	Dorsam 2004
	MEF2C Myocyte-specific enhancer factor 2C	<i>Facteur de transcription</i>	Différenciation myéloïde	Takeda, 2006
	MEIS1 Homeobox protein Meis1	<i>Co-facteur</i>	Prolifération, différenciation dans hématopoïèse	Hu, 2009; Takeda, 2006
	MYB Myeloblastosis family	<i>Facteur de transcription</i>	Développement cardiaque	Hess, 2006; Dasé, 2012 Negi 2017
	MYC C-MYC	<i>Facteur de transcription</i>	Prolifération, différenciation cellulaire	Dorsam 2004
	P21, CDKN1 Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	<i>Inhibiteur de kinase</i>	Cycle cellulaire	Bromleigh, 2000; Takeda, 2006
	PIM1 Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	<i>Enzyme</i>	Cycle, mort cellulaire	Dorsam 2004; Hu, 2007
	PKNOX1 PBX/knotted 1 homeobox 1	<i>Facteur de transcription</i>	Développement	Hu, 2009
	RUNX3 Runt-related transcription factor 3	<i>Facteur de transcription</i>	Prolifération, mort cellulaire	Huang, 2012
	SOX4 SRY-related HMG-box	<i>Facteur de transcription</i>	Développement	Takeda, 2006; Huang, 2012
	SYK Spleen tyrosine kinase	<i>Récepteur tyrosine kinase</i>	Développement, hématopoïèse	Mohr, 2017
	TCF4 Transcription factor 4	<i>Facteur de transcription</i>	Développement	Huang, 2012
	VAV2 Guanine nucleotide exchange factor VAV2	<i>Transporteur</i>	Migration	Breitinger, 2002

Tableau 6 : Tableau des gènes cibles d'HOXA9 décrits dans la littérature, fonctions et implications.

Les cibles d'HOXA9 décrites dans la littérature, leur fonction et leur implication sont indiquées dans le tableau, ainsi que les références bibliographiques démontrant leur régulation par HOXA9.

INFOS TECHNIQUES

Analyse de l'activité transcriptionnelle

Tests luciféras : Utilisation d'un gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'une séquence promotrice régulée par le facteur de transcription étudié.

Puces à ADN : « DNA chip, DNA-microarray, biochip » sont un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique permettant d'analyser le niveau d'expression des transcrits des gènes.

RT-qPCR : PCR quantitative à partir d'un échantillon d'ARN.

ChIP, ChIP-sequencing, ChIP-on-ChIP : L'immunoprécipitation de la chromatine est une méthode qui permet de déterminer les sites de liaison d'une protéine d'intérêt à l'ADN, sur une séquence connue (ChIP-qPCR), sur l'ensemble du génome (ChIP-sequencing), par la combinaison de puces à ADN (ChIP-on-ChIP).

Analyse protéique et analyse des interactions protéine-protéine/protéine-ADN

Western-Blotting : Détection et identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique.

Spectrométrie de masse : Détection et identification des molécules d'intérêt par mesure de leur masse et caractérisation de leur structure chimique.

GST-pull-down : Glutathione-S-transferase fusionnée à la protéine d'intérêt, permet de concentrer les protéines afin de les étudier ou d'étudier les interactions protéine-protéine.

EMSA : Electrophoretic mobility shift assay, permet de détecter une interaction entre une protéine et de l'ADN ou de l'ARN (ou avec une sonde oligonucléotidique).

REFERENCES : Méthodes d'analyses (en gras, méthodes d'analyses des interactions directes à l'ADN)

Bromleigh & Freedman 2000: Tests luciféras, GST-pull-down réalisés sur la lignée U937 surexprimant *HOXA10*.

Dorsam et al. 2004: Puces à ADN réalisées sur les lignées leucémiques U937, JURKAT et K562 surexprimant *HOXA9*.

Bei et al. 2005, 2014: EMSA, Western-blot, ChIP sur des cellules U937 surexprimant *HOXA9*.

Hess et al. 2006: RT-qPCR sur des cellules de moelle osseuse exprimant MLL-ENL et surexprimant ou non *HOXA9*.

Ghannam et al. 2004: Puces à ADN sur des cellules CD34+ exprimant NUP98-*HOXA9*.

Whelan et al. 2008: RT-qPCR sur des cellules progénitrices de la lignée lymphocytaire B exprimant *HOXA9*

Faber et al. 2009: Puces à ADN réalisées sur la lignée MOLM-14 knock-down *HOXA9* par shRNA.

Hu et al. 2009: ChIP-on-chIP sur des cellules de moelle osseuse de souris *Hoxa9*^{-/-} ou WT.

Nagel et al. 2010: RT-qPCR sur des cellules JURKAT surexprimant *HOXA9*.

Gwin et al. 2010: ChIP sur des cellules progénitrices lymphoïdes exprimant *HOXA9*.

Shah et al. 2012: ChIP, EMSA sur des cellules U937 surexprimant *HOXA9*.

Dassé et al. 2012: ChIP sur des cellules HPC7, cellules embryonnaires hématologiques Knock-down *HOXA9* par shRNA.

Huang et al. 2012: ChIP-seq sur des cellules de moelle osseuses de souris exprimant le facteur *HOXA9* taggué -HA.

Brumatti et al. 2013: Western-blot sur des cellules de moelle osseuses de souris exprimant le facteur *HOXA9* taggué.

Breitinger et al. 2013: ChIP sur des cellules de moelle osseuses de souris exprimant le facteur *HOXA9* taggué -HA.

Calero-Nieto et al. 2013: Puces à ADN et ChIP-on-ChIP sur des cellules de moelle osseuse CD34+ exprimant MLL-ENL et surexprimant ou non *HOXA9*.

Steger et al. 2015: ChIP sur des cellules de moelle osseuses de souris exprimant le facteur *HOXA9*.

Mohr et al. 2017: Spectrométrie de masse sur des cellules de moelle osseuse surexprimant *Hoxa9*.

Negi et al. 2017: RT-qPCR sur des cellules de moelle osseuse surexprimant *HOXA9*.

II.II.A.3) Des cofacteurs qui accentuent le développement des leucémies

Tout comme *HOXA9*, l'activité leucémogène de *MEIS1* a été découverte grâce à des expérimentations *in vivo* dans des souris BXH-2, modèle d'insertion pro-virale pour lequel 15 % des LAM induites sont causées par l'insertion pro-virale dans le locus du gène *MEIS1* (Moskow *et al.* 1995). Tout comme celle d'*HOXA9*, son expression décroît au cours de la différenciation des cellules sanguines. *In vivo*, la présence d'*HoxA9* exprimé seul dans les cellules isolées de moelle osseuse murine ne suffit pas à induire rapidement une leucémie (> 6 mois) alors qu'en coexpression avec *Meis1* cette période est largement raccourcie (67 jours environ), tandis que *Meis1* seul n'induit pas de leucémie (Kroon *et al.* 1998). Ces résultats montrent le rôle de *Meis1* comme accélérateur de la leucémie induite par *Hoxa9*.

Il existe une corrélation entre l'expression de *MEIS1* et celle d'*HOXA9* suggérant une action temporelle parallèle ou commune de ces facteurs (Nakamura *et al.* 1996; Hurley 2002; Thorsteinsdottir *et al.* 2002). Si *MEIS1* est nécessaire à l'induction rapide de la leucémie *via* l'action d'*HOXA9*, c'est également le cas de *PBX3* dont l'expression est aussi fortement corrélée avec celle d'*HOXA9*, notamment dans des sous-types de leucémies à caryotype normal associées à des réarrangements du gène *MLL*. La surexpression de *PBX3* et d'*HOXA9* favorise ainsi la survenue et l'implantation de LAM (Li *et al.* 2016) (**Figure 19**).

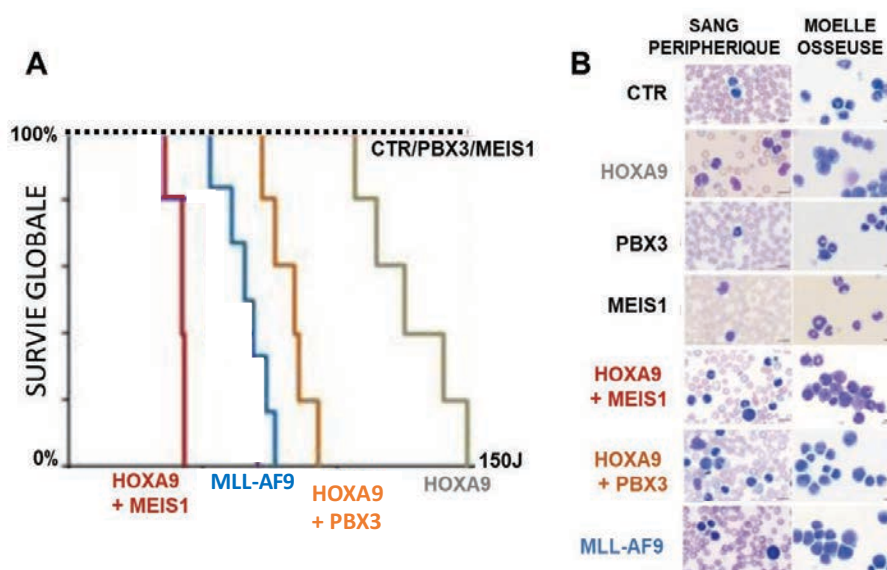


Figure 19 : Accélération de l'induction de la leucémie *in vivo* par la co-expression d'*HOXA9* et de ses cofacteurs *PBX3* et *MEIS1*. A. Survie de souris C57BL/6 âgées de 8 à 10 semaines transplantées de cellules issues de moelle osseuse de souris C57BL/6 cotransduites par des rétrovirus pour l'expression d'*HOXA9* et/ou ses cofacteurs ou de *MLL-AF9* B. Morphologie cellulaire du sang périphérique et de la moelle osseuse colorée au Wright-Giemsa montrant des profils d'envahissement similaires pour les groupes *HOXA9+PBX3* ou *HOXA9+MEIS1*. Modifié de Li *et al.* 2016.

II.II.B) Implication d'*HOXA9* dans les autres cancers

II.II.B.1) Hémopathies malignes

Les syndromes myélodysplasiques sont caractérisés par une production insuffisante de cellules sanguines matures (Gill *et al.* 2016). Certaines altérations moléculaires des SMD entraînent une surexpression du gène *HOXA9* (Heinrichs *et al.* 2005) telles que des translocations NUP98-HOX (Hatano *et al.* 1999; Slape *et al.* 2008) ou des altérations de *AXLS1* (*addition of sex combs like1*), une protéine du complexe PRC2, conduisant alors à une perte de la marque H3K27me3 inhibitrice du cluster du gène *HOXA* (Abdel-Wahab *et al.* 2012).

La surexpression d'*HOXA9* est également retrouvée dans 25 % des LAL dont les réarrangements CALM-AF10, E1A-PBX1 ou TCR-*HOXA9* (Soulier *et al.* 2005; Speleman *et al.* 2005) mais également dans les LAL associées aux translocations de *MLL* (Ferrando *et al.* 2003).

Le myélome multiple se caractérise par la multiplication de plasmocytes anormaux dont le rôle est de produire des anticorps. Les gènes *HOXA* sont dérégulés dans 10 % des cas (Hudlebusch *et al.* 2004) et en particulier *HOXA9*. L'inhibition de son expression par ARN interférent entraîne le ralentissement de la prolifération de lignées de myélome multiple associé à un remodelage chromatinien caractérisé par une diminution des marques H3K27me3 au niveau du locus *HOXA* (Chapman *et al.* 2009).

II.II.B.2) Cancers solides

Des surexpressions d'*HOXA9* ont également été décrites dans les tumeurs solides (Shah & Sukumar 2010) : les carcinomes ovariens (Cheng *et al.* 2005a; Ko *et al.* 2012), les cancers du poumon (Rauch *et al.* 2007), les carcinomes rénaux à cellules claires (Pires-Luís *et al.* 2017), les carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale (Yamatoji *et al.* 2010), les glioblastomes (Gonçalves *et al.* 2015), les cancers du pancréas (Fu *et al.* 2017) et les cancers de la prostate (Malek *et al.* 2017).

L'expression d'*HOXA9* est relativement faible dans les cancers du sein et le niveau de méthylation de son promoteur est associé à un pronostic défavorable pour la survie des patients (Park *et al.* 2017). Dans ces cancers, *HOXA9* agirait à l'inverse comme un

suppresseur de tumeur en régulant l'expression de *BRCA1* (*breast cancer 1*) (Gilbert *et al.* 2010).

Les cofacteurs d'*HOXA9* sont également impliqués dans les tumeurs solides. C'est notamment le cas de *PBX3*, responsable de la prolifération de cellules de gliome (Xu *et al.* 2017), dans les tumeurs gastriques où les niveaux d'expression d'*HOXA9* et de *PBX3* sont particulièrement élevés (Ma *et al.* 2017). Il en est de même pour les cancers de la prostate (Ramberg *et al.* 2016) et colorectaux (Han *et al.* 2014).

II.III) Essais de ciblage d'*HOXA9*

Le ciblage d'un facteur de transcription peut être direct ou indirect (Bouhleb *et al.*, 2015). Actuellement, ces deux stratégies de ciblage, l'une directe et l'autre indirect, ont été décrites dans la littérature pour le ciblage d'*HOXA9*.

II.III.A) Ciblage indirect d'*HOXA9*

Une stratégie de traitement de la leucémie par ciblage indirect a été développée par induction de la maturation ou de la différenciation de cellules blastiques leucémiques par l'administration de l'inhibiteur de DOT1L (pinometostat). Recruté par le complexe MLL, DOT1L est une histone méthyltransférase qui catalyse la méthylation du résidu lysine 79 de l'histone H3 (H3K79me₂), une marque d'histone activatrice. Ainsi, son inhibition conduit à la réduction de l'activité transcriptionnelle d'*HOXA9* et de son partenaire *MEIS1* (Daigle *et al.* 2011, 2013).

Une autre méthode a également été développée : il s'agit de petites molécules empêchant l'interaction MENIN/MLL nécessaire à l'induction des leucémies dans les LAM associées aux translocations de *MLL* (Grembecka *et al.* 2012; Shi *et al.* 2012). Ces composés se sont avérés efficaces *in vivo*. Deux prodrogues ont été évaluées et ont montré des effets significatifs *in vitro* et *in vivo* sur des modèles cellulaires MLL mais également sur des blastes de patients LAM (Borkin *et al.* 2015). De plus, il a été montré sur des modèles de cellules primaires de LAM qu'un traitement combinant inhibiteur de DOT1L et inhibiteur de MENIN (*multiple endocrine neoplasia type 1*) montre des effets complémentaires conduisant à la différenciation et à la mort des cellules leucémiques (Dafflon *et al.* 2017) (**Figure 20**).

II.III.B) Ciblage direct d'HOXA9

Nous avons vu l'importance de l'interaction d'HOXA9 avec ses cofacteurs dans l'induction des leucémies. De ce fait, une stratégie directe a été développée avec un peptide synthétique appelé HXR9. Ce peptide agit au niveau de l'interaction protéine/protéine empêchant l'interaction des protéines HOX avec leurs cofacteurs PBX. (**Figure 20**) Le peptide HXR9 et ses dérivés ne sont toutefois pas capables de discriminer les différents couples HOX/PBX et sont efficaces sur bon nombre d'entre eux.

Ce peptide a jusqu'alors été évalué *in vitro* et *in vivo* pour la modulation du phénotype tumoral de mélanomes, cancers du poumon, de la prostate, de cancers ovariens, myélomes, cancers du sein et de leucémies associées à des réarrangements du gène *MLL* (Morgan *et al.* 2017). HXR9 bloque l'interaction d'HOXA9 avec son cofacteur PBX conduisant à une répression de l'expression de p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) et l'induction de la mort des cellules par nécroptose (Alharbi *et al.* 2017). Il n'existe pas à l'heure actuelle de petite molécule développée en clinique capable d'inhiber l'interaction protéine-protéine du complexe HOX/PBX.

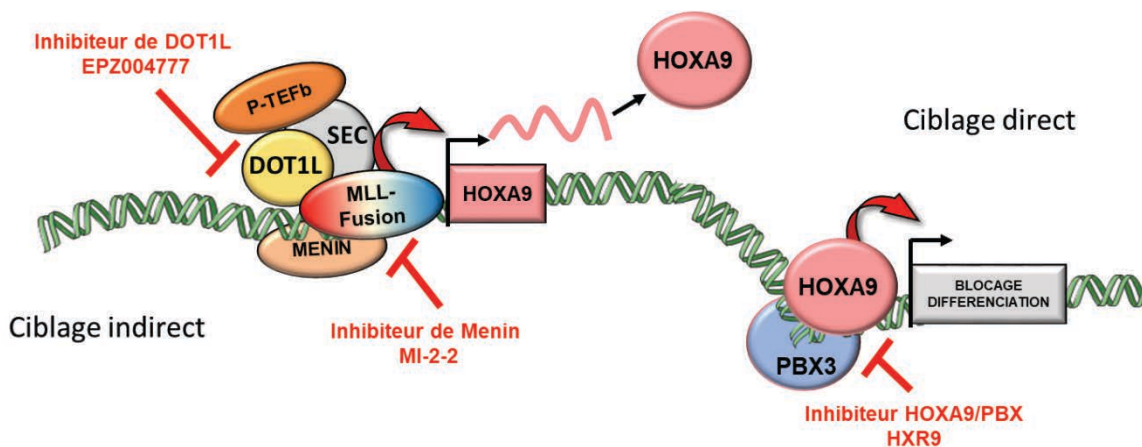


Figure 20 : Essais de ciblage du facteur de transcription HOXA9 de manière indirecte ou directe.

III) Nouvelle stratégie de ciblage du facteur de transcription HOXA9

III.I) Stratégies de ciblage de facteurs de transcription par compétition directe de la liaison à l'ADN

Les facteurs de transcription sont impliqués dans un grand nombre de cancers (Bhagwat & Vakoc 2015) et, à l'exception de récepteurs nucléaires inductibles par un ligand, ils ont longtemps été considérés comme des cibles inaccessibles.

Les avancées, en termes de connaissances structurales et d'interaction à l'ADN des facteurs de transcription, ont permis de développer de nouvelles stratégies de ciblage, soit en bloquant les interactions protéine/protéine, par exemple par le développement de nouvelles molécules telles que la Nutlin3 empêchant l'interaction P53/MDM2 (Kalmodia *et al.* 2017) soit en ciblant le facteur de transcription lui-même pour empêcher sa liaison à l'ADN (Yeh *et al.* 2013) comme des pyrrole-imidazole polyamides pour le traitement des cancers (Kurmis *et al.* 2017). Ces molécules se lient dans le petit sillon de l'ADN et inhibent l'activité de l'ARN polymérase II. Ces composés sont évalués, entre autres, pour le traitement des myélomes multiples (Mysore *et al.* 2016), le cancer colorectal (Lin *et al.* 2016) ou de la prostate (Kurmis *et al.* 2017). Ces diverses stratégies sont présentées dans la revue :

Targeting Transcription Factor Binding to DNA by Competing with DNA Binders as an Approach for Controlling Gene Expression.

Bouhleb M. Amine, Lambert Mélanie et David-Cordonnier Marie-Hélène ; publiée dans Current Topics in Medicinal Chemistry en 2015.

(Annexe I)

Une autre stratégie envisageable est le ciblage spécifique et direct de l'ADN par de petites molécules afin d'empêcher la liaison de facteurs de transcription. C'est notamment le cas des polyamines, composés hétérocycliques inspirés de l'activité de la netropsine et de la distamycine qui sont des composés naturels capables de cibler des séquences riches en paires de bases AT au niveau du petit sillon de l'ADN (Coll *et al.* 1989; Pelton & Wemmer 1989).

Les polyamines interagissent avec le petit sillon en dimère (grâce à des linkers intramoléculaires les reliant) et sont capables de discriminer les paires de bases CG de GC et TA de AT (Mrksich *et al.* 1992). Pour exemple, ce type de molécule a permis à ce jour de moduler *in vitro* l'interaction du facteur de transcription EVI1 (*ecotropic virus integration site1*) impliqué dans les LAM (Zhang *et al.* 2011; Syed *et al.* 2014). Il a été montré récemment que la désactivation du cluster RUNX à l'aide de polyamides pyrrole-imidazole conjugués à un agent alkylant, conçus pour se lier spécifiquement aux séquences de liaison RUNX, était très efficace contre les cellules AML *in vivo* (Morita *et al.* 2017).

D'autres molécules appelées « composés DB » (pour les initiales du Pr. **David Boykin** qui les a développés) plus petites que les polyamines, dérivent d'un point de vue structural de la netropsine et de la distamycine et fixent le petit sillon de l'ADN. Ces composés DB se sont avérés être d'efficaces compétiteurs des facteurs de transcription PIT-1 et BRN-3 (Peixoto *et al.* 2008) de même qu'ERG et PU.1 (Nhili *et al.* 2013; Munde *et al.* 2014a). Récemment, il a été montré *in vivo* dans des modèles murins transplantés de lignées humaines LAM que le traitement avec des molécules DB inhibiteurs de l'interaction à l'ADN spécifiques du facteur de transcription PU-1 diminuait l'envahissement des organes par les cellules leucémiques et augmentait la survie des souris. Aussi, ces études montrent que l'inhibition de facteurs de transcription par ces composés DB a un réel potentiel thérapeutique dans les LAM (Antony-Debré *et al.* 2017).

III.II) Ciblage direct de l'interaction HOXA9/ADN par des composés DB

Les dérivés DB sont des analogues des composés bérénil et pentamidine pour la présence de 2 groupements amidines terminaux. Les composés DB comptent plus de 2 700 dérivés différents par leur structure centrale et latérale différente. Les premiers composés ont été développés pour leur activité anti-parasitaire *via* une fixation AT-riche comme celle de la pentamidine couramment utilisée dans le traitement de la maladie du sommeil (Bouteille *et al.* 2003). Puis, les chimistes ont voulu développer de nouveaux composés reconnaissant des séquences plus diverses et plus sélectives.

III.II.A) Activité anti- parasitaire

III.II.A.1) Développement de molécules pour lutter contre la trypanosomiase africaine

La trypanosomiase africaine, encore appelée maladie du sommeil, est transmise par piqûre de la mouche tsé-tsé. Elle est causée par deux formes parasitaires : *Trypanosomia brucei ssp. gambiense* (associée à une forme chronique présente surtout en Afrique occidentale et centrale) et *Trypanosomia brucei ssp. rhodiense* (associée à une forme aigue retrouvée surtout en Afrique orientale). Le parasite atteint progressivement le sang circulant au cours de la phase d'incubation puis accède au système nerveux central. (**Figure 21**)

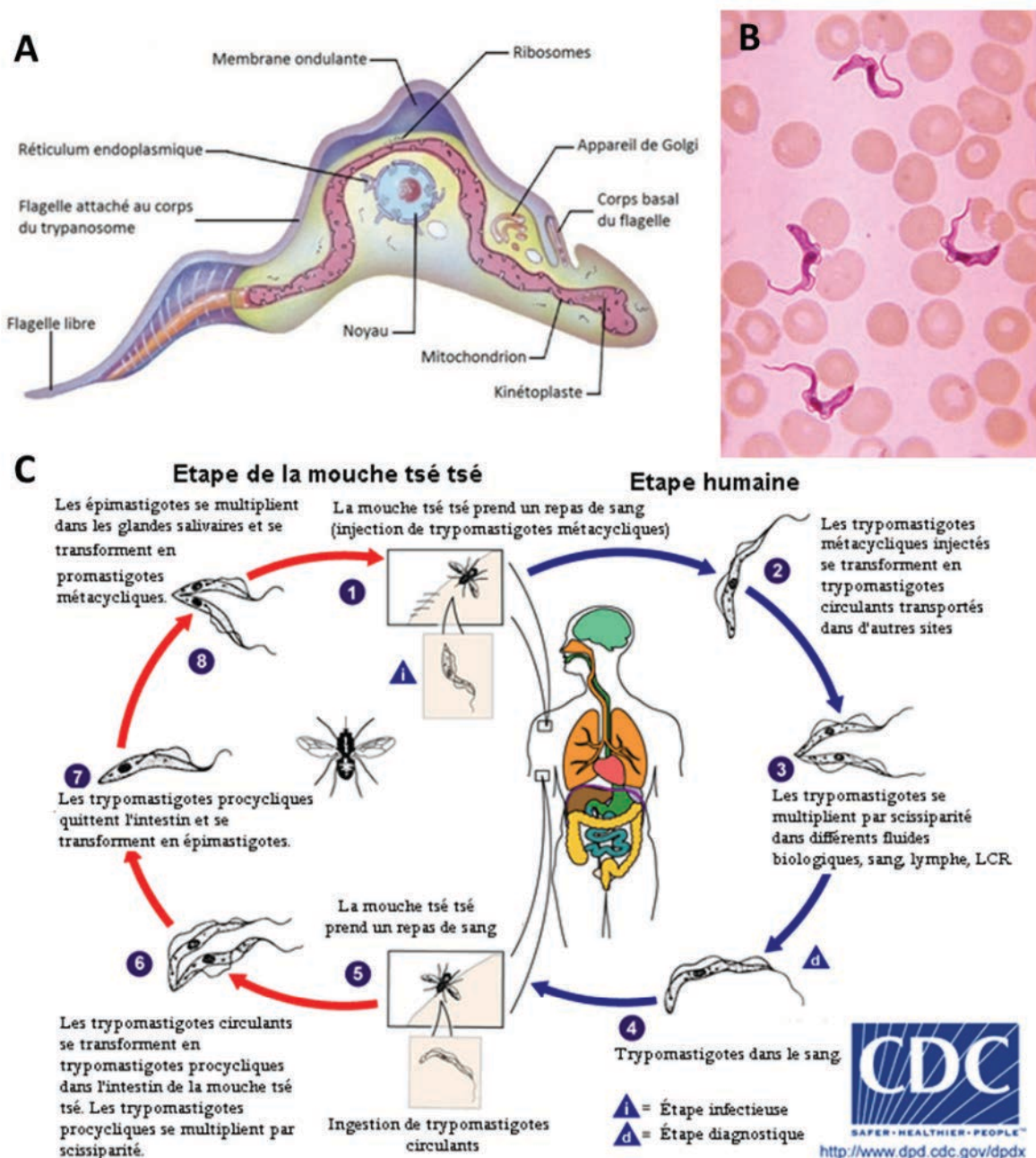


Figure 21 : La trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil. **A.** Représentation schématique de la structure du *Trypanosoma brucei gambiense* **B.** Fixation et coloration au Whrigh-Giemsa de sang de patient atteint de cette maladie. Le trypanosome apparaît comme un élément allongé muni d'un noyau rouge médian et d'un petit point rouge à l'une de ses extrémités : le kinétoplaste d'où part un flagelle. Image issue de : <http://trypanosomiase.blogspot.fr/2015/12/morphologie>. **C.** Cycle de vie du parasite. Tiré de Jensen & Englund 2012.

L'atoxyle fut le premier composé utilisé dans le traitement de la trypanosomiase et fut remplacé par la suramine et le mélarsoprole, composés aux effets secondaires moindres. Le mélarsoprole est administré au stade final de la maladie pour sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique. La pentamidine est actuellement utilisée en clinique malgré son manque de biodisponibilité orale et ses effets secondaires toxiques (Jannin & Cattand 2004) (**Figure 22**).

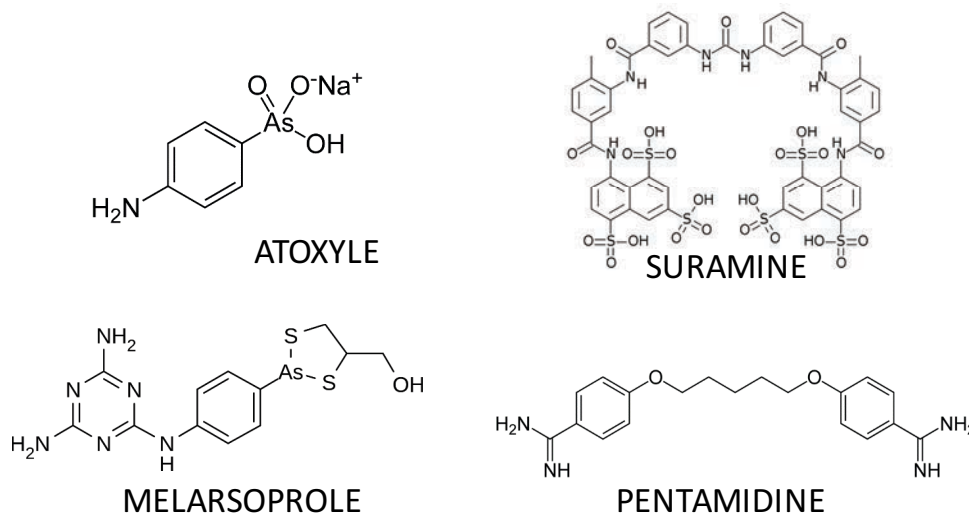


Figure 22 : Structure des composés administrés pour le traitement de la maladie du sommeil.

C'est pour cela que d'autres composés analogues ont été développés : les composés hétérocycliques diamidines DB. Des milliers de structures sont synthétisables en jouant sur les cycles et les groupements ou les atomes substitués ; en outre leur position en méta-, para- ou ortho-, confère à la plupart de ces molécules une structure convexe spécifique du petit sillon de l'ADN.

III.II.A.2) Mode d'action anti-parasitaire

L'étude de la distribution cellulaire des furamidines s'est avérée facilitée par leur fluorescence intrinsèque. De nombreux transporteurs permettraient l'entrée des composés dans le parasite, tels que les transporteurs adénosines/aminopurines P2, qui mutés, entraînent une résistance au DB75 chez *Trypanosoma brucei*. D'autres transporteurs entrent en jeu, comme cela a été montré pour la pentamidine avec les transporteurs HAPT1 (*high affinity pentamidine transporter 1*) et LAPT1 (*low affinity pentamidine transporter 1*) (Carter *et al.* 1995; de Koning & Jarvis 2001; Bray *et al.* 2003).

Si la caractérisation de leurs transporteurs n'a pas été clairement établie, leur fluorescence intrinsèque a permis de mettre en évidence une accumulation rapide au sein du noyau et du kinétoplaste du parasite. Le kinétoplaste est composé de 2 types d'ADN circulaires : les mini- et maxi-cercles caractérisés par leur taille et la structure convexe de l'ADN générée par la présence de sites riches en paires de bases AT (Jensen & Englund 2012). Rapidement, les composés se localisent dans le kinétoplaste et disparaissent 24 h post-traitement à cause de la dégradation de l'organite (Mathis *et al.* 2006) (**Figure 23**). Les mécanismes conduisant à la dégradation du kinétoplaste n'ont pas été clairement établis mais pourraient être la conséquence d'une inhibition directe de l'activité de la topoisomérase II ou d'une modification de la conformation de l'ADN entraînant des erreurs de réplication ou l'inhibition de protéines interagissant avec l'ADN (Shapiro & Englund 1990; Bailly *et al.* 1999).

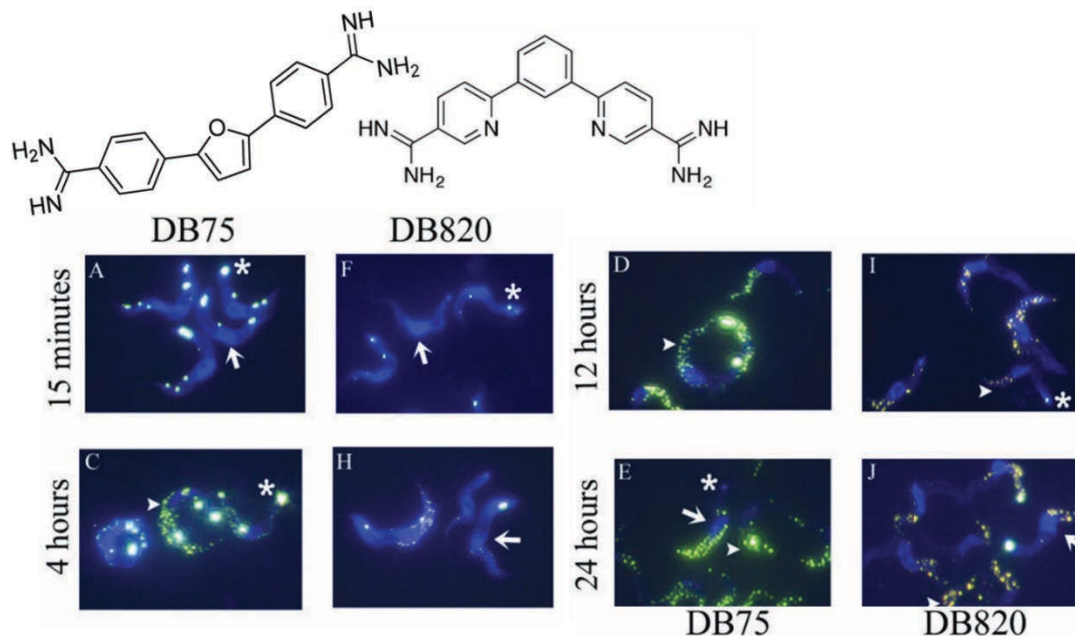


Figure 23 : Détection par microscopie de fluorescence de la localisation des composés DB75 et DB820 dans le parasite *Trypanosoma brucei* à différents temps après injection intra-veineuse des composés dans des souris infectées. Le noyau du parasite est indiqué par une flèche blanche et le kinétoplaste par un astérisque. Tiré de Mathis *et al.* 2006.

III.II.A.3) Développement clinique

Les composés DB75 et DB820 ont fait l'objet d'études cliniques. Du fait de leur hydrophilie, leur biodisponibilité par voie orale est faible. C'est pourquoi, afin de pallier à l'administration intraveineuse, des pro-drogues ont été développées pour une utilisation *per*

os. Des concentrations en DB75 suffisantes dans le sang pour l'induction de la mort du parasite sont quantifiées après conversion de la pro-drogue DB289 (**Figure 24**). Ces composés ont été évalués par voie intraveineuse ou orale sur des modèles murins et par voie orale sur des singes vervets infectés par *T. brucei* ; leur effet a été confirmé (Ansede *et al.* 2004; Thuita *et al.* 2008a, b, 2012; Mdachi *et al.* 2009). Le DB289 est entré en phase d'essais cliniques I/II (2001-2004) et III (2006-2008). Plus de 300 patients ont pu être traités. En 2008, une étude supplémentaire de phase I a été initiée pour compléter l'évaluation de sécurité. Malheureusement, des toxicités hépatiques et rénales ont été rapportées et seraient corrélées à un métabolisme altéré lié à des polymorphismes chez les patients de certaines populations d'Afrique noire (Harrill *et al.* 2012).

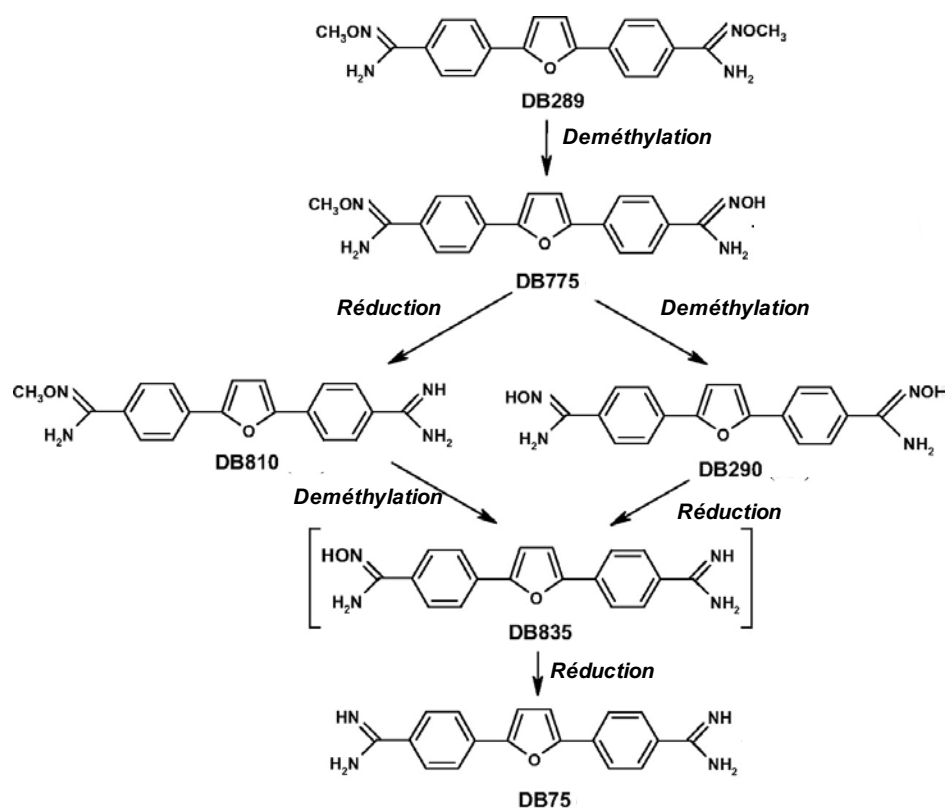


Figure 24 : Bioconversion du DB289 en DB75 chez le rat et le singe. Tiré de Midgley *et al.* 2007.

Le DB844 est la pro-drogue du DB820 qui, contrairement à son analogue DB75, a la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique pour cibler le parasite dans le cerveau au stade évolué de la maladie (Sturk *et al.* 2004; Ansede *et al.* 2005) (**Figure 25**). Tout comme les DB289 et DB75, ces composés se sont avérés efficaces par voie intraveineuse ou oralement, respectivement, sur des modèles murins et des singes vervets infectés par *T.*

brucei. Cependant, ils n'ont pas été testés en clinique car la dose administrable n'offrait pas une fenêtre thérapeutique suffisante (Thuita *et al.* 2012).

Un autre composé est actuellement à l'étude *in vivo* pour le traitement de la trypanosomiase africaine, le DB868 pro-drogue du DB829. Le DB868 dont l'activité semble supérieure au DB289 sur des modèles murins (Wenzler *et al.* 2009) et sur des singes vervets (Thuita *et al.* 2013, 2015) infectés par *T. brucei* et ne présente pas de toxicité rénale ni hépatique selon les premiers essais expérimentaux. Le DB868 pourrait être un bon candidat médicament pour une nouvelle phase d'essais cliniques (**Figure 25**).

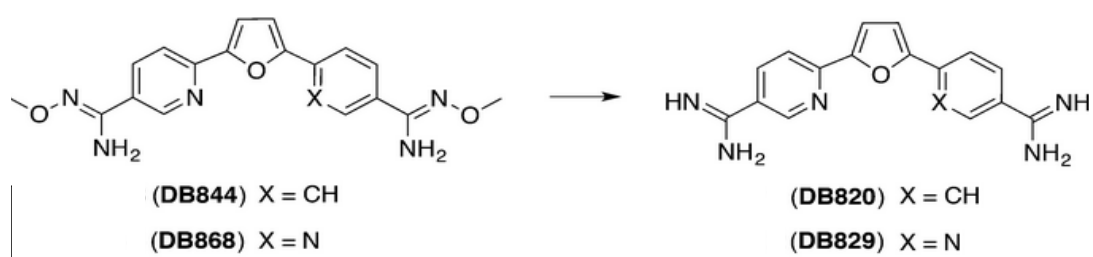


Figure 25 : Structure des composés DB820 et DB829 ainsi que leurs pro-drogues respectives les DB848 et DB868. Tiré de Thuita *et al.* 2013.

III.II.B) De nouveaux modulateurs transcriptionnels

III.II.B.1) Relation structure/affinité, structure/activité

III.II.B.1.1) La pentamidine et le bérénil

La pentamidine et le bérénil sont des ligands du petit sillon de l'ADN, en particulier sur des paires de bases AT. La pentamidine reconnaît 5 paires de bases AT consécutives contre 3 pour le bérénil (Edwards *et al.* 1992). Des expériences d'empreinte à la DNase I ont montré leur interaction sur les sites 5'-AATT ou 5'-ATAT (Abu-Daya *et al.* 1995). Le bérénil étant moins long que la pentamidine, son interaction avec l'ADN ne met en jeu qu'une seule liaison hydrogène entre un des groupements amidines et l'azote N3 de l'adénine, alors que le second groupement amidine interagit avec l'ADN par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (Brown *et al.* 1990).

III.II.B.1.2) Le DB75

Le DB75, 2,5-bis (4guanylphényle) furane, ou furamidine, est légèrement plus long et moins convexe que le bérénil et peut établir 2 liaisons hydrogènes avec le petit sillon de l'ADN par ses groupements amidines liant les oxygènes des thymines, de part et d'autre, des 2 brins d'ADN. Le DB75 se lie aux séquences riches en paires de bases AT sur les sites 5'-AATT (Cillo 1996; Laughton *et al.* 1996).

III.II.B.1.3) Dérivés benzimidazoles : des modifications structurales pour moduler la sélectivité

Afin d'augmenter leur sélectivité de reconnaissance avec le petit sillon, la substitution d'un des cycles phényles par un cycle benzimidazole a été réalisée pour les composés DB293 et des deux cycles phényles en benzimidazoles pour le DB270 (Figure 26). Le DB293 est capable d'interagir avec les sites 5'-AAAA et 5'-ATTA sous forme de monomère mais aussi en dimère sur le site 5'-ATGA (Bailly *et al.* 2001; Tanious *et al.* 2003).

Afin d'augmenter la spécificité, un cycle furane a été substitué par un cycle thiophène pour former le dérivé phényle-thiophène-benzimidazole DB818. Grâce à des expériences d'empreinte à la DNase I, de SPR (*surface plasmon resonance*) ou de cristallographie à rayon X, il a été montré que le DB818 est davantage spécifique pour les sites AT riches que ces prédécesseurs (Liu *et al.* 2008).

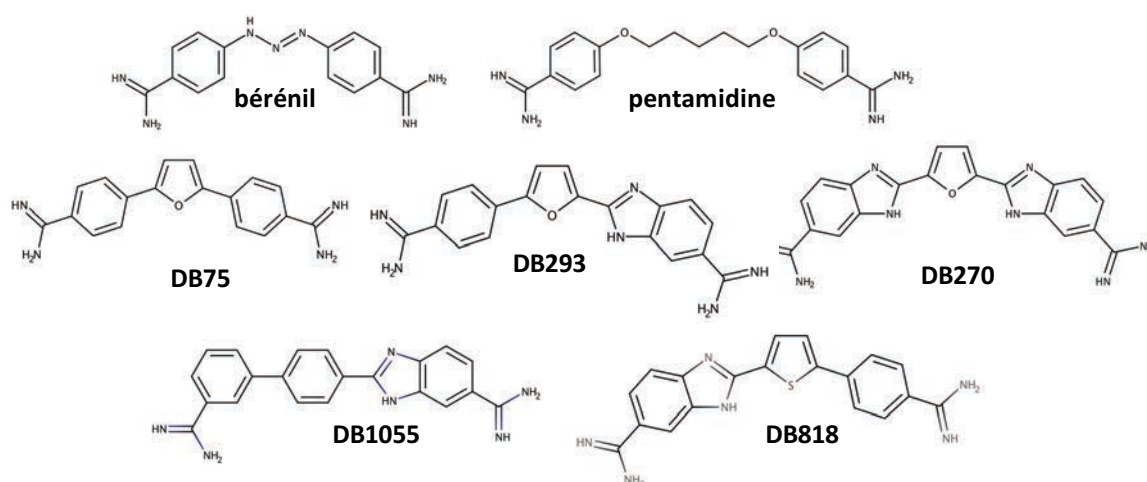


Figure 26 : Structures du bérénil, de la pentamidine, du DB75 et des dérivés DB : DB293, DB270, DB1055 et DB818.

III.II.B.2) Mode d'action

Comme nous l'avons vu précédemment, la caractérisation des transporteurs n'a pas été clairement établie chez le parasite. Chez les mammifères, la pentamidine et le DB75 empruntent des transporteurs organiques tels que hOCT1 et hOCT2 (Ming *et al.* 2009). Tout comme chez le parasite, la fluorescence intrinsèque des composés a permis d'étudier leur localisation sub-cellulaire dans les cellules humaines. Certains composés entrent très rapidement dans la cellule et se dirigent au noyau, alors que d'autres pourraient se localiser dans la mitochondrie ou rester dans le cytoplasme (Lansiaux *et al.* 2002). Enfin, d'autres composés plus longs et aux charges différentes ne sont pas capables d'entrer dans la cellule (données du laboratoire).

Les expériences menées en 2008 par Peixoto *et al.* ont mis en évidence les capacités d'inhibition de l'interaction des facteurs de transcription PIT-1 et BRN-3 à leurs séquences cibles sur l'ADN par un composé DB293 se liant en dimère au niveau du site commun 5'-ATGA et en monomère sur le site AT-riche adjacent. Si elle dépend des séquences de liaisons des facteurs de transcription, l'inhibition compétitive par des ligands de l'ADN dépend aussi du mode d'interaction à l'ADN des facteurs de transcription. Ainsi, il a été montré que le DB293 n'inhibait pas la fixation du facteur IRF-1 (*interferon regulatory factor 1*) à l'ADN, un autre facteur de transcription se fixant également sur une séquence 5'-ATGA. La fixation du composé DB293 dans le petit sillon engendre une modification de la conformation de l'ADN qui participerait à la déstabilisation de la reconnaissance de facteurs dans le grand sillon (Peixoto *et al.* 2008) (**Figure 27**).

Par ailleurs, il a été mis en évidence grâce à des expériences sur membranes TransSignal Protein/DNA Array, que le DB293 module l'activité de facteurs de transcription de la famille ETS (*E26 transformation-specific*) dont fait partie le facteur ERG. Le composé dérivé di-phényle-thiophène-amidine DB1255 a ensuite été sélectionné *in vitro* pour sa capacité à inhiber le complexe ERG/ADN. De plus, cette modulation de l'expression a été confirmée *in cellulo* par des tests d'activité luciférase (Nhili *et al.* 2013). Toutefois, ce composé montre une toxicité sur les modèles cellulaires étudiés indépendamment de l'expression d'ERG, pouvant être liée à son activité sur d'autres membres de la famille ETS exprimés de manière ubiquitaire (données non publiées).

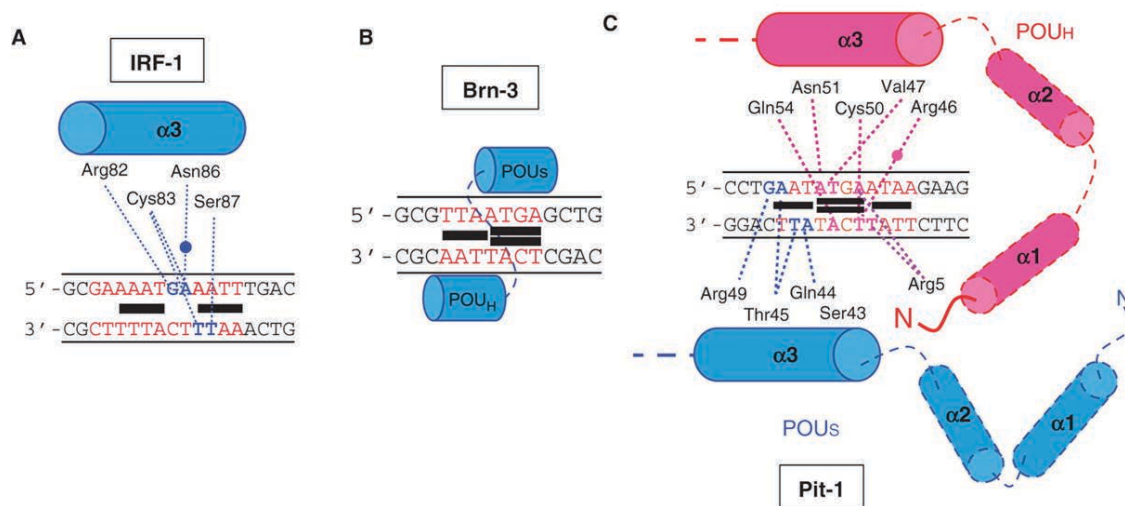


Figure 27 : Représentation des sites de liaison du DB293 pour l’inhibition des complexes Pit1/ADN, Brn3/ADN et IRF-1/ADN. Tiré de Peixoto *et al.* 2008. Domaines POU : POU homéodomaine (POU_H) et POU domaine spécifique (POUs) ; sites consensus de fixation (rouge) ; contact acide aminé/paire de base de l’ADN (pointillés, rose et bleu pour le grand sillon, bleu pour le petit sillon) ; site de reconnaissance du DB293 (rectangle noir).

III.II.C) Inhibiteurs de l’interaction HOXA9/ADN

III.II.C.1) Sélection *in vitro* des composés DB1055 et DB818

La sélection des composés DB818 et DB1055 a été réalisée *in vitro* sur leur capacité à inhiber le complexe HOXA9/ADN (**Figure 28**). Le composé DB828 a été sélectionné comme contrôle négatif car il n’inhibe pas le complexe HOXA9/ADN. Les composés DB818 et DB1055 diffèrent par leurs cycles centraux thiophène (DB818) et phényl (DB1055) et le positionnement en ortho (DB818) ou en méta (DB1055) de la fonction dimaideine portée par le premier cycle (phényl dans les deux cas) (**Figure 26**). Par test dérivé de l’ELISA (*ELISA-derived Protein/DNA Binding Inhibition*) (**Figure 28.A**) et par retard en gel (**Figure 28.B**), les composés DB818 et DB1055 ont confirmé leur capacité d’inhibition de l’interaction d’HOXA9 à sa séquence cible riche en paires de bases AT (5’-tgATTTAcg) site de fixation confirmé par empreinte à la DNaseI (**Figure 28.C**).

Afin d’évaluer la spécificité d’action des composés DB818 et DB1055 (**Figure 28.D**), des expériences de retard en gel ont été réalisées afin d’évaluer la modulation de l’interaction des complexes HOXA9/ADN, HOXA9/PBX1/ADN, HOXA10/PBX1/ADN, HOXA7/ADN. Les composés DB818 et DB1055 inhibent la liaison à l’ADN sur la séquence consensus PBX/HOX 5’-cgATGATTTAcg-3’ reconnue par l’ensemble de ces complexes. Ils sont

d'avantage actifs sur les complexes HOXA9/ADN et HOXA9/PBX1/ADN, la présence du cofacteur PBX1 ne semblant pas impacter sur la capacité d'inhibition des composés.

Pour aller plus loin dans l'évaluation de la spécificité d'inhibition des composés DB818 et DB1055 et se rapprocher de la fonctionnalité d'HOXA9, des expériences de retard en gel ont été réalisées sur des séquences promotrices de gènes connus dans la littérature pour être régulés par HOXA9 tels que *p21* (Bromleigh & Freedman 2000) ou *CYBB* (*cytochrome b beta*) (Bei *et al.* 2005). Il a été montré que les composés DB818 et DB1055 ont la capacité d'inhiber la formation des complexes HOXA9/ADN au niveau de ces séquences promotrices cibles.

III.II.C.2) Preuves de concept *in cellulo*

III.II.C.2.1) Modulation de l'activité transcriptionnelle

Il est aisé de suivre la localisation cellulaire des composés DB de par leur fluorescence intrinsèque. Rapidement, le composé DB818 se trouve localisé exclusivement dans le compartiment nucléaire. Par des tests d'activité luciférase, l'activité transcriptionnelle d'HOXA9 a été évaluée dans la lignée cellulaire K562 co-transfectée par un plasmide d'expression d'HOXA9 et d'un vecteur rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur minimal associé à la séquence de fixation d'HOXA9 (répétée 6 fois dans ce modèle) (**Figure 28.E**). Ces expériences ont montré que les composés DB818 et DB1055, contrairement au DB828, utilisé comme contrôle négatif, inhibent l'interaction des complexes HOXA9/ADN, HOXA9/PBX1/ADN, HOXA9/MEIS1/ADN et NUP98-HOXA9/ADN *in cellulo*.

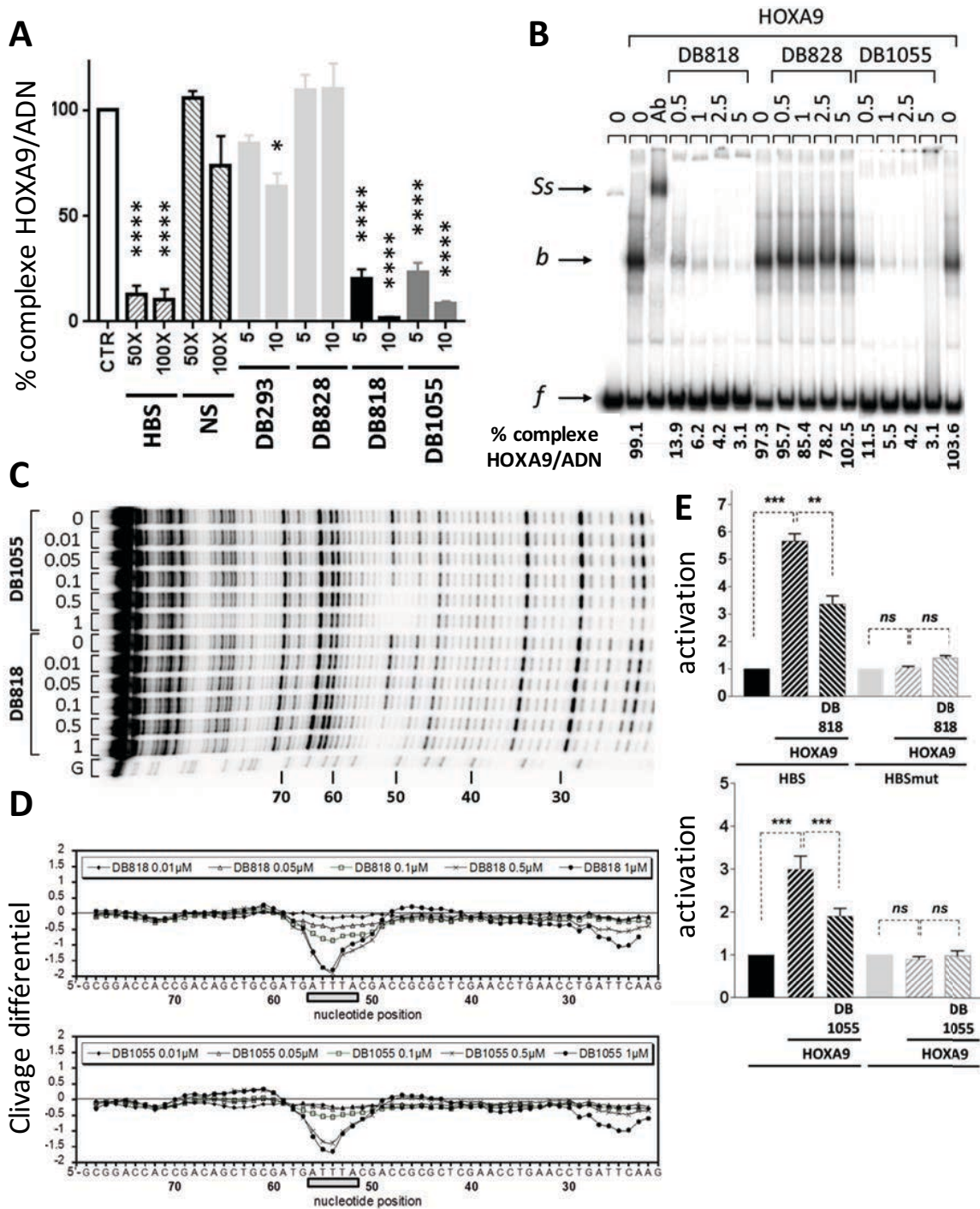


Figure 28 : Sélection *in vitro* et validation des inhibiteurs de la liaison à HOXA9/ADN (données antérieures du laboratoire).

A. Test dérivé d'ELISA pour évaluer l'inhibition de la liaison HOXA9/ADN. La protéine HOXA9 exprimée à partir de lysat de réticulocytes et incubée avec une séquence HBS immobilisée seule (CTR), en présence de 50X ou 100X d'oligonucléotides Homeodomaine binding site (HBS) ou non spécifiques (NS) ou de divers composés DB indiqués (μM). Le graphique représente la moyenne +/- s.e.m. de 3 à 15 mesures indépendantes effectuées au cours du processus de criblage de plusieurs composés. **B.** *Electrophoretic mobility shift assay*

(EMSA). La séquence d'ADN HBS radiomarquée à l'extrémité 5' ("f", ADN libre) a été incubée avec un lysat de réticulocytes exprimant la protéine HOXA9 ("HOXA9") en présence de l'anticorps dirigé contre HOXA9 ("Ab") pour générer une bande d'ADN *supershifted* ("Ss"), ou des concentrations croissantes des composés DB (μM). Les pourcentages de la bande HOXA9/ADN liée ("b") ont été déterminés par rapport aux trois échantillons contrôles et sont notés en dessous de ce gel représentatif. **C.** Empreinte à la DNase I. Une concentration croissante de DB818 ou DB1055 (μM) a été incubée avec un fragment d'ADN HBS radiomarqué au P32 à l'extrémité 3' avant la digestion par la DNase I. **D.** Analyse densitométrique. Le clivage différentiel pour DB818 (panneau supérieur) et DB1055 (panneau inférieur) est quantifié à partir du gel de polyacrylamide dénaturant illustré reporté sur la séquence d'ADN. Les boîtes grises mettent en évidence la séquence de liaison d'HOXA9 à l'ADN couverte par les composés. **E.** Tests d'activité luciférase. Des cellules K562 ont été co-transfectées avec le vecteur rapporteur pGL3-prom contenant 6 fois la séquence WT ("HBS") ou la séquence mutée ("HBSmut") +/- pCMV-AD-HOXA9 ("HOXA9") avant traitement avec les composés DB indiqués. Les graphiques représentent la moyenne +/- s.e.m. de 3 à 8 points indépendants. Test t de Student: ****, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; ns, non spécifique.

III.II.C.2.2) Effets anti-prolifératifs

L'inhibition par les composés DB818 et DB1055 du complexe HOXA9/ADN s'est avérée efficace *in vitro* et *in cellulo*. Afin d'évaluer leur potentiel anti-prolifératif, des tests clonogéniques ont été réalisés sur des lignées murines (MigA9) transformées afin d'exprimer *HOXA9* ou *HOXA9/MEIS1* (**Figure 29.B-D**.) Ces tests clonogéniques permettent d'évaluer la capacité des progéniteurs à proliférer et former des clones. Contrairement au DB828 (inactif *in vitro*) n'altérant pas la prolifération des clones, les composés DB1055 et DB818 présentent une activité anti-clonogénique dans les cellules exprimant *HOXA9* ou *HOXA9/MEIS1* par rapport aux cellules K562.

De plus, les cellules exprimant *HOXA9* ou *HOXA9/MEIS1* forment des clones plus petits et avec des caractéristiques morphologiques de type granulocytaire (GFU-G) ou macrophagiques (GFU-M) en présence des composés DB1055 et DB818, contrairement aux conditions contrôles non traitées montrant de nombreux clones à type cellulaire mixte donc moins différenciées (CFU-GM). Ces résultats attestent d'un potentiel différenciateur des composés.

III.II.C.2.3) Evaluation de la cytotoxicité

La cytotoxicité des composés a été évaluée sur des lignées cellulaires montrant que les cellules exprimant le plus *HOXA9* sont d'autant plus sensibles aux composés. (**Figure 29.A.E**)

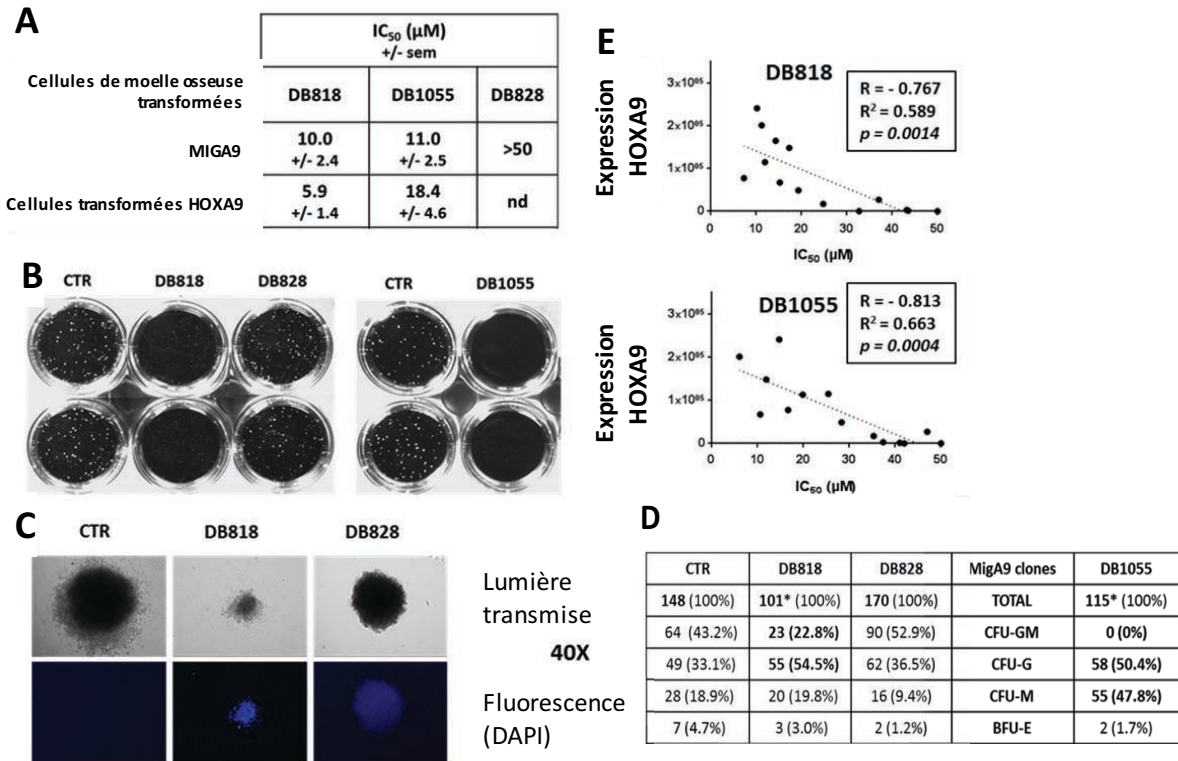


Figure 29 : Effet des DB818 et DB1055 sur la viabilité cellulaire et la clonogénicité des lignées cellulaires murines et humaines (données antérieures du laboratoire).

A. Mesure de la viabilité des cellules par test MTS des lignées cellulaires murines transformées surexprimant *HOXA9*. Calcul de l'IC₅₀ (50 % de viabilité cellulaire par rapport au témoin non traité) (moyenne +/- sem, en µM). **B.** Visualisation globale de clones MigA9 (1000 cellulesensemencées/puit) **C.** Fluorescence des clones MigA9. Des clones représentatifs sont photographiés sous lumière visible ou fluorescence dans un canal bleu correspondant à la fluorescence intrinsèque de DB818 et DB828 tandis que DB1055 n'est pas fluorescent. **D.** Quantification des différents sous-types de colonies. Les colonies individuelles ont été identifiées en tant que CFU-GM, CFU-M, CFU-G et BFU-E sur la base de critères morphologiques. **E.** Mesure de la viabilité cellulaire sur 14 lignées cellulaires de LAM humaines en fonction de leur niveau d'expression génique d'*HOXA9* respectif.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

HOXA9 est un oncogène dont l'expression est dérégulée dans les cancers et en particulier les LAM, et, est l'un des principaux gènes dérégulés dans ces hémopathies. (*Figure 30*)

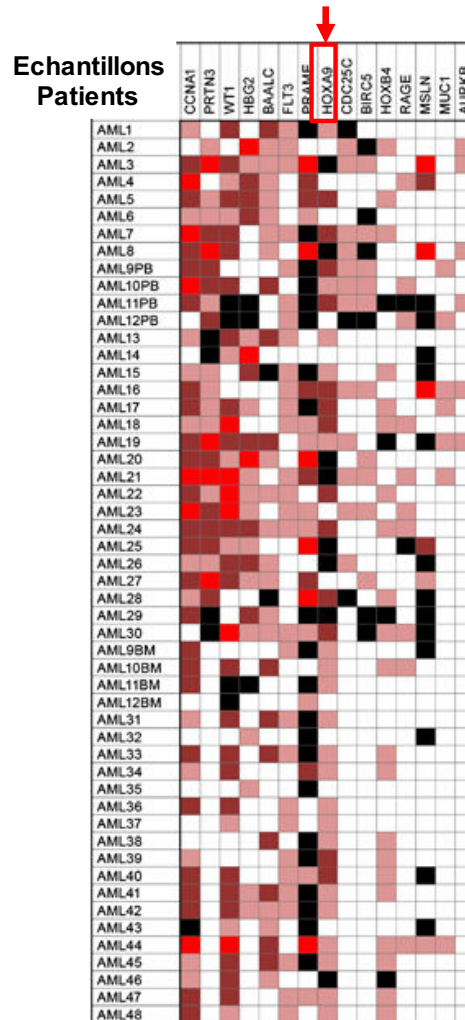


Figure 30 : Implication d'HOXA9 dans les LAM. Données issues de Goswami *et al.* 2014. Les ARN de 52 prélèvements de sang périphérique de patients atteints de LAM (dont 4 échantillons étaient soit de la moelle osseuse (BM) ou du sang (PB) par patient) ont été analysés par puce à ADN en comparaison à des cellules issues de tissus sains. En noir : aucune expression détectable, en rouge vif, expression forte. HOXA9 est en 8^{ème} position des gènes les plus fortement dérégulés et représente une cible intéressante dans le traitement des LAM.

HOXA9 est un facteur de transcription impliqué dans 70% des LAM. Son activité leucémogène a été démontrée *in cellulo* et *in vivo*, faisant de ce facteur une cible d'intérêt pour le développement de nouvelles thérapeutiques (Collins & Hess 2016). HOXA9 est responsable du blocage de la différenciation normale et du maintien de l'auto-renouvellement des progéniteurs hématopoïétiques. L'homéodomaine d'HOXA9 est nécessaire pour sa liaison à l'ADN et indispensable à son activité leucémogène (Vijapurkar *et al.* 2004). L'inhibition d'HOXA9 induit la différenciation et la mort des cellules (Vijapurkar *et al.* 2004; Faber *et al.* 2009; Collins & Hess 2016). L'activité de facteur de transcription d'HOXA9 dépend de sa capacité à fixer spécifiquement l'ADN. En ce sens, l'inhibition de sa fixation empêcherait sa fonction inductrice de LAM et suffirait à ce que les cellules ne prolifèrent plus de manière incontrôlée, se différencient et meurent.

Nous posons les hypothèses que l'inhibition de la fixation d'HOXA9 à l'ADN suffirait à réprimer son activité leucémogène et que les molécules DB1055 et DB818, des ligands compétiteurs de l'ADN, dérivés de composés anti-parasitaires ciblant l'ADN, pourraient bloquer l'interaction de ce facteur à l'ADN et empêcheraient son activité transcriptionnelle et l'expression d'un programme oncogénique. L'objectif de ce projet est de proposer des composés pour le développement de nouvelles thérapies ciblées et d'établir un lien entre la surexpression d'HOXA9 et sa fonctionnalité dans les LAM. Pour cela, il était nécessaire de réaliser des expérimentations à la fois *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo*.

Afin de déterminer la spécificité d'action et d'effets des inhibiteurs sélectionnés, nous avons comparé les effets d'un ARN interférent dirigé spécifiquement contre l'ARNm d'*HOXA9* à ceux du traitement par les inhibiteurs. Etant donné la faible capacité de transfection de la plupart des lignées leucémiques, nous avons opté pour l'expression de shRNA dirigés contre HOXA9 ou d'un shRNA contrôle par infection lentivirale. (**Figure 31**)

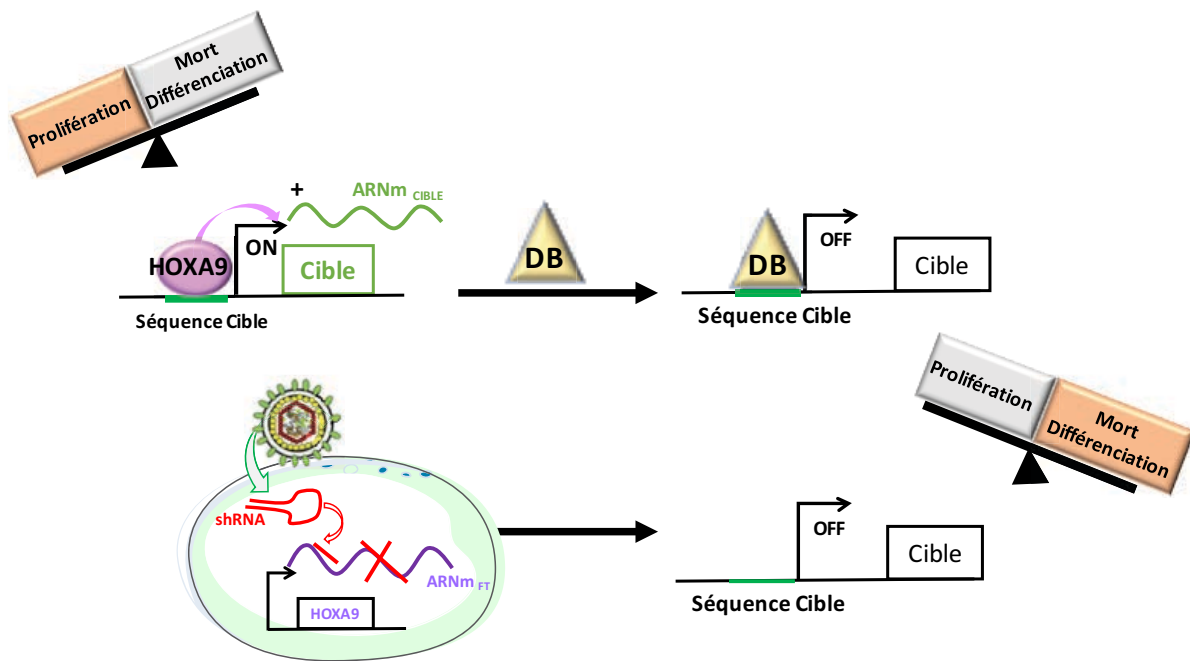


Figure 31 : Stratégies d'étude de l'inactivation ou de l'inhibition du facteur de transcription HOXA9.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient :

1. Evaluer au niveau cellulaire et moléculaire les effets de l'inhibition d'HOXA9 par les composés DB1055 et DB818 en comparaison à son inactivation transcriptionnelle dans des modèles de leucémies aigües myéloïdes.

Pour cela, nous avons étudié l'impact transcriptionnel et l'impact sur la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire de l'inhibition d'HOXA9.

2. Evaluer *in vivo* les effets du composé DB1055 sur des modèles murins implantés de cellules issues de lignées de LAM et sur des modèles de PDX (*patient-derived-xenografts*).

Pour cela, nous avons évalué l'impact de l'expression d'HOXA9 *in vivo* par l'injection de cellules issues de lignées cellulaires. Nous avons étudié l'effet du traitement avec le composé DB1055 *in vivo* sur ces modèles de LAM ou sur des modèles de PDX (*patient-derived-xenografts*).

CHAPITRE 2 :

RESULTATS

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de nouveaux compétiteurs (DB1055/DB818) ciblant directement la séquence de liaison d'*HOXA9* à l'ADN sur des modèles cellulaires que nous avons sélectionnés en *partie I*, au niveau moléculaire (*partie II*), *in cellulo* (*partie III*) et *in vivo* (*partie IV*).

PARTIE I. Validation et sélection des modèles d'étude

I.I) Choix des modèles cellulaires.

I.I.A) Lignées cellulaires

Trois modèles ont été sélectionnés pour leur surexpression d'*HOXA9* et leur sensibilité aux composés: (1) la lignée cellulaire U937 issue de cellules d'un patient atteint d'un lymphome généralisé présentant une fusion *CAML-AF10* et des caractéristiques myéloïdes (Sundstrom & Nilsson 1976); (2) la lignée cellulaire THP-1 issue d'un patient atteint de LAM avec une translocation *MLL-AF9* (Tsuchiya *et al.* 1980); (3) la lignée cellulaire EOL-1 issue d'un patient atteint de LAM avec, entre autres, une fusion partielle de *MLL* (*MLL-PTD*) (Mayumi 1992) (**Figure 32**).

Les lignées EOL-1 et U937 expriment davantage *HOXA9* que la lignée THP-1 (**Figure 32.A**). Afin d'évaluer la sensibilité aux composés DB1055 et DB818, l' IC_{50} a été calculée à 72 h de traitement par test MTS. L' IC_{50} correspond à la concentration pour laquelle 50 % des cellules sont présentes au terme de la culture relativement à la population totale définie par le contrôle (cellules non traitées). La lignée THP-1 est plus sensible au composé DB1055 avec un IC_{50} de 11 μ M par rapport aux lignées EOL-1 et U937 avec des IC_{50} respectifs de 13,7 et 22,2 μ M. Les lignées U937 et EOL-1 sont moins sensibles au DB818 avec des IC_{50} respectifs de 19,2 et 19,6 μ M que la lignée THP-1 qui a un IC_{50} de 15,2 μ M (**Figure 32.B**).

Ces trois lignées cellulaires semblent être des modèles pertinents pour l'évaluation des composés compétiteurs puisqu'ils surexpriment *HOXA9* et sont sensibles aux composés DB818 et DB1055.

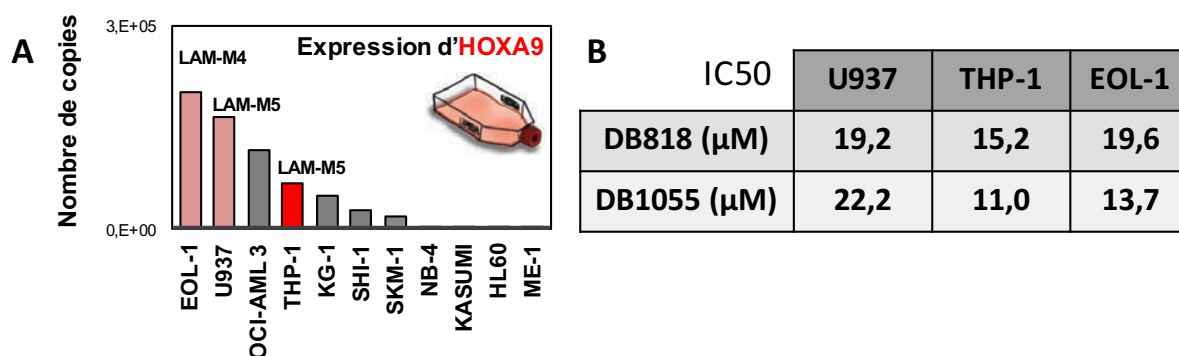


Figure 32 : Choix des lignées cellulaires pour l'étude de l'inhibition fonctionnelle d'HOXA9 par les composés DB818 et DB1055. **A.** Expression d'HOXA9 en nombre de copies pour 10 ng d'ARNm rétrotranscrit. Réalisées sur des lignées cellulaires de LAM. L'expression est calculée en nombre de copies en rapport à une quantité connue de plasmides contenant la séquence d'ADNc d'HOXA9 (PCNA3-HOXA9cDNA). **B.** Valeurs d'IC₅₀ issues de tests MTS réalisés à 72 h post-traitement au DB818 ou au DB1055 (0,1 à 50 µM) sur les lignées U931, THP-1 et EOL-1.

I.I.B) Prélèvements de patients atteints de LAM.

Des prélèvements de patients atteints de LAM exprimant *HOXA9* ont été fournis par la cellulothèque de Lille (**Figure 33**). A partir de ces prélèvements de sang et/ou de moelle osseuse, nous avons évalué l'expression d'*HOXA9* par RT-qPCR et leur sensibilité aux composés DB818 et DB1055 par test MTT à 96 h. En effet, il est connu que les sous-types MLL et NPM1 surexpriment *HOXA9* contrairement aux sous-types présentant des altérations de *CEBPA*, des inversions 16 et des translocations t(8,21) (Grubach *et al.* 2008) (**Figure 33.A**).

La survie des blastes traités au DB818 a été comparée avec l'expression d'*HOXA9* et montre une corrélation positive entre ces deux facteurs (**Figure 33.B**). De plus, les blastes les plus sensibles au DB818 expriment davantage *HOXA9* par rapport aux blastes les plus résistants (**Figure 33.C**). La sensibilité au DB818 dépend du sous-type de LAM. Par exemple, les blastes de patients atteints de LAM de sous-type MLL ou NPM1 muté sont plus sensibles que les blastes de patients atteints de LAM de sous-type *CEBPA* (**Figure 33.D**). Ces tests de sensibilité aux composés DB818 et DB1055 sont réalisés par MTT à 96 h. Malheureusement, pour le DB1055, 96 h de traitement ne sont pas suffisantes pour observer clairement un effet

cytotoxique du composé et malheureusement ce délai est maximal pour en général maintenir la survie des blastes *in vitro*.

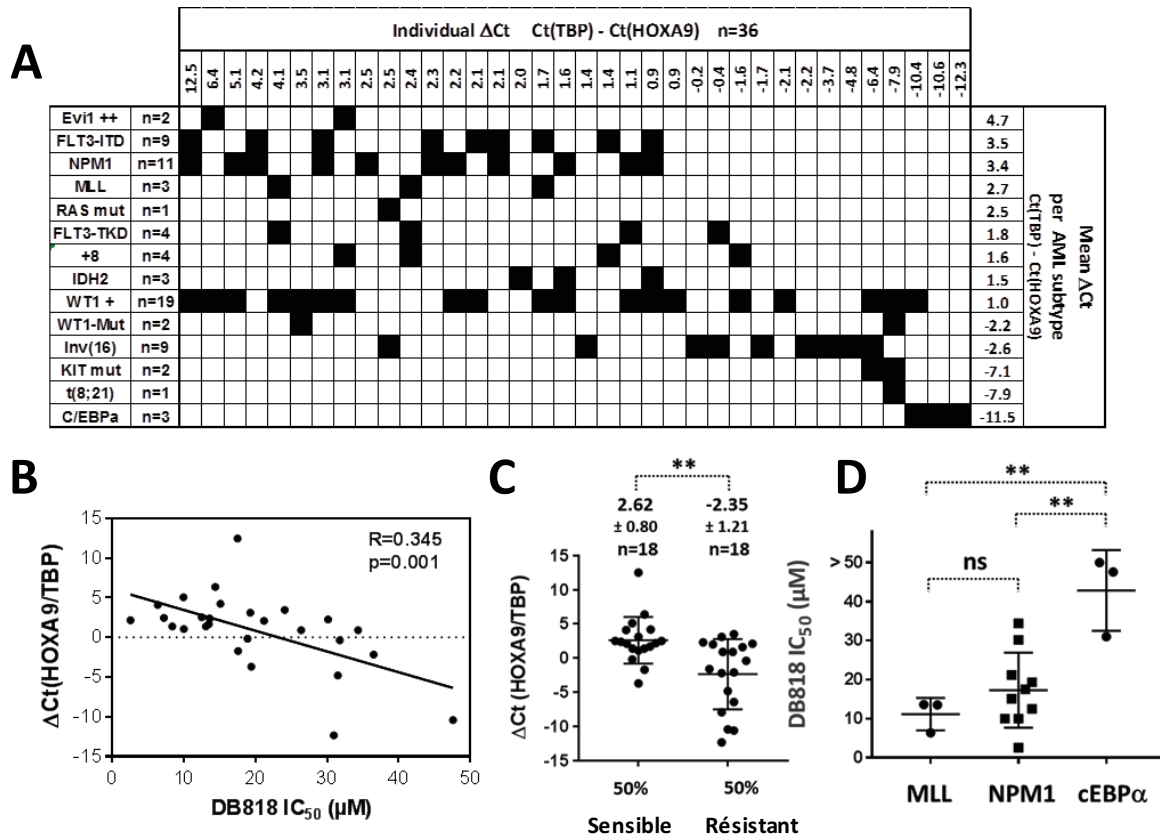


Figure 33 : Evaluation des effets des composés DB1055 et DB818 sur la survie de blastes de patients. **A.** Séries de 36 prélèvements de patients atteints de LAM quantifiés pour leur expression d'*HOXA9* (RT-qPCR) représentées par le deltaCt de l'expression d'*HOXA9* sur l'expression du gène de ménage *TBP*. La moyenne des deltaCt est calculée pour chaque sous-type de LAM dans la colonne de droite. **B.** Corrélation entre l'expression d'*HOXA9* normalisée par rapport la *TBP* et la sensibilité au traitement au DB818. (Coefficient de Pearson) **C.** Comparaison de la moyenne des valeurs de DeltaCt entre les 18 prélèvements les plus sensibles et les 18 prélèvements les plus résistants au DB818. **D.** Valeur moyenne d' IC_{50} par sous-type de prélèvements de LAM (MLL, NPM1 et $cEBP\alpha$). Unpaired t-test, p-value : * : <0,05 ; ** : <0,01 ; *** : <0,001.

I.II) Invalidation d'*HOXA9* par shRNA.

Afin d'étudier les effets des composés DB818 et DB1055, mais aussi, d'étudier le rôle fonctionnel d'*HOXA9*, les effets d'ARN interférents dirigés spécifiquement contre l'ARNm d'*HOXA9* ont été comparés à ceux du traitement par les inhibiteurs. Ces ARN interférents ont

été exprimés à l'aide d'infection lentivirale étant donné la faible capacité de transfection des lignées leucémiques. Les shRNAs utilisés (shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3) sont dirigés contre l'ARNm d'*HOXA9* ou contre aucune séquence connue d'ARNm (shCTR). L'infection lentivirale permet la co-expression des shRNA et de la protéine GFP facilitant ainsi le suivi des cellules infectées. Pour l'ensemble des expériences, les cellules sont transduites par les lentivirus avec une efficacité de 90-100 % (basé sur le pourcentage de GFP) (**Figure 34.A**).

L'efficacité des différents shRNA a été validée par RT-qPCR 48 h post-infection lentivirale (**Figure 34.B**).

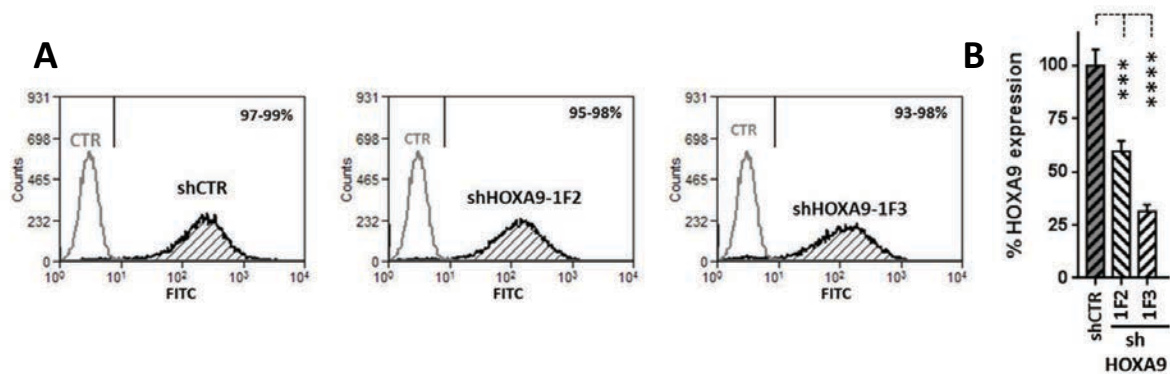


Figure 34 : Validation de l'inactivation par shRNA d'HOXA9 par les shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 sur la lignée THP-1. **A.** Taux d'expression de la protéine GFP observé en cytométrie en flux à 48 h post-infection lentivirale. La protéine GFP est co-exprimée avec le shRNA (shCTR, shHOXA-1F2 ou shHOXA-1F3), le pourcentage de cellules infectées correspond donc au pourcentage de GFP observé en cytométrie en flux dans le canal FITC (fluorescent isothiocyanate). **B.** Expression d'*HOXA9* évaluée par RT-qPCR, 48 h post-infection lentivirale. n =6 +/- SEM unpaired t-test * :p-value<0,05 ; * : <0,01 ; *** : <0,001.

Il n'existe pas d'anticorps commerciaux suffisamment spécifiques contre *HOXA9* pour l'analyse protéique par Western blot (Collins & Hess 2016b). C'est pourquoi, une lignée issue de cellules THP-1 surexprimant une forme d'*HOXA9* avec une étiquette -TY en N-terminal a été sélectionnée au laboratoire pour permettre de visualiser la protéine *HOXA9* au travers de la reconnaissance du peptide TY grâce à un anticorps spécifique. La transduction de ces cellules THP-1 avec les shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 induit une diminution de l'expression de celui-ci (**Figure 35**).

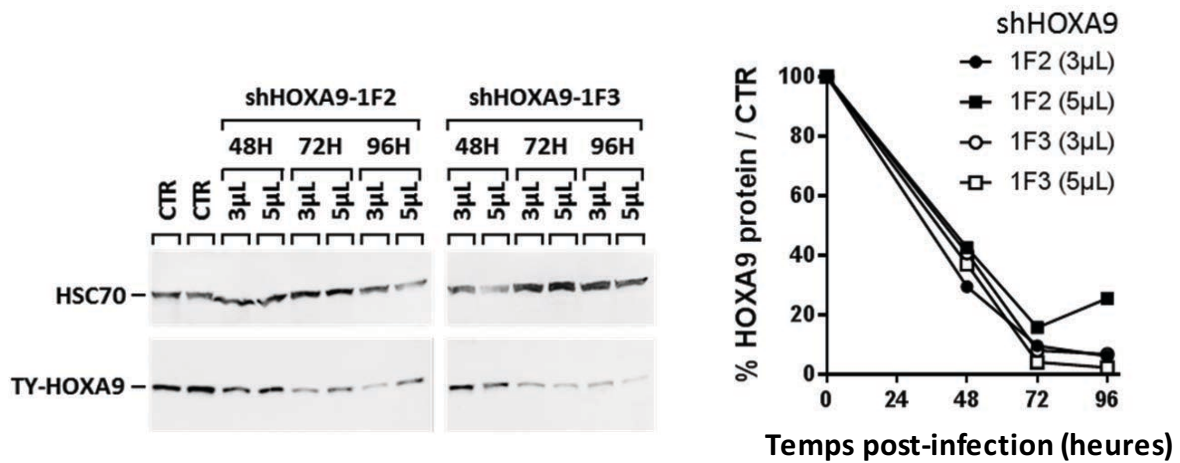


Figure 35 : Expression d'HOXA9 évaluée par Western-blot dans la lignée THP-1-TYHOXA9. Expression protéique à 48, 72 et 96 h post-infection lentivirale de 3 ou 5 μ L de lentivirus pour l'expression du shHOXA9-1F2 ou -1F3 (400 ng P24/ μ L).

CONCLUSION PARTIE I

Validation et sélection des modèles d'étude

Afin d'évaluer au niveau moléculaire et cellulaire les effets des composés DB1055 et DB818 nous avons sélectionné des lignées humaines de LAM (EOL-1, U937 et THP-1). Ces trois modèles expriment en effet *HOXA9* et sont sensibles aux composés DB1055 et DB818. Afin de pouvoir appréhender au mieux les effets induits par ces deux inhibiteurs, les ARN interférents choisis ont été les shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 dont les séquences ont été décrites dans la littérature (Faber *et al.* 2009). Tous deux se sont avérés efficaces par la réduction à plus de 60 % de l'expression d'HOXA9.

Enfin, nous avons montré que les blastes issus de patients atteints de LAM exprimant *HOXA9* sont sensibles aux composés DB1055 et DB818 *in vitro*.

PARTIE II. Evaluation transcriptomique de l'inhibition d'HOXA9 dans des modèles de LAM.

Dans le but d'évaluer les effets de l'inhibition fonctionnelle d'HOXA9 par les composés DB818 et DB1055 ou de son invalidation par shRNA, une analyse transcriptomique a été réalisée sur la lignée cellulaire THP-1. Celle-ci est un modèle de choix pour cette étude car il s'agit d'un modèle largement décrit pour sa capacité de différenciation cellulaire (Auwerx 1991). En effet, sous l'action d'agents différenciateurs tels que le phorbol-12-myristate-acétate (PMA), la 1,25-dihydroxyvitamin D3, le lipopolysaccharide (LPS) ou encore les inhibiteurs de DOT1L, les cellules THP-1 se différencient en monocytes/macrophages (Auwerx 1991; Kitchens *et al.* 1992; Schwende *et al.* 1996). Le traitement au PMA induit une différenciation non spécifique des cellules. Le mécanisme d'action du PMA n'est pas clairement élucidé mais il semblerait que cet agent active la voie PKC (*Protein kinase C*) qui serait la cause de la levée du blocage de la différenciation (Richter *et al.* 2016). De manière intéressante, il a été montré que la perte de la liaison d'HOXA9 à l'ADN est médiée par sa phosphorylation par la PKC (Vijapurkar *et al.* 2004). De plus, le traitement au PMA des cellules THP-1 provoque une diminution de l'expression d'*HOXA9* (Zeng *et al.* 2015).

Les transcriptomes des cellules THP-1 traitées aux composés DB sont comparés au transcriptome des cellules CTR. De même, le transcriptome des cellules THP-1 transduites pour l'expression du shHOXA9 pendant est comparé aux cellules THP-1 transduites pour l'expression du shCTR. Pour les traitements avec les composés DB, 24 h de traitement ont été réalisées, les composés DB agissent directement en pénétrant rapidement dans la cellule, tandis que pour la transduction avec le lentivirus, 48 h sont nécessaires pour l'expression du shRNA et son activité (évalué par RT-qPCR à 24, 48 et 72 h). La co-expression de la protéine GFP est visible en cytométrie en flux dès 24 h, atteint son maximum dès 48 h et persiste à ce niveau d'intensité au cours du temps.

Une liste des sondes dérégulées dans chacune de ces conditions par rapport à leur contrôle respectif (CTR ou shCTR) est extraite.

II.I) L'inhibition d'HOXA9, par les traitements au DB1055 ou au DB818 ou par shRNA, module l'expression de gènes cibles d'HOXA9 connus dans la littérature.

Tout d'abord, une analyse globale de l'expression des gènes a été réalisée avec le logiciel Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) pour mettre en évidence les voies cellulaires, des activités modulées ou établir des corrélations avec les données antérieurement publiées. Cette analyse GSEA a permis de montrer que l'inhibition d'HOXA9 par les composés DB ou par shRNA dans notre modèle est en accord avec les données de la littérature impliquant une modulation de l'expression d'HOXA9 (surexpression ou invalidation) (**Tableau 7** et **Figure 36**) et présentent un score élevé d'enrichissement (NES) statistiquement significatif (p-value, FDR)

PUBLICATIONS	Faber et <i>al.</i> , 2009	Hess et <i>al.</i> , 2006	Takeda et <i>al.</i> , 2006
Modèles	Invalidation par shRNA (shHOXA9-1F3) d'HOXA9 dans la lignée MOLM-14	Transformation de cellules de moelle osseuse exprimant MLL-ENL (HOXA9 et MEIS1)	Cellules progénitrices CD34+ exprimant NUP98-HOXA9
GSEA collection	C6, <i>oncogenic signature</i>	CGP, <i>chemical and genetic perturbations</i>	
RANG shHOXA9-1F3 DB818 DB1055 (classement sur NES)	43 168 139	5 220 20	65 87 116

Tableau 7 : Genesets issus de l'analyse avec le logiciel GSEA impliquant HOXA9 communément enrichis après inhibition d'HOXA9 par shRNA, traitement au DB1055 ou au DB818. Le rang est établi sur la liste des *genesets* de chaque collection (C6 ou CGP) classés en fonction du meilleur score d'enrichissement normalisé (NES).

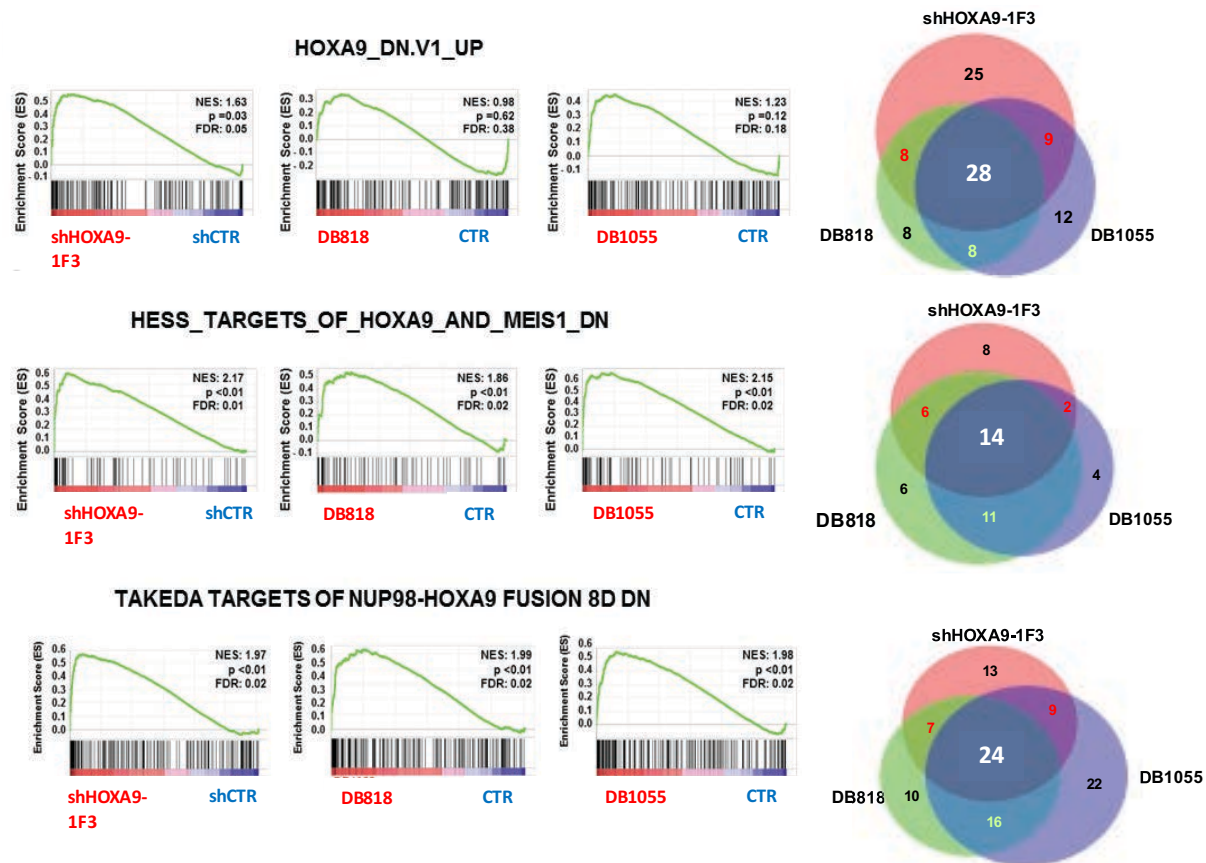


Figure 36 : Validation de l’inhibition d’HOXA9 par l’analyse GSEA dans la lignée THP-1. L’analyse des gènes dérégulés par le shHOXA9 ou par les traitements aux DB1055 et DB818 révèle un enrichissement significatif pour ces 3 conditions dans les *genesets* issus de modèles d’inhibition ou de surexpression d’HOXA9. HOXA9_DN.V1_UP: Faber et *al.*, 2009; HESS_TARGETS_OF_HOXA9: Hess et *al.*, 2006; TAKEDA TARGETS OF NUP98-HOXA9 FUSION 8D DN: Takeda et *al.* 2006. Le score NES (Normalized enrichment score) décrit l’enrichissement dans le *geneset*. (Significativité : p-value < 0,05 ; FDR<0,25). Les diagrammes de Venn montrent les intersections entre les gènes dérégulés (FC > 1,5) par le traitement avec les composés DB818 ou DB1055 ou par l’inactivation avec le shHOXA9-1F3.

Sur l’ensemble des gènes dérégulés avec un facteur FC > 1,5, 138 gènes sont communément dérégulés suite à l’inhibition d’HOXA9 par les traitements aux composés DB818 et DB1055 ou par shRNA. Parmi ces 138 gènes, 93 sont surexprimés (expression augmentée par rapport au contrôle respectif) et 36 gènes sont sous-exprimés (expression diminuée) pour chacune de trois conditions (**Figure 37.A**). Seuls 9 gènes sont dérégulés en sens opposé entre l’inactivation par shHOXA9 et l’inhibition par traitement avec les DB818 et DB1055 (**Figure 37.B**).

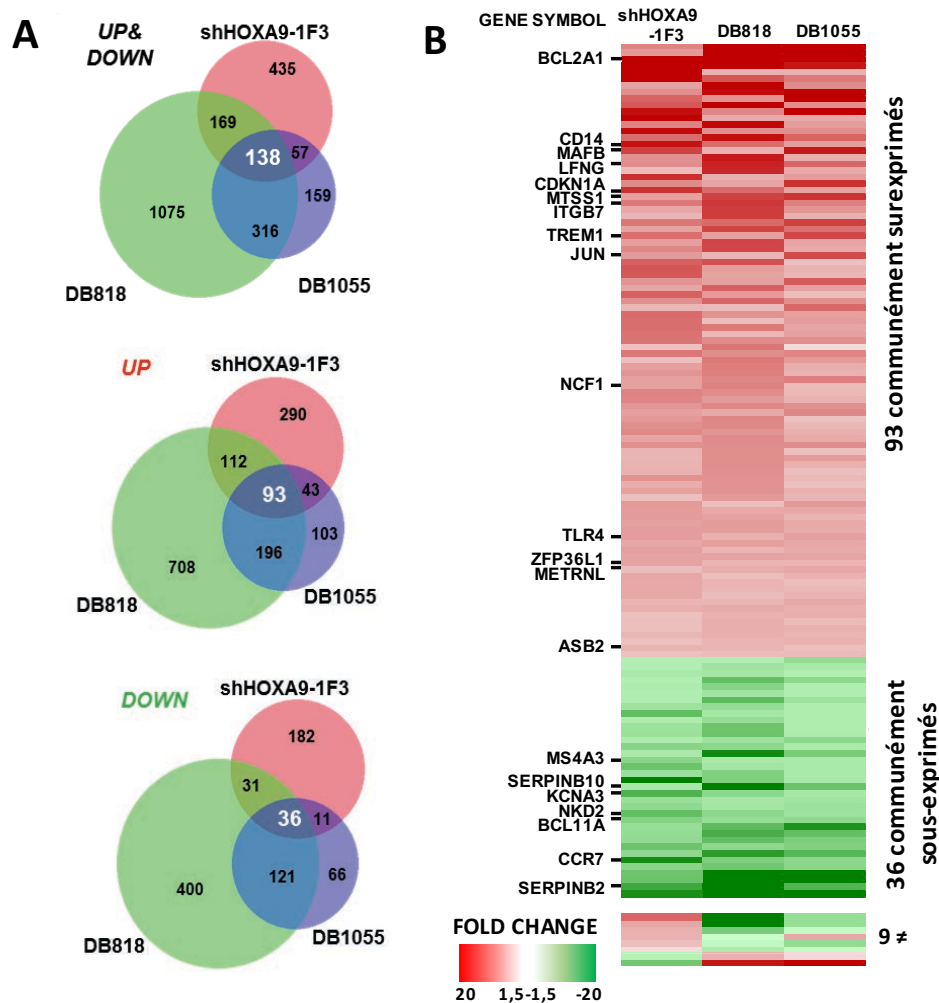


Figure 37 : Impact transcriptionnel de l'inhibition d'HOXA9 par shRNA et par le traitement avec les composés DB818 et DB1055 dans la lignée THP-1. A. Diagramme de Venn montrant les intersections entre les gènes dérégulés ($FC > 1,5$) par le traitement avec les composés DB818 ou DB1055 ou par l'inactivation avec le shHOXA9-1F3 **B.** Gènes communément dérégulés suite à l'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par le traitement avec les composés DB818 ou DB1055.

II.II) Inhiber HOXA9 entraîne une dérégulation de grandes fonctions cellulaires.

II.II.A) Analyse globale avec le logiciel GSEA

Le logiciel GSEA permet aussi de mettre en évidence les grandes voies et fonctions cellulaires impactées (C2, *curated gene sets* ; C5, *Gene Ontology (GO) gene sets*). Parmi les fonctions communément modulées par l'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par le traitement avec les composés DB818 et DB1055, les processus biologiques associés à la différenciation

(Figure 38.A/B), la prolifération (Figure 38.C) ou la mort cellulaire (Figure 38.D) présentent un enrichissement important (NES) et significatif (p-value et FDR).

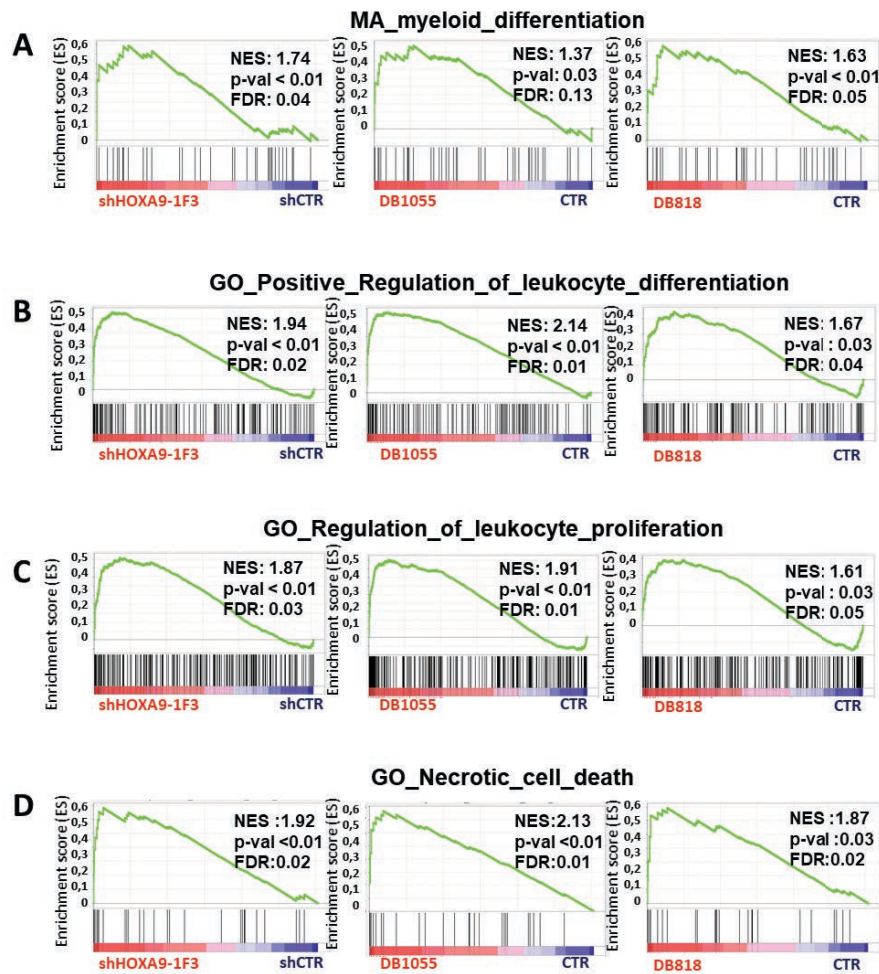


Figure 38 : Impact de l'inhibition d'HOXA9 sur les voies cellulaires par l'analyse GSEA dans la lignée THP-1. L'analyse des gènes dérégulés par le shHOXA9 ou par les traitements aux DB1055 et DB818 révèle un enrichissement significatif pour ces 3 conditions dans les *curated gene sets* ou les *gene ontology (GO)* associés à la différenciation (A-B), à la prolifération (C) et à la mort cellulaire (D). Le score NES (Normalized enrichment score) décrit l'enrichissement dans le *geneset*. (Significativité : p-value < 0,05 ; FDR<0.25).

II.II.B) Analyse globale avec le logiciel IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*)

II.II.B.1) Inhibition d'HOXA9 et dérégulations des fonctions cellulaires

Le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) permet, tout comme GSEA, de mettre en évidence les grandes voies et fonctions cellulaires en lien avec la dérégulation observée de l'expression des gènes. Dans le TOP 20 (trié sur la p-value associée à un z-score

correct>|1,65|) des fonctions cellulaires dérégulées suite à l'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par le traitement avec les composés DB1055 ou DB818, un grand nombre de ces fonctions sont communément dérégulées. Ces fonctions communes sont en lien avec la différenciation, l'activation ou le mouvement/la migration cellulaire (*Figure 39*).

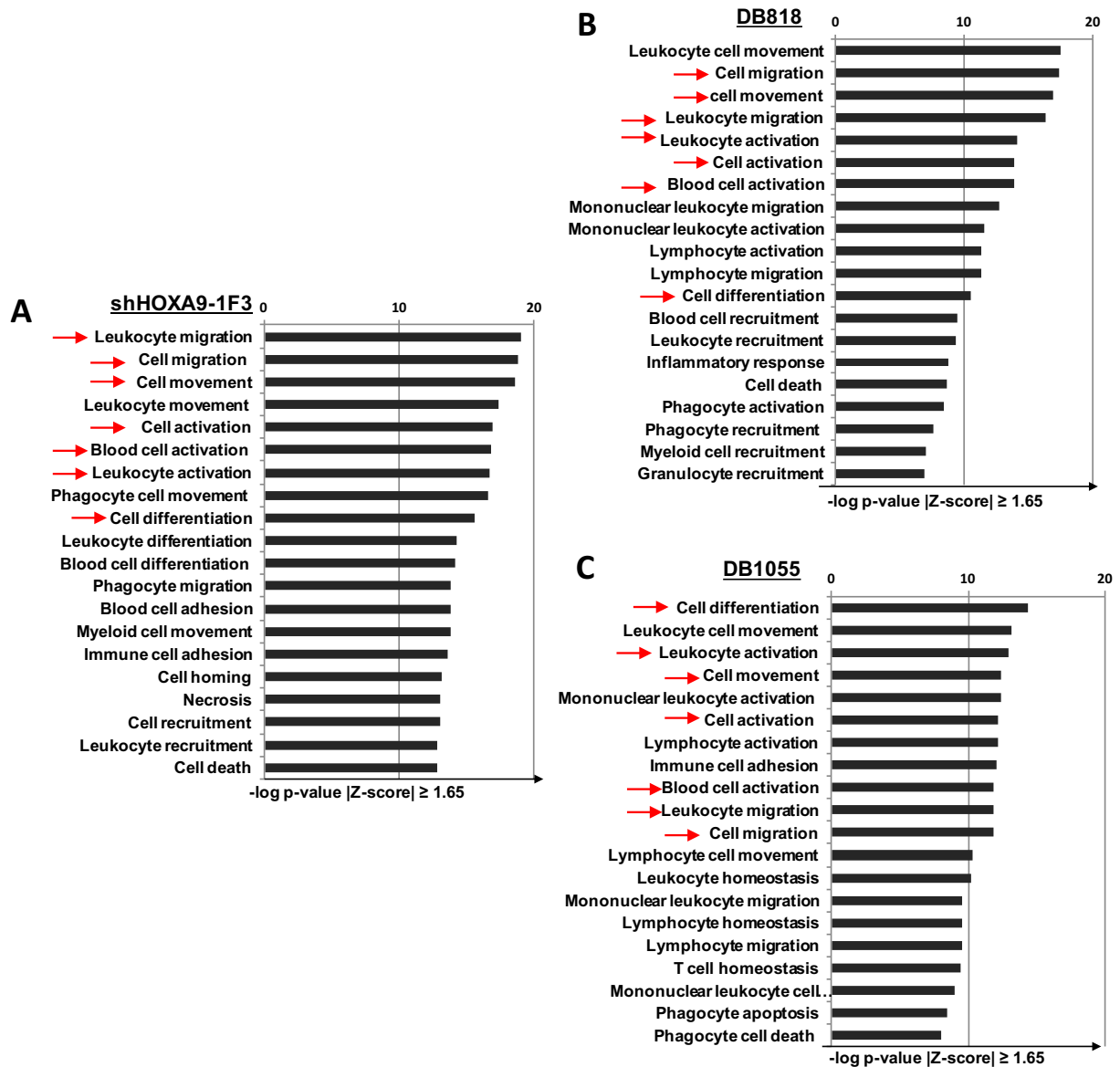


Figure 39 : Grandes voies cellulaires impactées par l'inhibition d'HOXA9 dans la lignée THP-1. TOP 20 des fonctions cellulaires dérégulées suite à l'inactivation d'HOXA9 par shRNA, par traitement au DB818 ou par traitement au DB1055. L'analyse est réalisée avec le logiciel IPA et le TOP 20 est établi sur les voies les plus significativement dérégulées (p-value, nombre de gènes connus dans la fonction) avec un z-score>|1,65| (le z-score est calculé en fonction de l'implication du gène dans la fonction et de son expression par rapport à ce qui est décrit dans la littérature). Les fonctions cellulaires communes (shHOXA9-1F3, DB1055 et DB818) sont indiquées par une flèche rouge.

II.II.B.2) Inhibition d'HOXA9 et dérégulations des gènes associés à l'activation et la différenciation cellulaire

L'expression de certains gènes impliqués dans les grandes fonctions mises en évidence grâce au logiciel IPA a été évaluée par RT-qPCR (**Figure 40**).

Parmi ces gènes, certains sont **surexprimés et associés à la différenciation cellulaire** :

- L'expression des récepteurs membranaires monocytaires/macrophagiques **CD11b** et **CD14** augmente au cours de la différenciation. Cela a été montrée dans la lignée THP-1 suite à un traitement au PMA, au 1,25-dihydroxyvitamin D3, au LPS ou encore avec des inhibiteurs de DOT1L (Kitchens *et al.* 1992; Ziegler-Heitbrock & Ulevitch 1993; Schwende *et al.* 1996; Daigneault *et al.* 2010).
- L'expression de **TLR4** (*toll-like receptor 4*) augmente au cours de la différenciation monocyttaire (Cheng *et al.* 2005b).
- L'expression d'**EMPI** (*epithelial membrane protein 1*) est augmentée au cours de la différenciation avec l'ATRA et a été décrite comme un facteur pronostic défavorable dans les LAL pédiatriques. *EMP1* est retrouvé, tout comme HOXA9, différenciellement exprimé dans les cellules souches leucémiques (Ariès *et al.* 2014).
- La protéine **ASB2** est associée à la dégradation de la protéine MLL au cours de la différenciation dans la lignée LAM HL-60 (Wang *et al.* 2012b).

A l'inverse, d'autres gènes **sous-exprimés sont associés à la différenciation cellulaire** :

- L'expression de **CTSG** (*cathepsin G*) diminue au cours de la différenciation des cellules U937 mais est surexprimée dans les LAM (Alatrash *et al.* 2017).
- **IRF8** (*interferon-regulatory factor 8*) est impliqué dans la différenciation des monocytes en macrophages (Starikova *et al.* 2008).
- L'expression du récepteur **CD38** diminue au cours de la différenciation normale des progéniteurs en monocytes (Poret *et al.* 2015; Bras *et al.* 2016).
- Le gène **KCNA3** (*Kv1.3 potassium channel*) est surexprimé dans des cellules progénitrices murines exprimant HOXA9+MEIS1 et dans des cellules THP-1 différenciées au PMA (Wang *et al.* 2006).
- L'expression du gène **SLC7A7** (*solute carrier family 7 member 7*) augmente lors de la différenciation des cellules THP-1 au PMA (Barilli *et al.* 2011), alors qu'HOXA9 diminue dans les mêmes conditions (Mahdipour & Mace 2011).

Certains gènes sont associés à la **prolifération cellulaire** :

- Le gène **MTSS1** (*metastasis suppressor-1*) est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans les LAM (Schemionek *et al.* 2015a) dont l'expression augmente ici suite à l'inactivation d'HOXA9 ou aux traitements par DB818 et DB1055.
- La protéine **p21** (**CDKN1A/CIP1/WAF1**) est un régulateur clef du cycle cellulaire dont l'expression augmente également suite à l'inactivation d'HOXA9 ou aux traitements par DB818 et DB1055.

- La protéine **NKD2** (*naked cuticle homolog 2*) régule la voie Wnt pour empêcher la prolifération des cellules. La voie Wnt est impliquée dans le contrôle de la mise en place de l'expression des gènes *HOX*. Sa sous-expression est de mauvais pronostic pour les patients atteints de LAM (Li *et al.* 2017a). Elle diminue toutefois ici suite à l'inactivation d'*HOXA9* ou aux traitements par DB818 et DB1055.

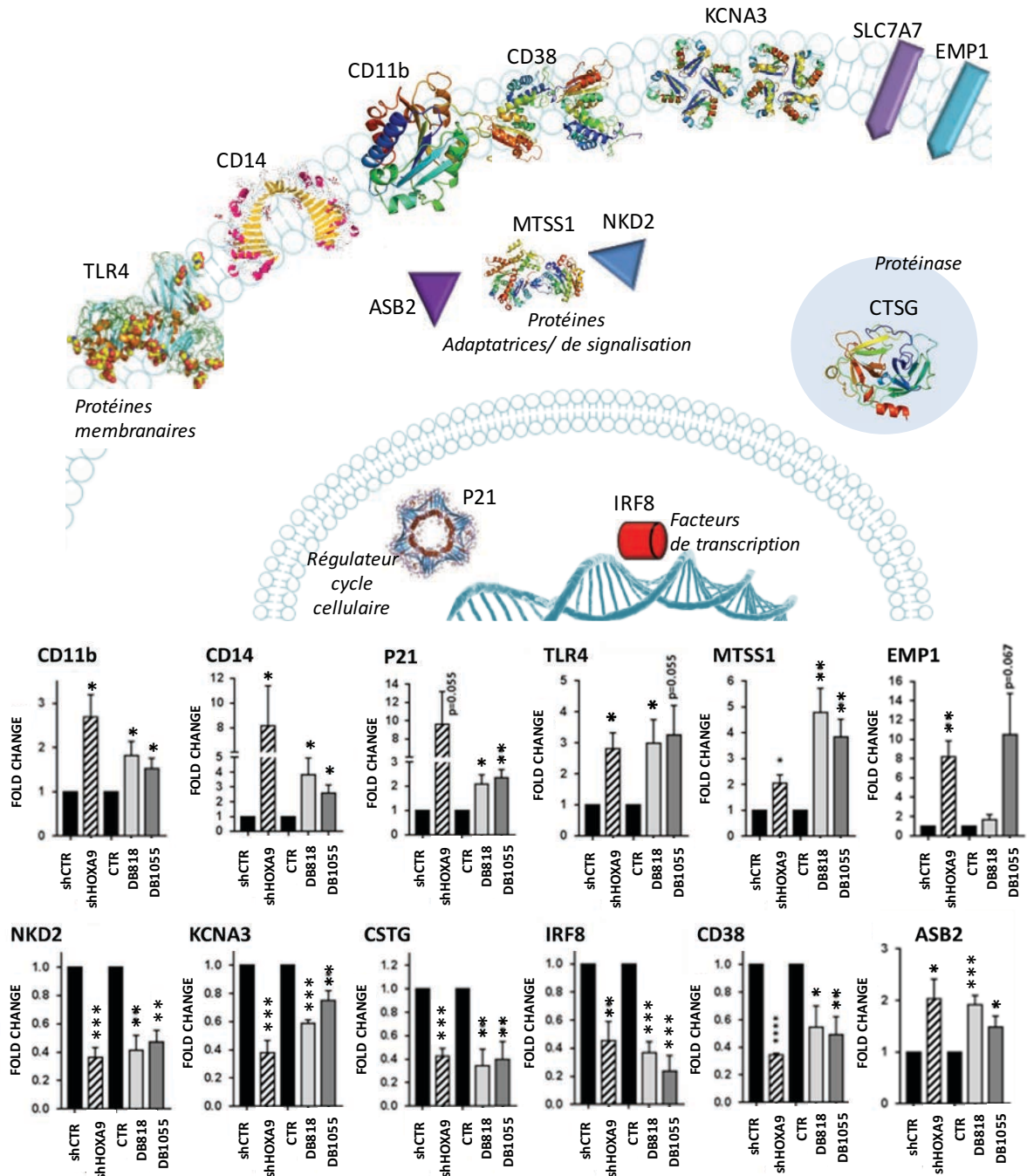


Figure 40 : Gènes communément dérégulés suite à l'inactivation par shRNA, par les traitements au DB818 ou au DB1055 dans la lignée THP-1 et impliqués dans les fonctions cellulaires « *Differentiation of cells* » et « *Activation of cells* ». Expression des gènes évaluée par RT-qPCR. shCTR, shHOXA9-1F3 : 48 h ; CTR, DB818 (10 μ M), DB1055 (10 μ M) : 24 h. n = 4 à 8 +/- SEM, unpaired t-test p-value : *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

II.II.B.3) Inhibition d'HOXA9 et dérégulations des grandes voies canoniques

L'analyse avec le logiciel IPA permet également de mettre en évidence les grandes voies canoniques dérégulées. IPA a ainsi révélé que l'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par le traitement avec les composés DB818 et DB1055 implique la voie de signalisation de TREM1 (*TREM1 signaling*) (**Figure 41.A**).

TREM1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 1*) est généralement exprimé à la surface des monocytes lors des stades tardifs de leur différenciation. Ce récepteur module la réponse immunitaire innée et adaptative des cellules myéloïdes par l'intermédiaire de son interaction avec la protéine DAP12 (*DNAX-activation protein-12*). L'activation de TREM1 entraîne une cascade de signalisation conduisant à l'activation de facteurs de transcription tels que NFκB (*nuclear factor-kappa B*) ou JUN, qui stimulent l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6, TNF-α et CCL2) (Zanzinger *et al.* 2009; Roe *et al.* 2014; Richter *et al.* 2016).

Par RT-qPCR, nous avons montré que l'expression de TREM1 est augmentée dans les cellules THP-1 suite à l'inhibition d'HOXA9 (shRNA, DBs), alors qu'elle diminue dans les cellules THP-1-TY-HOXA9 surexprimant HOXA9 (TY-clone1 surexprimant HOXA9, TY-clone5 exprimant davantage HOXA9 que le clone1) (**Figure 41.B**).

Il est à noter que la voie de signalisation de TREM1 agit généralement de manière synergique avec la voie des TLR (*Toll-like Receptor signaling*) impliquée dans la médiation de l'inflammation (Arts *et al.* 2013). Or, la voie des TLR est également modulée positivement par l'inhibition d'HOXA9 et retrouvée dans le TOP 10 des voies canoniques dérégulées (**Figure 41.A**).

Une autre voie canonique est également communément dérégulée par l'inhibition d'HOXA9 (shRNA, DB1055 ou DB818) : il s'agit de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les macrophages (*Reactive Oxygen Species in Macrophages*) (**Figure 41.A**). Ce résultat est en accord avec le processus de différenciation, puisqu'il a été montré que la production de ROS est une étape importante pour la différenciation des monocytes en macrophages (Zhang *et al.* 2013).

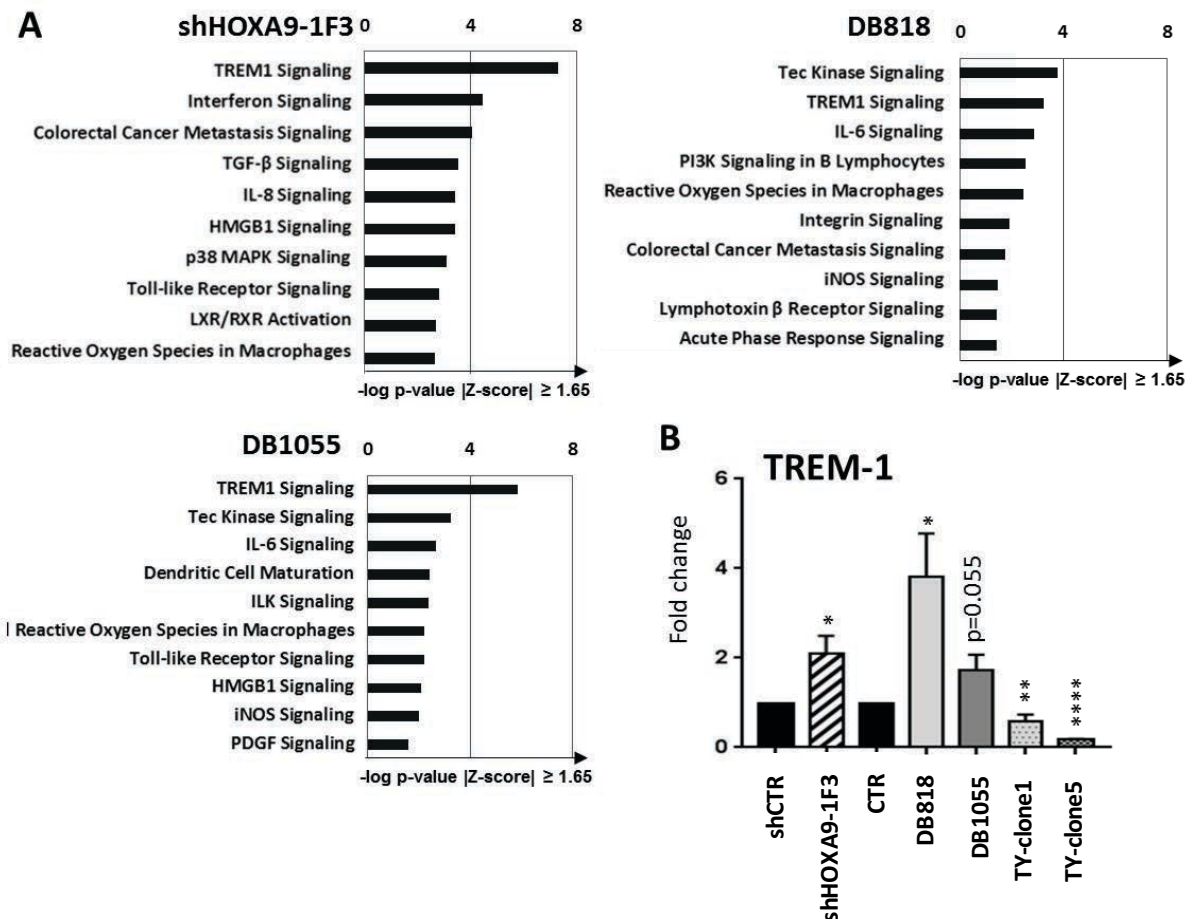


Figure 41 : Grandes voies canoniques impactées par l'inhibition d'HOXA9 dans la lignée THP-1. **A.** TOP 10 des voies canoniques dérégulées par l'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par le traitement avec les composés DB818 ou DB1055. L'analyse est réalisée sur le logiciel IPA, le TOP 10 est établi sur les voies les plus significativement dérégulées (p-value) avec un z-score $>|1,65|$. **B.** Expression du gène *TREM1* par RT-qPCR. shCTR, shHOXA9-1F3: 48 h; CTR, DB818 (10 μ M), DB1055 (10 μ M), TY-clone1, TY-clone5: 24 h. n =4 +/- SEM, unpaired t-test p-value: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$.

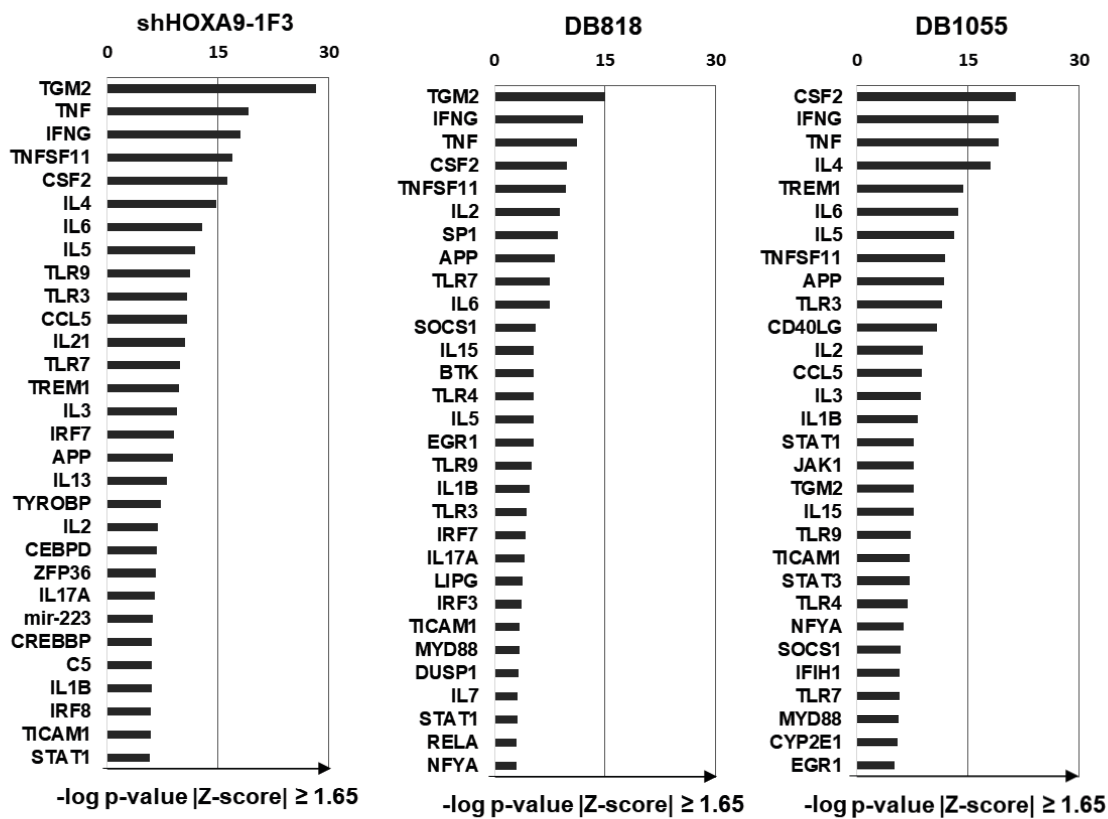
II.II.B.4) Inhibition d'HOXA9 et implication de régulateurs potentiels

IPA permet également l'étude prédictive des régulateurs responsables d'un ensemble de perturbations transcriptionnelles communes (*Upstream regulators*). La figure 42.A illustre le Top30 des potentiels régulateurs en amont présentant un z-score $>|1,65|$) et triés selon la p-value. Parmi ces régulateurs prédits retrouvés de manière commune après inhibition d'HOXA9 (shRNA, DB818 ou DB1055), se trouvent TNF α , IFN γ , CSF2, IL-6, IL-5, TLR9 ou encore IL1B (**Figure 42.A**).

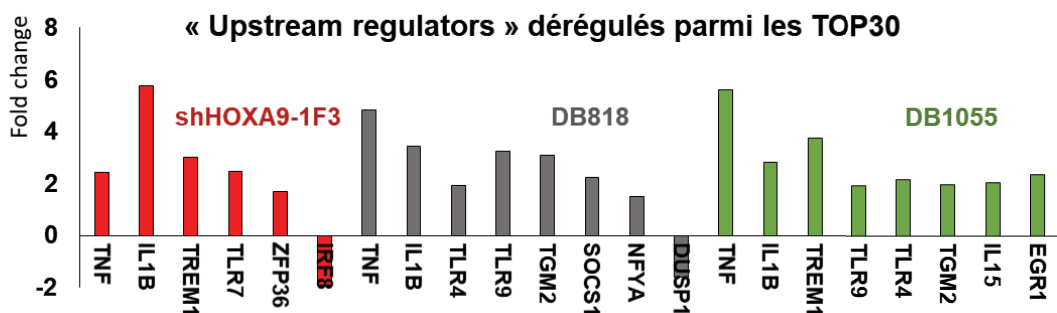
L'expression de tous les régulateurs prédits n'est pas systématiquement dérégulée suite à l'inhibition d'HOXA9. Toutefois, certains comme TREM1 (shHOXA9 et DB1055), le TNF α et l'IL1B le sont et présentent une expression dérégulée dans les trois conditions (shRNA, DB1055 et DB818) selon les données transcriptomiques (**Figure 42.B**) mais aussi par RT-qPCR (**Figure 42.C**). L'expression de TNF α et d'IL1B augmente ainsi suite à l'inhibition d'HOXA9 (shRNA, DB1055 et DB818) mais diminue lorsque HOXA9 est surexprimé (TY-clone1 et TY-clone5). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant que le TNF α et l'IL1B sont des cytokines sécrétées par les macrophages contrôlant la réponse pro-inflammatoire et la différenciation des cellules immunitaires (Arango Duque & Descoteaux 2014).

A

TOP30 « Upstream regulators »



B



C

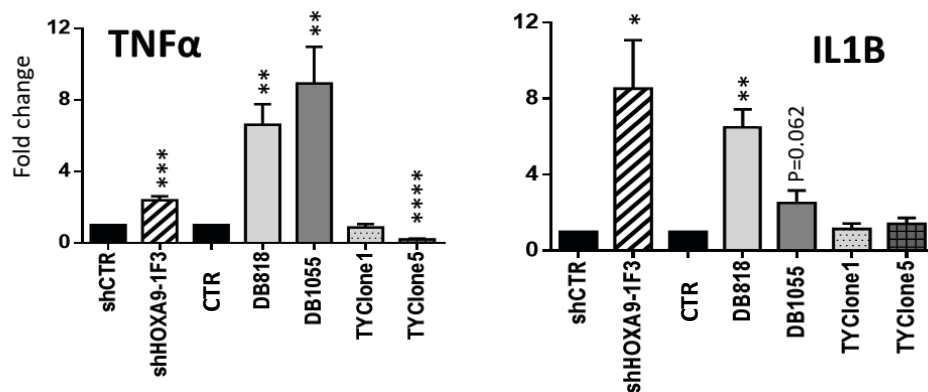


Figure 42 : Etude des régulateurs potentiels impliqués suite à l'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par le traitement au DB818 ou au DB1055 dans la lignée THP-1.

A. TOP 30 des facteurs (*upstream regulators*) potentiellement responsables des perturbations transcriptionnelles observées après l'inhibition d'HOXA9 (shRNA ou DB). L'analyse est réalisée sur le logiciel IPA, le TOP 30 est établi sur les *upstream regulators* les plus significativement retrouvés (p-value) avec un z-score $>|1,65|$. **B.** « *Upstream regulators* » figurant dans le TOP30 dont l'expression est dérégulée suite à l'inhibition par le shHOXA9 ou par le traitement au DB818 ou au DB1055. **C.** Validation par RT-qPCR de la dérégulation de l'expression des « *upstream regulators* » *TNF α* et *IL1B*. shCTR, shHOXA9-1F3 : 48 h ; DB818 (10 μ M), DB1055 (10 μ M), TY-clone1, TY-clone5 : 24 h. n =4 +/- SEM, unpaired t-test p-value : * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$.

CONCLUSION PARTIE II

Evaluation transcriptomique de l'inhibition d'HOXA9 dans des modèles de LAM.

L'analyse transcriptomique menée sur la lignée THP-1 après invalidation par shRNA a permis de valider l'implication d'HOXA9 dans le caractère leucémogène de cette lignée tant au niveau des **gènes connus que sur les grandes voies associées au rôle d'HOXA9 déjà décrits dans la littérature telles que la prolifération, la mort et la différenciation des cellules (Figures 38 et 39)** (Dorsam *et al.* 2004; Vijapurkar *et al.* 2004; Faber *et al.* 2009). Un grand nombre de gènes dérégulés par l'invalidation par shRNA le sont également après traitement au DB818 et au DB1055. Ces gènes sont impliqués dans les mêmes grandes voies cellulaires mises en évidence à l'aide d'outils bioinformatiques tels que les logiciels GSEA ou IPA.

Ainsi, en comparaison avec les données de la littérature pour lesquelles des modèles d'invalidation ou de surexpression d'HOXA9 ont été réalisés, l'inhibition d'HOXA9 dans la lignée THP-1, que ce soit par shRNA ou par l'inhibition de son activité de liaison à l'ADN, montre des similitudes dans la modulation de l'expression génique, caractérisée par un enrichissement fort et une bonne significativité des « *genesets* » qui en sont associés (**Tableau 7 et Figure 36**). De manière très intéressante, l'inhibition avec le shRNA et après traitement au DB1055 ou au DB818 est impliquée dans différenciation cellulaire qui pourrait être associée à des processus inflammatoires mettant en jeu de grands effecteurs tels que **TREM1**, **TNF α** ou encore **IL1B** (**Figure 43**).

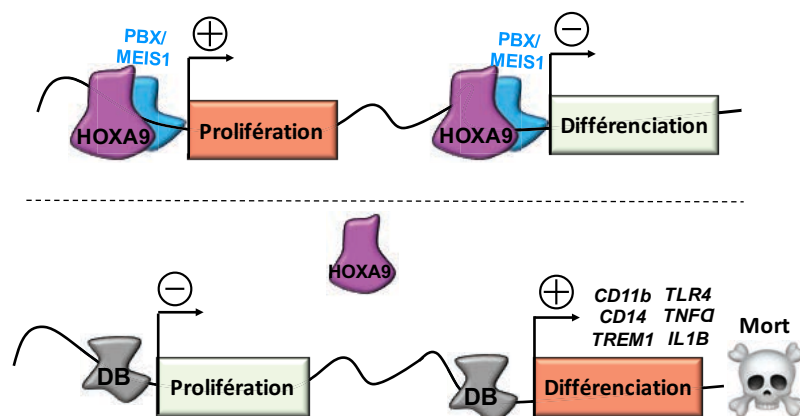


Figure 43 : Conclusion Partie II. L'analyse transcriptomique a mis en évidence que l'inhibition d'HOXA9 conduit à la transcription de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire tels que *CD11b* et *CD14*.

PARTIE III. Evaluations cellulaires de l'inhibition d'HOXA9 dans des modèles de LAM.

L'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par le traitement avec les composés DB818 et DB1055 a mis en évidence une dérégulation commune de gènes impliqués dans des processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération et la mort des cellules. La suite de cette étude avait pour but de confirmer ces effets par des tests fonctionnels *in cellulo* et de répondre ainsi à plusieurs questions sur l'implication d'HOXA9 dans ces grands processus cellulaires.

III.I) Inhiber HOXA9 impacte-t-il la prolifération cellulaire ?

La prolifération cellulaire a été évaluée sur les lignées THP-1, EOL-1 et U937 après inhibition d'HOXA9 par shRNA (shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3) ou par les composés DB818 et DB1055 pendant 4 à 6 jours. Cette fonction a été évaluée par numération globale et confirmée par incorporation et dilution progressive au cours du temps d'un traceur de prolifération. Les cellules sont incubées avec une sonde fluorescente (CellTrace), incorporée dans les cellules, qui va progressivement se diluer au fur et à mesure des divisions cellulaires. De plus, nous avons réalisé des tests clonogéniques avec la lignée THP-1 afin d'évaluer la capacité des cellules à proliférer et former des clones.

Un ralentissement de la croissance des cellules THP-1 (**Figure 44.A**), EOL-1 (**Figure 44.B**) et U937 (**Figure 44.C**) a été mesuré au cours du temps suite à l'inhibition d'HOXA9. Il est observé par numération que la croissance des cellules U937 inhibée pour HOXA9 ralentit voire décroît au cours du temps (**Figure 44.A**).

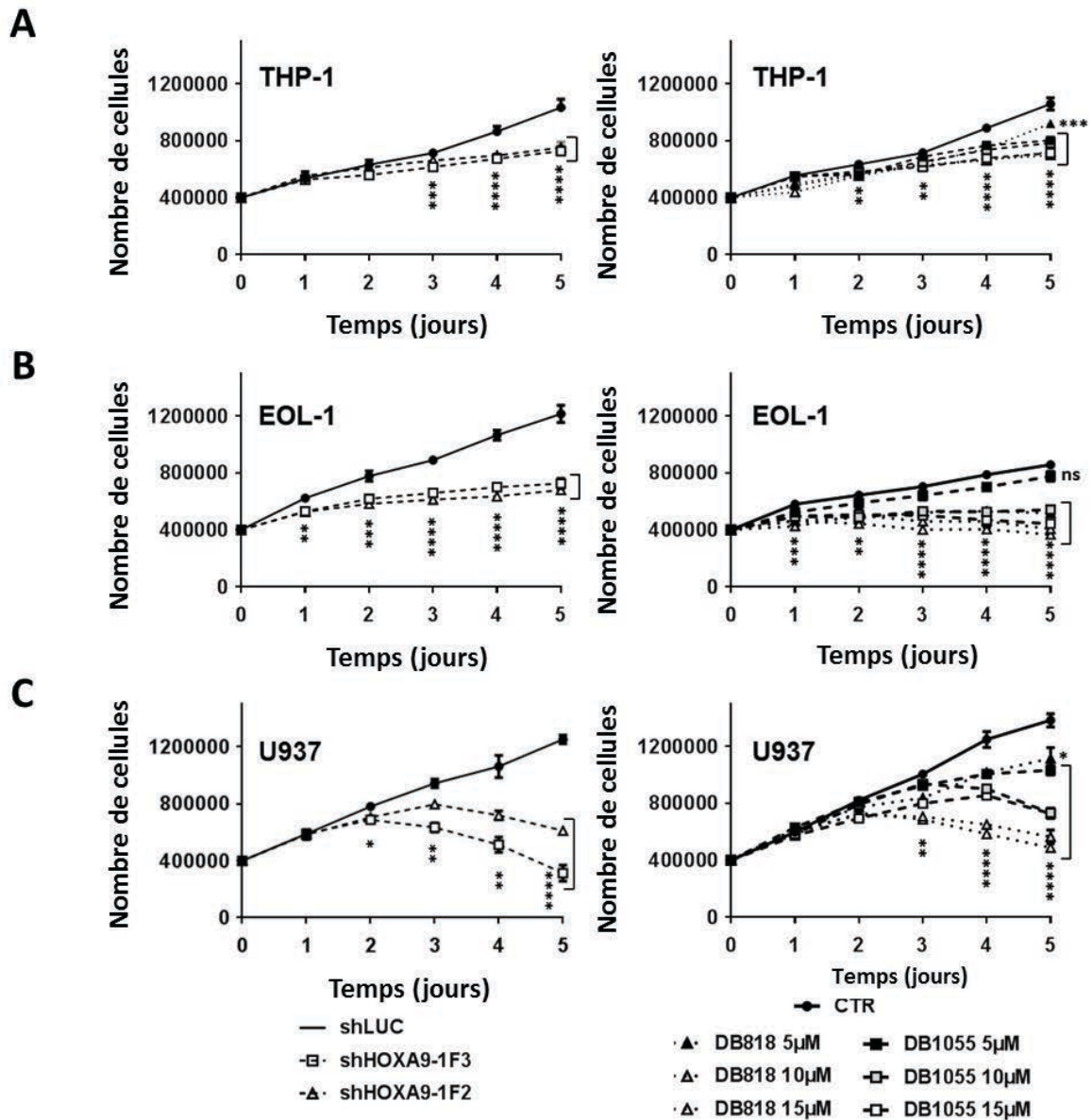


Figure 44 : Numération des cellules au cours du temps suite à l'inhibition d'HOXA9. Les cellules ont été comptées au cours du temps (0, 1, 2, 3, 4, et 5 jours) suite à l'inactivation d'HOXA9 par shRNA ou après traitement au DB1055 ou au DB818 (5, 10 et 15 µM) des lignées cellulaires THP-1 (A), EOL-1 (B) et U937 (C). n =3 +/- SEM, unpaired t-test, p-value : *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

Les cellules THP-1 transduites pour l'expression du shHOXA9-1F2 ou du shHOXA9-1F3 présentent un ralentissement de la prolifération à 4 jours après infection lentivirale. De même, pour les cellules THP-1 traitées aux DB818 ou DB1055 (10 µM) ont une la prolifération diminuée aux 3^{ème} et 4^{ème} jour (Figure 45.C). La réduction des capacités de prolifération des cellules EOL-1 est significative dès le 2^{ème} jour pour les traitements au

DB818 ou au DB1055 et montre une tendance à 4 jours pour les cellules exprimant les shHOXA9 (**Figure 45.A**). La prolifération des cellules U937 diminue à compter du 3^{ème} et du 4^{ème} jour post-infection lentivirale pour l'expression des shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3. En revanche, pour les cellules U937 le traitement au DB1055 ou au DB818 est associé à une diminution de la prolifération de manière plus tardive à 6 jours (**Figure 45.B**). Les tests clonogéniques réalisés dans la lignée THP-1 montrent une diminution de la capacité clonogénique des cellules invalidées par shRNA ou traitées au DB1055 ou au DB818 et cela de manière dose dépendante (**Figure 45.D**).

Afin d'évaluer la capacité des cellules à proliférer et donc à se diviser au cours du temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire à 48, 72 et 96 h post-traitement ou post-transduction.

Les cellules THP-1 ne montrent pas de différences significatives au cours des phases du cycle cellulaire, exceptée une augmentation faible de la proportion en phase G0/G1 des cellules exprimant les shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 à 96 h (**Figure 46.A**). Dans les cellules U937, l'invalidation transcriptionnelle montre une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0/G1 au cours du temps mais de manière non significative. Cela est aussi faiblement retrouvé suite au traitement au DB818 ou au DB1055 mais ne perdure pas dans le temps (**Figure 46.B**). Concernant les cellules EOL-1, le traitement au DB1055 provoque une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0/G1 mais elle ne semble pas perdurer (**Figure 46.C**).

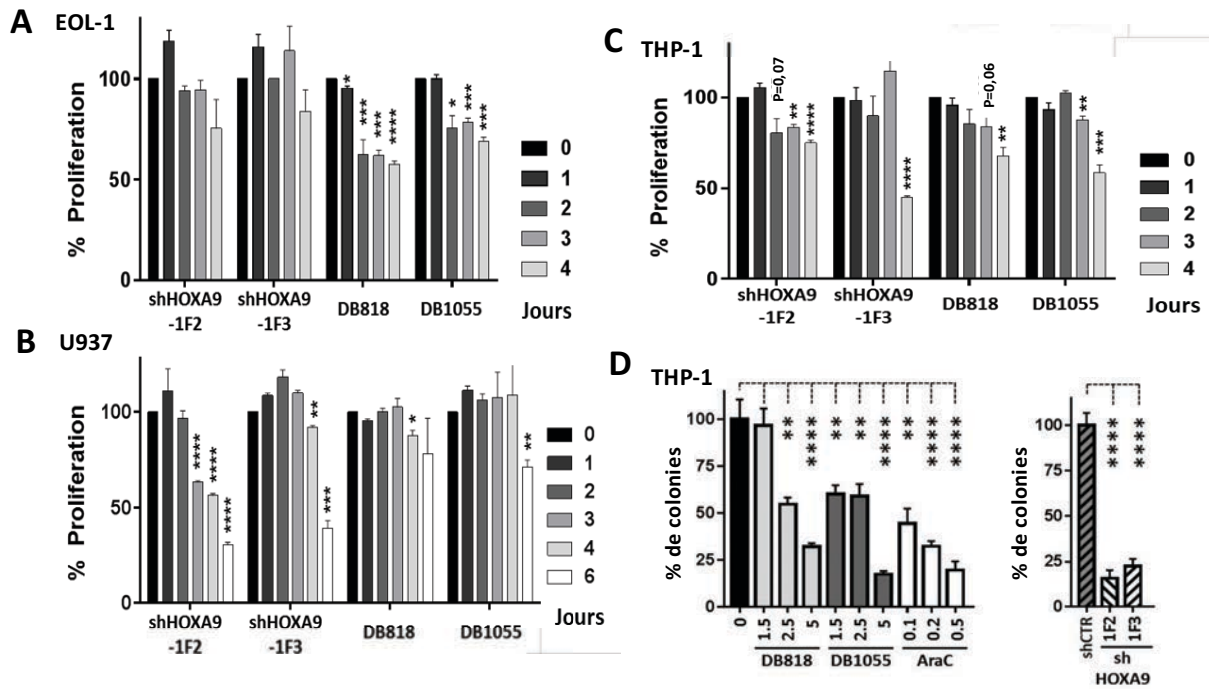


Figure 45 : Etude de la prolifération cellulaire. A-C Analyse de la prolifération par cytométrie en flux au cours du temps suite à l'inhibition d'HOXA9 par marquage au Celltrace. Les cellules sont marquées par une sonde fluorescente (CellTrace-CSFE pour les conditions non traitées, DB818 et DB1055, ou CellTrace-Violet pour les conditions shCTR, shHOXA9-1F2, shHOXA9-1F3). La fluorescence est analysée en cytométrie en flux chaque jour. Au fur et à mesure du temps, décroît proportionnellement aux divisions cellulaires. Chaque condition est normalisée par rapport à son contrôle (shHOXA9-1F2, shHOXA9-1F3 par rapport au shCTR et DB1055, DB818 par rapport aux cellules non traitées), la prolifération est comparée au temps J0 (100 %). **D.** Tests clonogéniques réalisés sur la lignée THP-1 traitées au DB1055 ou au DB818 (1,5 ; 2,5 ou 5 μ M) ou invalidées par shRNA (shCTR, shHOXA9-1F2 ou shHOXA9-1F3). Les clones sont comptés sous microscope inversé 14 jours post-traitement ou infection lentivirale. n =3 +/- SEM, unpaired t-test, p-value : *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

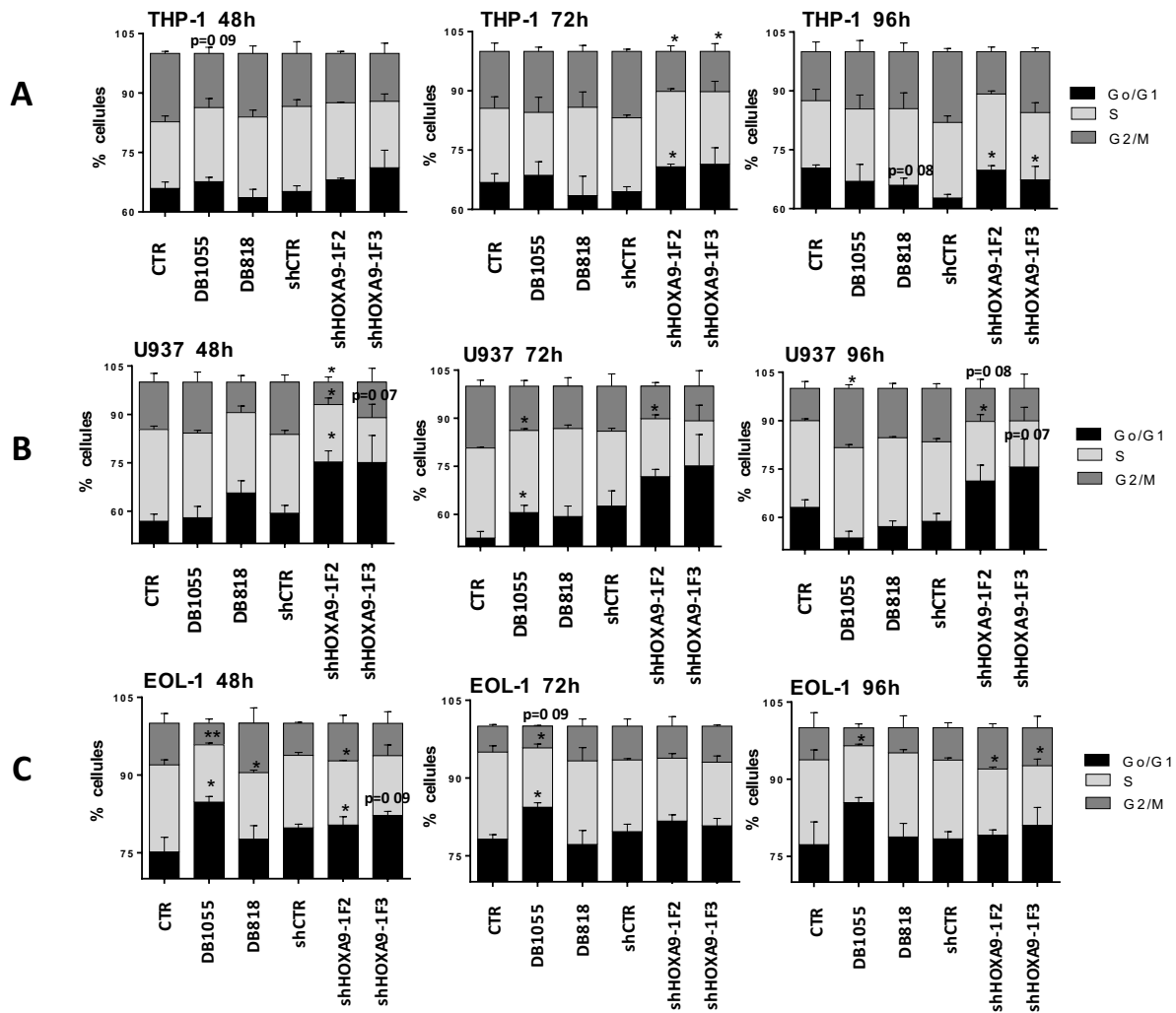


Figure 46 : Etude du cycle cellulaire au cours du temps suite à l'inhibition d'HOXA9. Le pourcentage de cellules THP-1 (A), U937 (B) ou EOL-1 (C) dans les différentes phases du cycle cellulaire est analysé en cytométrie en flux à 48, 72 et 96 h. n =3 +/- SEM, unpaired t-test, p-value : * <0,05, **<0,01, ***<0,001.

L'inhibition d'HOXA9 conduit à la diminution de la prolifération des cellules qui n'est pas associée à un arrêt majeur dans une des phases du cycle cellulaire. De plus, les cellules s'arrêtent de croître voire leur nombre décroît pour la lignée U937 (*Figure 44.C*) suggérant une mort progressive des cellules. C'est pourquoi, nous avons étudié la mort des cellules suite à l'inhibition d'HOXA9.

III.II) Empêcher l'activité d'HOXA9 conduit-il à la mort des cellules ?

La mort cellulaire a été étudiée par l'incorporation d'iodure de propidium à 2, 3, 4 et 7 jours dans les cellules mortes et quantifiée par cytométrie en flux.

Les cellules THP-1 traitées au DB1055 ou au DB818 (5, 10 et 15 μ M) meurent progressivement dès 3 jours tandis que les cellules transduites pour l'expression des shHOXA9-1F2 ou -1F3 commencent à mourir dès 4 jours. A 7 jours, on observe une augmentation significative de la mort des cellules THP-1 pour l'ensemble des conditions (shHOXA9-1F2, shHOXA9-1F3, DB1055, DB818) (*Figure 47*).

Les cellules EOL-1 commencent à mourir à 4 jours post-invalidation (shHOXA9) et dès 2 jours après traitement au DB. Les cellules U937 meurent dès 3 et 4 jours post-infection lentivirale pour l'expression du shHOXA9 et à 7 jours, une hausse de la mort cellulaire est observée dans toutes les conditions (shHOXA9-1F2, shHOXA9-1F3, DB1055, DB818). L'induction de la mort des cellules EOL-1 et U937 traitées au DB1055 ou au DB818 est dose dépendante et augmente progressivement au cours du temps (*Figure 47*).

L'analyse transcriptomique réalisée dans la lignée THP-1 avait mis en évidence que l'inhibition d'HOXA9 conduisait à l'activation de gènes impliqués dans la mort cellulaire (*Figure 38.D*). Ces données ont ainsi été confirmées par des expérimentations cellulaires dans la lignée THP-1 mais aussi dans les lignées U937 et EOL-1.

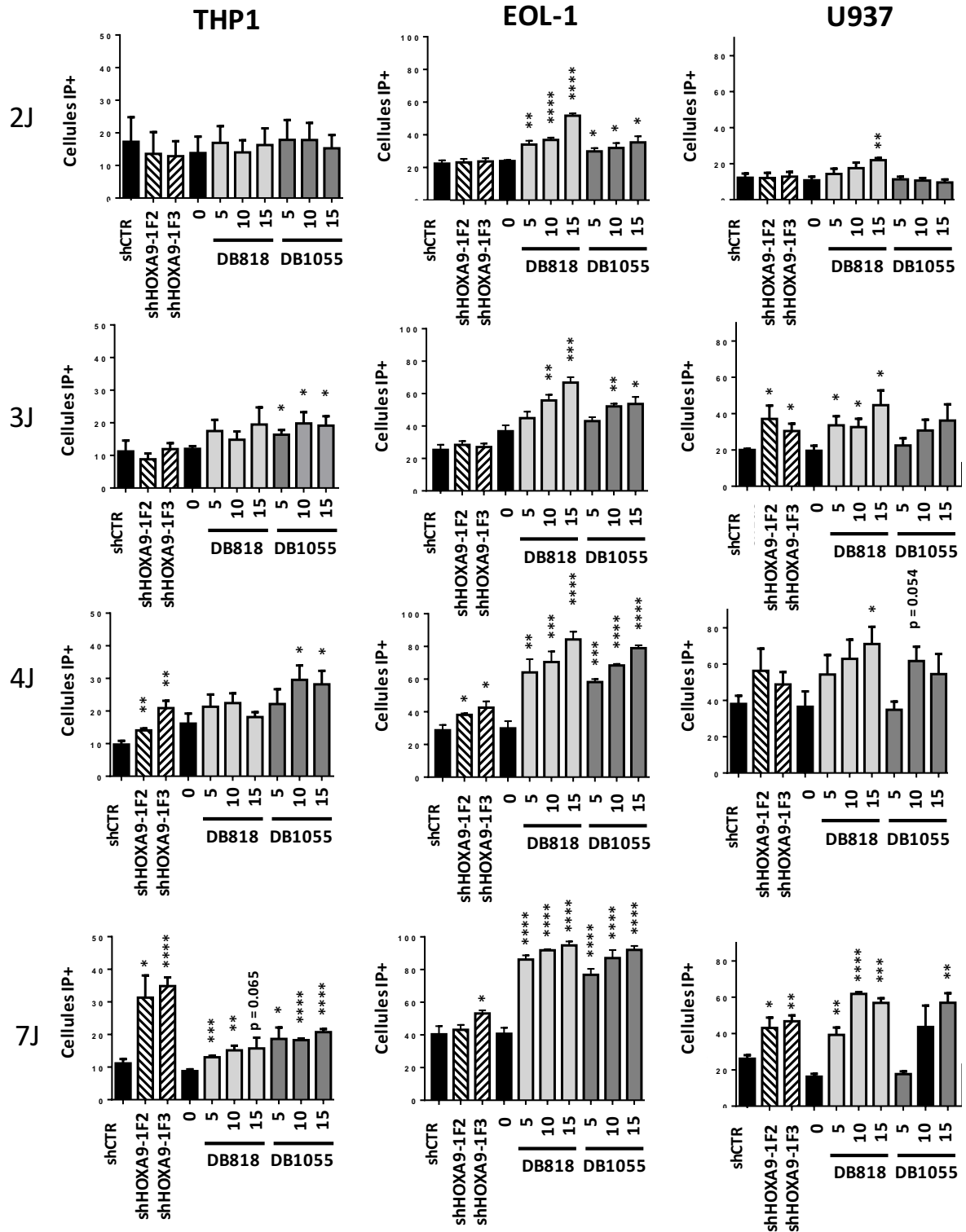


Figure 47 : Etude de la mort cellulaire par marquage à l'iodure de propidium. Les cellules THP-1, EOL-1 et U937 sont traitées au DB1055 ou au DB818 (5, 10, 15 μ M) ou transduites pour l'expression de shHOXA9-1F2, shHOXA9-1F3 ou shCTR entre 2, 3, 4 et 7 jours. Elles sont ensuite analysées en cytométrie en flux pour la mort cellulaire par un marquage à l'iodure de propidium. n =6 +/- SEM, unpaired t-test, p-value: *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

L'analyse transcriptomique montrait qu'empêcher l'activité d'HOXA9 conduit à la différenciation monocyttaire *via* l'activation de potentiels effecteurs responsables de la modulation de l'expression des gènes. Aussi, nous avons étudié la différenciation des cellules THP-1, mais aussi des lignées EOL-1 et U937 suite à l'inhibition d'HOXA9 au cours du temps.

III.III) L'inhibition d'HOXA9 permet-elle de lever le blocage de la différenciation ?

Les cellules sont transduites pour l'expression de shRNA (shCTR, shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3) ou sont traitées au, au DB1055 (5, 10, 15 μ M) ou au DB818 (5, 10, 15 μ M). Les cellules U937 (**Figure 48**), EOL-1 (**Figure 49**) et THP-1 (**Figure 50**) invalidées pour HOXA9 ou traitées aux DB818, DB1055 ou PMA (2 ng/mL), un agent différenciateur actif sur les cellules THP-1 en macrophages mais dont l'activité n'est pas clairement élucidée (Schwende *et al.* 1996). Elles sont suivies en cytométrie en flux pour leur expression de surface des récepteurs monocytaires/macrophagiques CD11b (U937, EOL-1 et THP-1) et CD14 (THP-1) au cours du temps. Ces marqueurs sont spécifiques de ce type de différenciation monocyttaire/macrophagique (Daigneault *et al.* 2010) et leur expression est augmentée au niveau de l'ARN comme montré par analyse transcriptomique et RT-qPCR (**Figures 37 et 40**).

La lignée cellulaire U937 présente de manière basale des caractéristiques monocytaires avec une forte expression de base du récepteur membranaire CD11b (60 - 80 % de cellules CD11b positives) (**Figure 48.B**). La **figure 48.A** montre, à titre illustratif, les profils d'expression en cytométrie en flux du marqueur CD11b au cours du temps suite à l'inhibition d'HOXA9 par traitement au DB818, au DB1055 ou par shRNA. L'expression des shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 induit une augmentation de l'expression du récepteur CD11b à la surface des cellules dès 3 jours qui persiste jusqu'à 7 jours. Le traitement au DB1055 engendre une augmentation marquée de l'expression du récepteur CD11b dès 3 jours à 15 μ M mais qui ne persiste pas dans le temps. Par ailleurs, le traitement au DB818 induit une augmentation de l'expression de CD11b à 7 jours. La faible différenciation des cellules U937, peut s'expliquer par le fait que les cellules expriment fortement, de manière basale, le récepteur CD11b à leur surface, mais aussi par le fait que l'inhibition d'HOXA9 entraîne rapidement la mort des cellules (**Figure 45**).

U937 CD11b

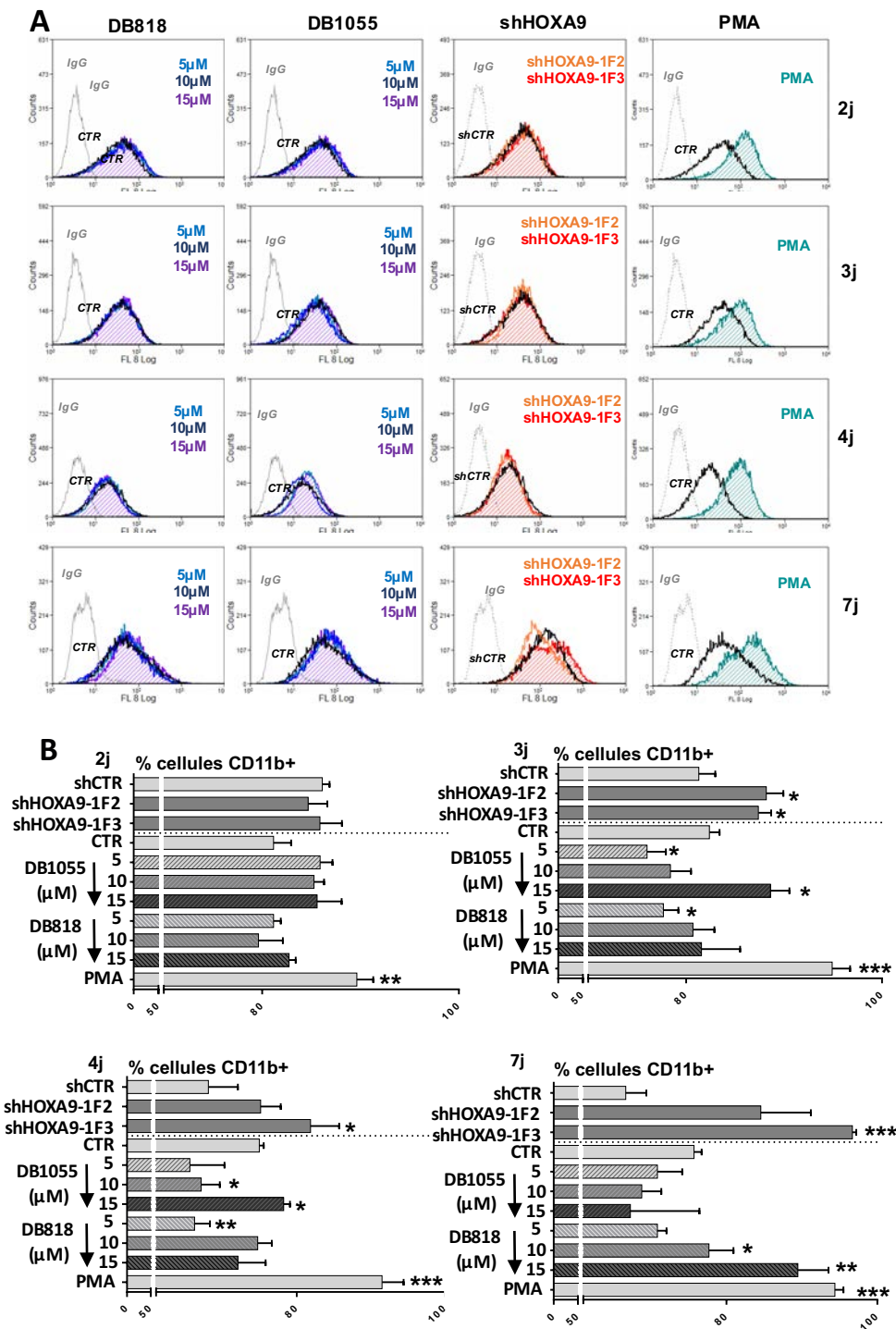


Figure 48 : Etude de la différenciation cellulaire des cellules U937 par l'expression de CD11b à la surface des cellules par cytométrie en flux. **A.** Histogrammes représentatifs à 2, 3, 4 et 7 jours de l'expression du marqueur monocytaire/macrophagique CD11b à la surface des cellules U937 transduites pour l'expression du shHOXA9-1F2 ou shHOXA9-1F3, traitées au DB1055, au DB818 à 5, 10 et 15 μM ou traitées au PMA (2 ng/mL). **B.** Pourcentages de cellules U937-CD11b positives suite à l'inactivation d'HOXA9 ou traitement avec les inhibiteurs à 2, 3, 4 et 7 jours. $n = 6 \pm$ SEM, unpaired t-test, p-value: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$.

Parmi la population de cellules EOL-1, 10 à 20 % de cellules sont CD11b-positives. La *figure 49.A* montre l'expression du marqueur CD11b en cytométrie en flux au cours du temps suite à l'inhibition d'HOXA9, par traitement au DB818, au DB1055 ou par shRNA. L'inhibition d'HOXA9 par shRNA (shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3) induit une légère augmentation de l'expression du récepteur CD11b à la surface des cellules au cours du temps et qui est significative à 4 jours.

Le traitement au DB1055 des cellules EOL-1 induit également une légère augmentation de la présentation du récepteur CD11b à la surface des cellules dès 3 jours sans toutefois s'intensifier sur la durée. Le traitement au DB818 semble plus efficace sur les cellules EOL-1 que le DB1055 puisque dès 2 jours, on observe une augmentation dose dépendante de l'expression de CD11b à la surface des cellules qui augmente de manière significative jusqu'à 7 jours (*Figure 49.B*).

EOL-1 CD11b

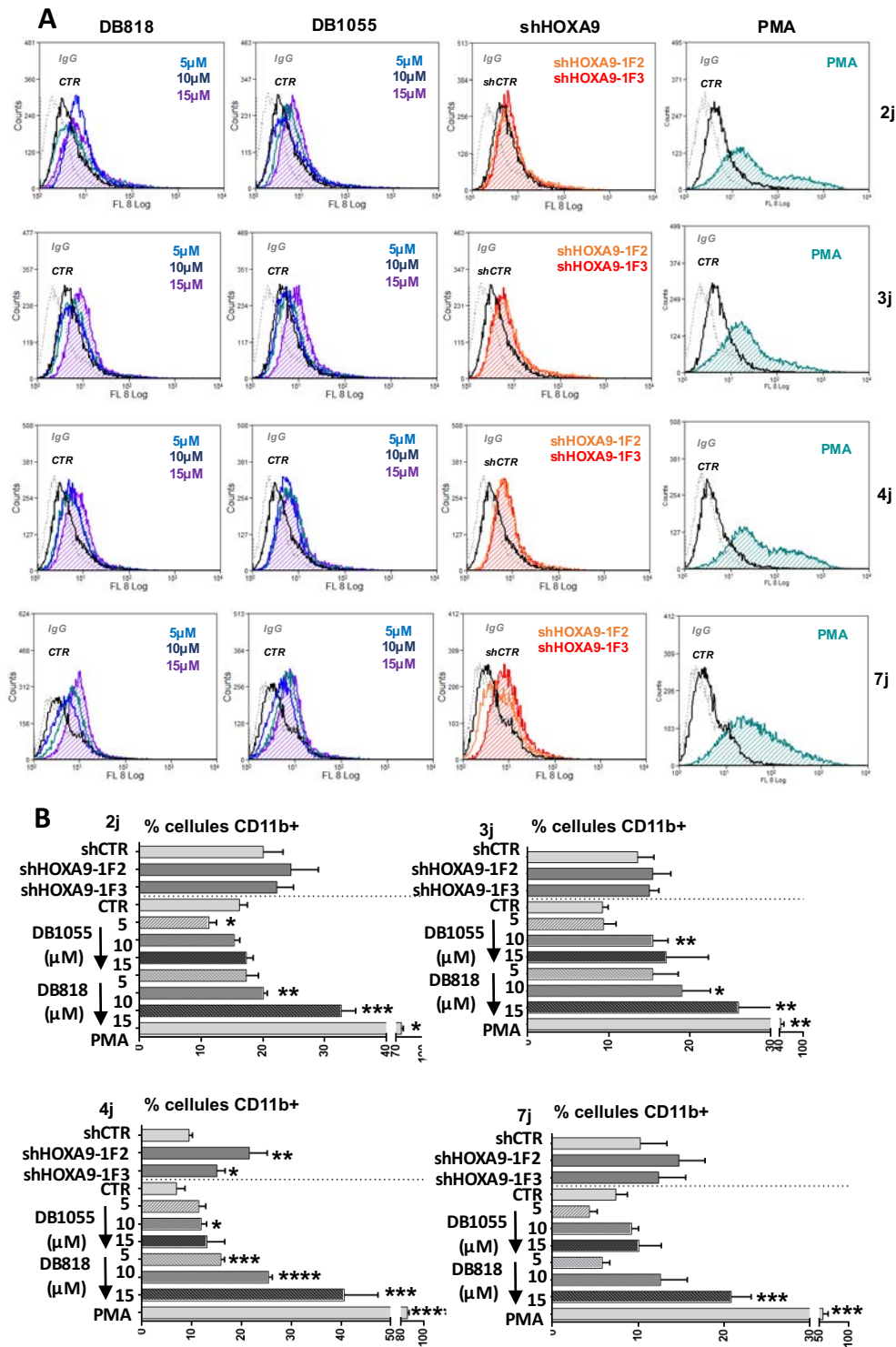


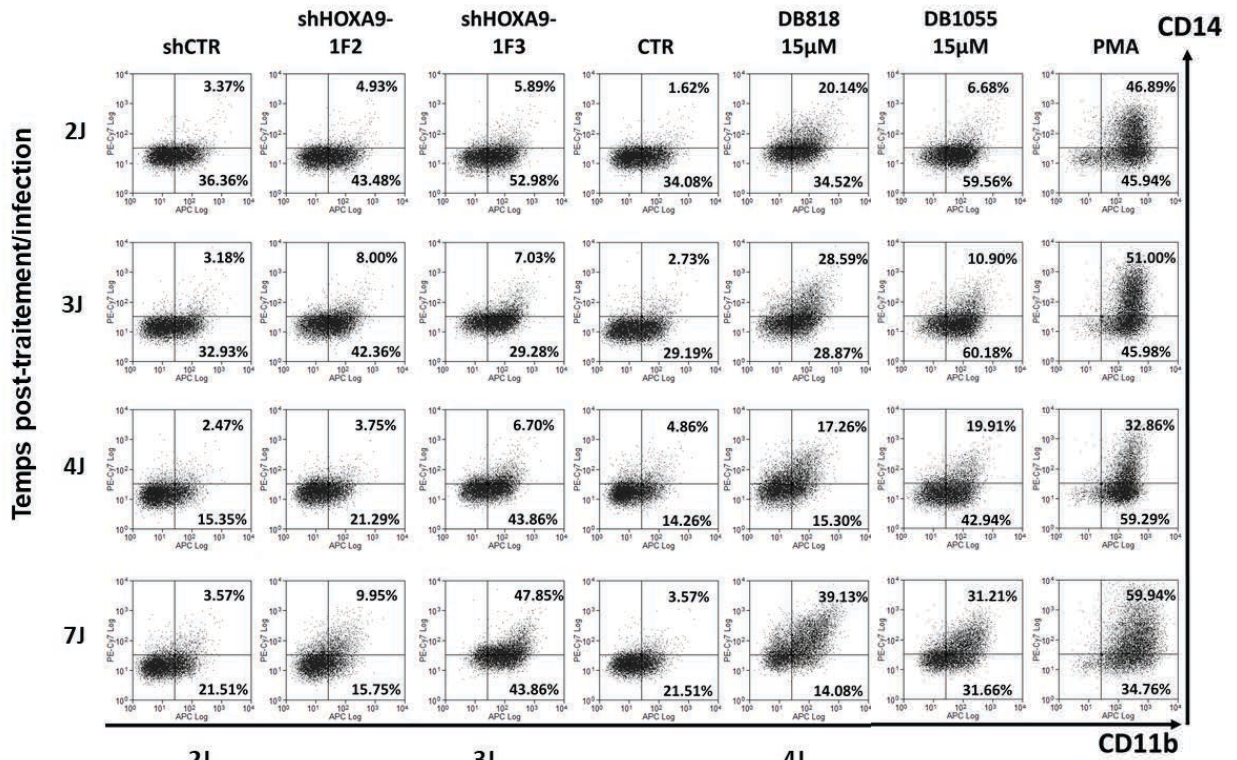
Figure 49 : Etude de la différenciation cellulaire des cellules EOL-1 par l'expression de CD11b à la surface des cellules par cytométrie en flux. **A**. Histogrammes représentatifs à 2, 3, 4 et jours de l'expression du marqueur monocyttaire/macrophagique CD11b à la surface des cellules EOL-1 transduites pour l'expression du shHOXA9-1F2 ou shHOXA9-1F3, traitées au DB1055 ou au DB818 à 5, 10 et 15 μM ou traitées au PMA (2 ng/mL). **B**. Pourcentages de cellules EOL-1 -CD11b positives suite à l'inhibition d'HOXA9 à 2, 3, 4 et 7 jours. $n=6 \pm$ SEM, unpaired t-test, p-value: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$.

Parmi la population de cellules THP-1, 40 à 60 % d'entre elles sont CD11b-positives (**Figure 50.B**) et entre 10 et 20 % sont CD14-positives (**Figure 50.C**). La **figure 46.A** illustre les profils d'expression au cours du temps de cellules THP-1 par cytométrie en flux pour l'expression des marqueurs CD11b et CD14, après la répression d'HOXA9, par traitement au DB818, au DB1055 ou par shRNA. Les cellules inhibées pour HOXA9 expriment progressivement les récepteurs CD11b puis CD14 à leur surface. (**Figure 50.A**)

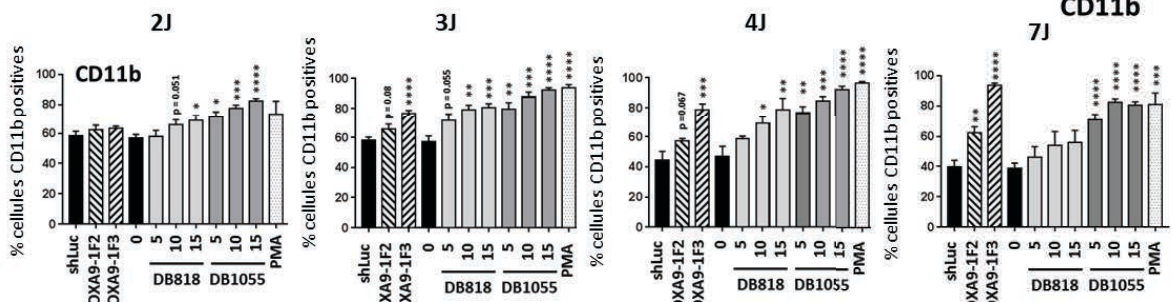
L'inhibition d'HOXA9 par shRNA (shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3) est associée à une nette augmentation de l'expression du récepteur CD11b à la surface des cellules au cours du temps et cela dès 3 jours et une légère augmentation de l'expression du récepteur CD14 à 7 jours. Pour les cellules THP-1 exprimant le shHOXA9-1F2 ou le shHOXA9-1F3 double positives CD11b/CD14, il y a une augmentation du pourcentage de ces cellules au cours du temps et cela de manière significative à 7 jours. Le traitement des cellules THP-1 au DB818 des cellules THP-1 induit une augmentation de l'expression du récepteur CD11b à la surface des cellules dès 2 jours et jusqu'à 7 jours de manière dose dépendante. Le traitement au DB1055 semble plus efficace pour lever le blocage de la différenciation des cellules THP-1 que le DB818 puisque dès 2 jours, on observe une augmentation dose dépendante de l'expression de CD11b à la surface des cellules. En effet, l'expression de CD11b à la surface des cellules augmente de manière significative et plus importante après traitement au DB1055 que traitement au DB818 et ce jusqu'à 7 jours. (**Figure 50.B**) Les traitements avec le DB818 ou le DB1055 induisent une augmentation du pourcentage de cellules CD14 positives dès 4 jours post-traitement et qui persiste jusqu'à 7 jours. (**Figure 50.C**) La population de cellules double positives CD11b/CD14 croît au cours du temps suite aux traitements par le DB1055 ou le DB818 dès 3 jours et ce jusqu'à 7 jours. (**Figure 50.D**)

A

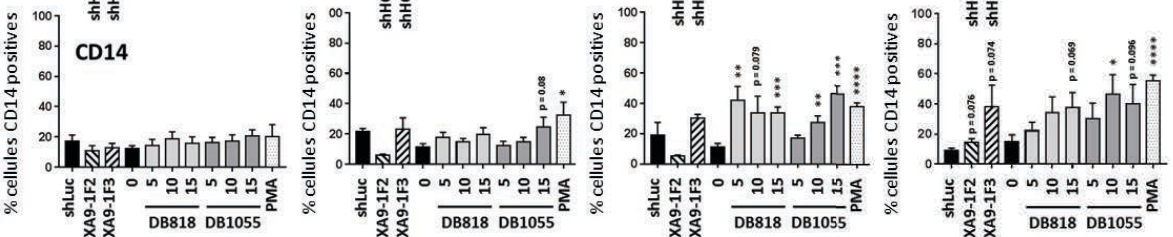
THP-1 CD11b/CD14



B



C



D

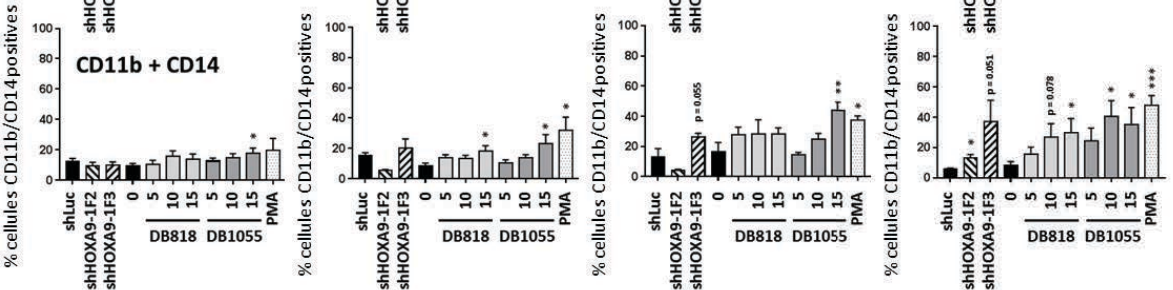


Figure 50 : Etude par cytométrie en flux de la différenciation cellulaire des cellules THP-1 par l'expression des marqueurs CD11b et CD14 à la surface des cellules.

A. Histogrammes représentatifs à 2, 3, 4 et 7 jours de l'expression des marqueurs monocytaires/macrophagiques CD11b et CD14 à la surface des cellules THP-1 transduites pour l'expression du shHOXA9-1F2 ou shHOXA9-1F3, traitées au DB1055 ou au DB818 à 5, 10 et 15 μ M ou traitées au PMA (2 ng/mL). **B.** Pourcentages de cellules THP-1-CD11b positives suite à l'inhibition d'HOXA9 à 2, 3, 4 et 7 jours. **C.** Pourcentages de cellules THP-1-CD14 positives suite à l'inhibition d'HOXA9 à 2, 3, 4 et 7 jours. **D.** Pourcentages de cellules THP-1-CD11b et CD14 positives suite à l'inhibition d'HOXA9 à 2, 3, 4 et 7 jours. N =6 +/- SEM, unpaired t-test, p-value : *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

En accord avec les données obtenues lors de l'analyse transcriptomique sur la lignée THP-1, l'inhibition d'HOXA9 entraîne la levée du blocage de la différenciation caractérisée par une augmentation progressive de l'expression des marqueurs CD11b puis CD14 à la surface des cellules.

Au cours de la différenciation, les cellules expriment un programme génique spécifique de nouveaux marqueurs à leur surface et changent morphologiquement et phénotypiquement. Notamment, elles sécrètent des cytokines et chimiokines inhérentes à leur activité (Arango Duque & Descoteaux 2014; Turner *et al.* 2014). Les résultats du transcriptome réalisé dans la lignée THP-1 ont montré une augmentation de l'expression de certaines d'entre elles, associée à un possible rôle d'effecteur (*upstream regulator*) sur un panel de gènes se trouvant alors dérégulés (**Figure 42**).

Aussi, la question a été posée de savoir si, suite à l'inhibition/invalidation d'HOXA9, les cellules THP-1 sécrètent-elles des cytokines caractéristiques de leur différenciation ?

Pour répondre à cette question, nous avons évalué la présence de cytokines dans le surnageant de culture des cellules différenciées, par un test ELISA (MultiAnalyte Cytokines array) permettant de cribler la présence de 12 cytokines humaines impliquées dans l'inflammation (IL1a, IL1B, IL-6, IL-12, IL-17, IFN γ et le TNF α) ou dans la prolifération (IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, GM-CSF) des cellules (**Figure 51.A**). Ce test a permis de détecter la présence des cytokines à 48 et 72 h après le traitement au DB1055, DB818 ou post-infection lentivirale (shHOXA9-1F3 vs shCTR). Pour exemple, la présence d'IL8 est détectable mais la sécrétion n'augmente pas ou peu entre les conditions contrôles par rapport aux traitées au DB1055 ou au DB818 ou invalidées par shRNA. Par contre, le TNF α et d'IL1B sont tous les deux augmentés à 48 et 72 h post-traitement. De plus, la sécrétion de ces cytokines augmente après inhibition d'HOXA9 après traitement au DB818 et au DB1055 ou après expression du

shHOXA9-1F3 tout comme leur expression observée par l'analyse du transcriptome (**Figure 42**). L'augmentation de l'expression et de la sécrétion de ces cytokines est d'autant plus intéressante qu'il a été montré que le traitement à l'ATRA de cellules de LAP induit une modulation de IL1B, TNF α , IL-6 et IL-8 (Dubois *et al.* 1994) et plus particulièrement en activant la voie MEK/ERK (Tang *et al.* 2017).

Afin de valider ces résultats, un dosage a été réalisé spécifiquement pour chacune de ces cytokines en triplicats de façon indépendante. Nous avons mesuré une augmentation de la sécrétion d'IL1B suite au traitement avec le DB818 qui est significative à 72 h mais pas d'augmentation significative après traitement au DB1055. L'inhibition d'HOXA9 par shRNA induit une augmentation de la sécrétion d'IL1B (de manière significative) à 48 et 72 h (**Figure 51.B**). La sécrétion de TNF α est elle augmentée (de manière significative) à 48 et 72 h après inhibition d'HOXA9 par le DB1055, par le DB818 ou par shRNA (**Figure 51.C**).

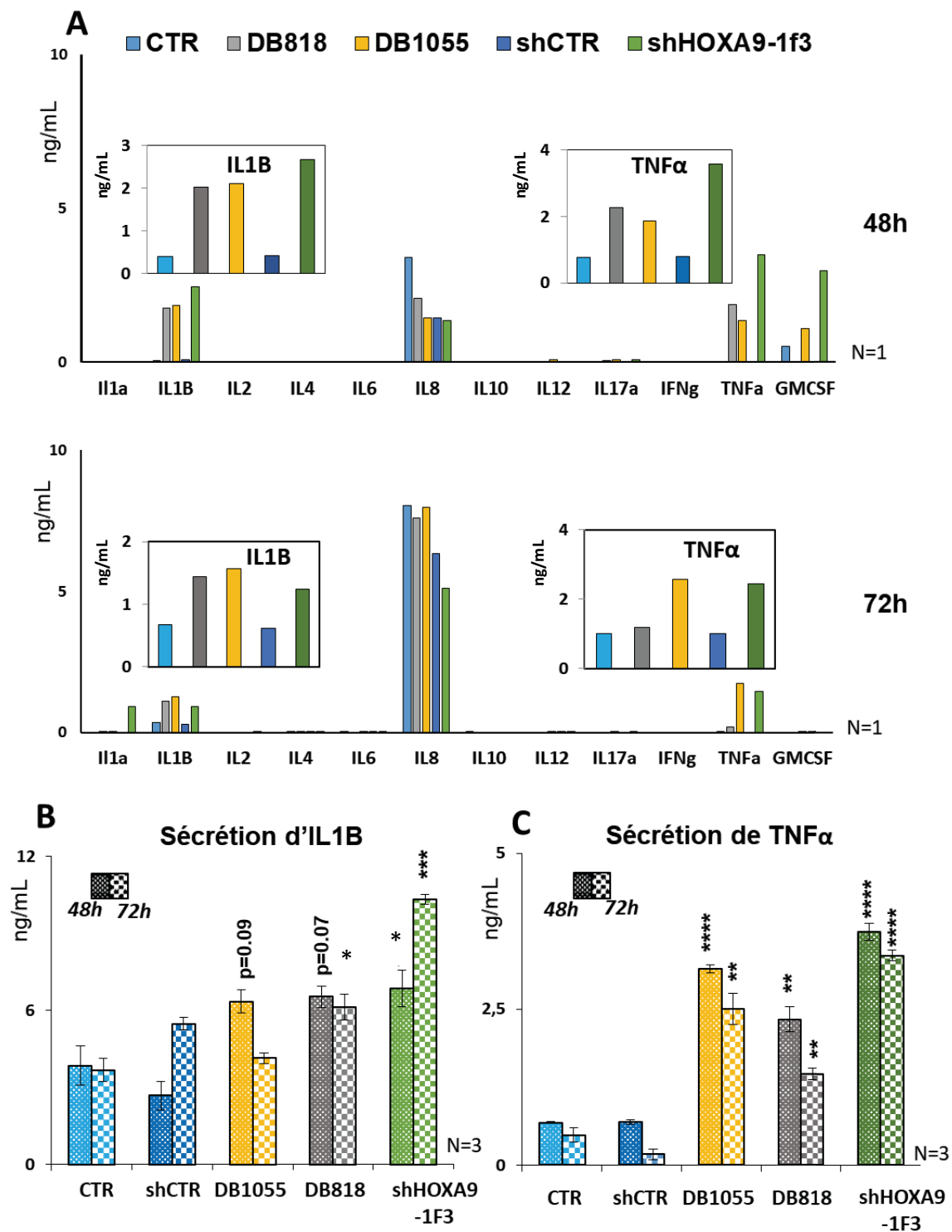


Figure 51 : Etude de la sécrétion de cytokines par les cellules THP-1 suite à l'inhibition d'HOXA9 à 48 et 72 h. THP-1 transduites pour l'expression du shHOXA9-1F2 ou shHOXA9-1F3, traitées au DB1055 ou au DB818 à 15 μ M **A.** Evaluation de la présence de 12 cytokines dans le surnageant de culture de cellules THP-1 inhibées à 48 ou 72 h. **B.** Dosage des cytokines IL1B et TNF α dans le surnageant de culture d'un million de cellules THP-1 inhibées à 48 ou 72 h. n =3 +/- SEM, unpaired t-test p-value: *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

CONCLUSION PARTIE III

Evaluations cellulaires de l'inhibition d'HOXA9 dans des modèles de LAM.

L'analyse transcriptomique réalisée sur la lignée THP-1 a permis de montrer que le facteur de transcription HOXA9 est impliqué dans un grand nombre de fonctions cellulaires conduisant à la prolifération, la survie et le blocage de la différenciation, fonctions inhérentes au caractère leucémique des cellules. Aussi, l'inhibition d'HOXA9 module l'expression de gènes régulant ces processus cellulaires. Face à ces données, il convenait de démontrer fonctionnellement les effets prédits en lien avec le panel de gènes dérégulés. Ce travail a été réalisé sur la lignée THP-1 dont les effets de l'inhibition d'HOXA9 ont été décrits au cours de l'analyse transcriptomique, mais a aussi été réalisé sur les lignées cellulaires U937 et EOL-1, modèles surexprimant *HOXA9* et sensibles au traitement au DB1055 et au DB818. Le blocage de l'activité d'HOXA9 induit une **diminution de la prolifération cellulaire** (*Figures 43 et 44*). Il y a un ralentissement de la croissance des cellules au cours du temps et une chute du nombre de cellules pour la lignée U937 due à l'**induction de la mort cellulaire** (*Figure 47*). Suite à l'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par les traitements au DB818 ou au DB1055, les lignées U937, THP-1 et EOL-1 meurent progressivement au cours du temps. **L'activité d'HOXA9 est donc nécessaire au maintien de la prolifération et la survie de ces cellules.** L'étude de l'expression des marqueurs monocytaires/macrophagiques CD11b et CD14 (dont l'expression génique est modulée suite à l'inhibition d'HOXA9) à la surface des cellules démontre que **l'arrêt de l'activité d'HOXA9 lève le blocage de la différenciation** (*Figures 47, 48 et 49*). De plus, nous avons montré que les cellules THP-1 différenciées par l'inhibition d'HOXA9 sécrètent du **TNF α** et de l'**IL1B** que ce soit suite au traitement avec le composé DB1055 ou le composé DB818, ou suite à l'invalidation par shRNA (*Figure 50*).

Notre hypothèse est que l'inhibition d'HOXA9 conduit à la diminution de la prolifération et au déclenchement de la différenciation des cellules qui meurent ensuite (*Figure 52*). Cependant, il se peut que l'arrêt de la prolifération et la mort des cellules soient programmés en même temps que la levée du blocage de leur différenciation.

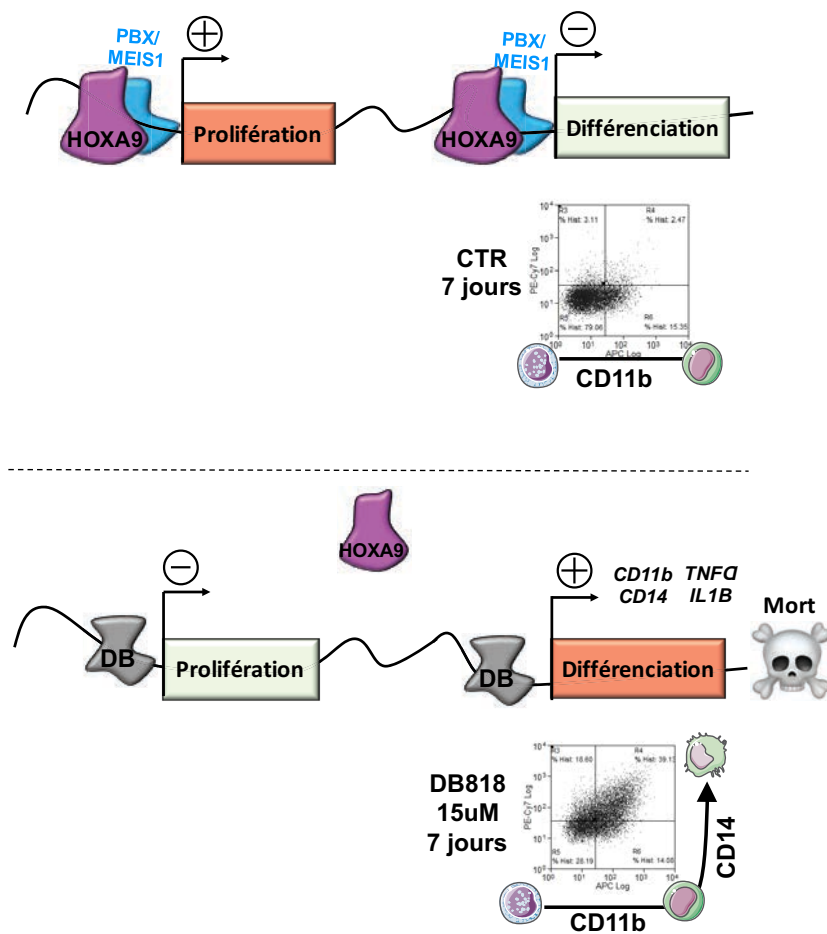


Figure 52 : Conclusion partie III. L'inhibition d'HOXA9 conduit à la diminution de la prolifération, à la levée du blocage de la différenciation et à la mort cellulaire.

Pour évaluer l'effet leucémogène d'HOXA9 et dans un but thérapeutique, il était primordial d'évaluer l'effet de l'inhibition fonctionnelle d'HOXA9 *in vivo*.

PARTIE IV : Evaluation du composé DB1055 sur des modèles murins implantés de cellules issues de lignées de LAM et sur des modèles de PDX (patient-derived-xenografts)

Des expériences *in vivo* ont été réalisées sur des souris immunodéficientes NSG, pour NOD-scid gamma (*NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*), permettant l'implantation rapide et optimale des cellules en évitant le rejet. De part les mutations *scid*, protéine du complexe de réparation de l'ADN, ces souris sont déficientes en lymphocytes T et B comme les souris SCID alors que la mutation additionnelle du récepteur à l'IL-2 (*IL2rgnull*) conduit à une déficience en cellules NK fonctionnelles. Les souris sont inoculées de cellules de lignées LAM (U937, THP-1 et EOL-1) ou de blastes de patients. Le composé DB1055 a été préféré pour cette étude car il était mieux toléré que le DB818 qui, à l'injection en intra-péritonéal, induisait chez les souris un état de prostration perdurant plusieurs minutes, signe classique de douleur aiguë chez la souris. Afin d'évaluer l'effet anti-leucémique du composé DB1055 chez la souris, il était tout d'abord nécessaire de vérifier l'incidence de l'inhibition d'HOXA9 par shRNA sur lignées cellulaires *in vivo*.

IV.I) Validation de l'impact de l'expression d'HOXA9 dans des modèles murins leucémiques par l'injection de cellules issues de lignées cellulaires.

IV.I.A) Invalidation par shRNA d'HOXA9 et survie des souris

Des études de survie ont été réalisées avec les lignées THP-1 et U937. Les cellules sont transduites par un lentivirus pour l'expression d'un shRNA (shCTR, shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3) et sont injectées en intra-péritonéal dans les souris 24 h post-infection lentivirale. Les souris sont pesées chaque semaine et prélevées toutes les deux semaines afin de suivre l'implantation des cellules.

La survie des souris implantées de cellules THP-1 transduites pour l'expression d'un shRNA dirigé contre l'ARNm d'*HOXA9* est en moyenne de 70 jours et est augmentée en comparaison aux souris injectées de cellules contrôles (shCTR et CTR) dont la survie était en moyenne de 50 jours (**Figure 53.A**). De même, les souris injectées de cellules U937 exprimant le shHOXA9-1F2 ou le shHOXA9-1F3 survivent plus longtemps que les souris injectées de cellules exprimant le shCTR ou les cellules contrôles (**Figure 53.C**). Ainsi, l'inhibition d'HOXA9 par shRNA augmente la survie des souris leucémiques U937 et THP-1.

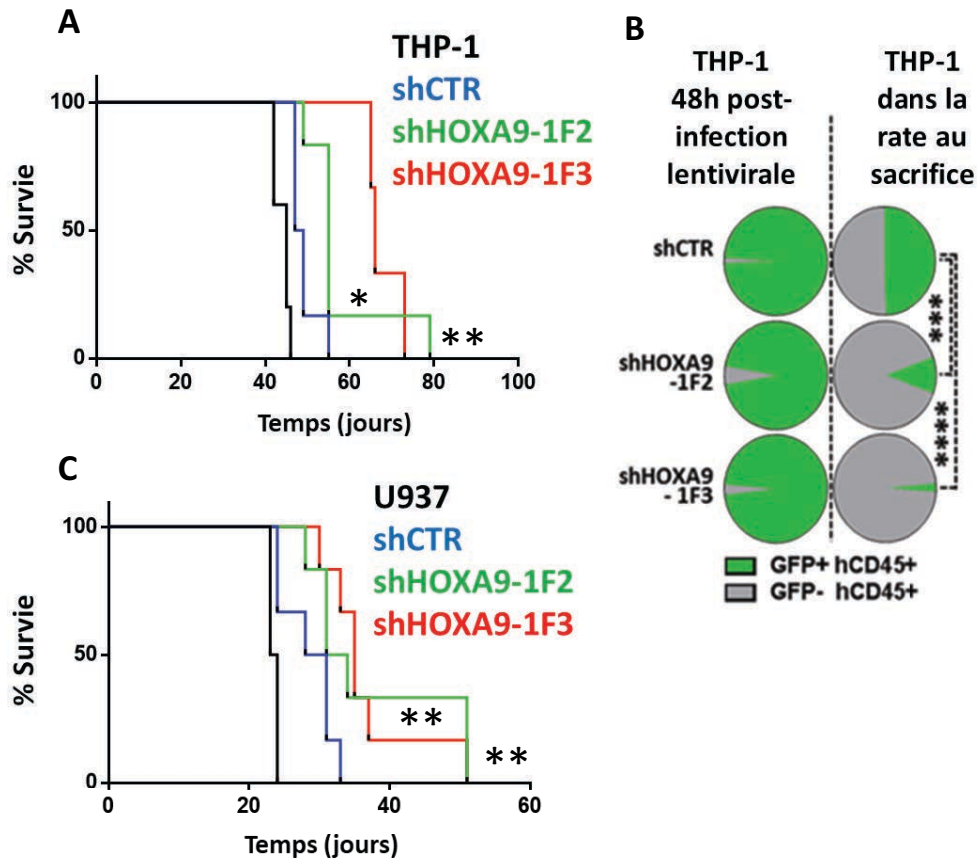


Figure 53 : Survie des souris injectées de cellules LAM invalidées ou non pour l'expression d'HOXA9. **A.** Les souris ont été injectées en intra-péritonéal avec de 2 millions de cellules THP-1 (**A**) ou U937 (**C**) transduites ou non par un lentivirus pour l'expression de shHOXA9-1F2, shHOXA9-1F3 ou shCTR. **B.** Un million de cellules THP-1 ont été transduites pour l'expression d'un shRNA (shCTR ou shHOXA9-1F2/-1F3). Les cellules invalidées sont analysées en cytométrie en flux 48 h post-infection lentivirale. Les cellules transduites sont injectées aux souris NSG, 24 h post-injection lentivirale. Au sacrifice, à 5 semaines post-injection, les cellules issues de la rate sont marquées par un anticorps anti-CD45 humain et le pourcentage de cellules CD45⁺/GFP⁺ (cellules humaines exprimant le shRNA) est quantifié par cytométrie en flux. n =5, Log-rank (Mantel-Cox) test (Kaplan-Meier survival curves), p-value: *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

Cependant, si l'inhibition d'HOXA9 par shRNA conduit à l'arrêt de la prolifération et à la mort des cellules, alors, pourquoi les souris meurent-elles tout de même de leucémies à environ 70 (THP-1) et 80 (U937) jours post-implantation ?

Lorsque l'on injecte à des souris, un million de cellules THP-1 exprimant un shRNA (shCTR, shHOXA9-1F2/-1F3) avec en moyenne 10 % de la population cellulaire non-transduite (GFP-négatives 48 h post-infection lentivirale), on observe au sacrifice des souris, à 5 semaines post-injection intra-péritonéale, que les cellules THP-1 (CD45 humain positives) présentes dans la rate sont celles non transduites (GFP-négatives) (**Figure 53.B**). Ces cellules non transduites par le lentivirus, pour l'expression des shHOXA9-1F2 et -1F3, prolifèrent en induisant une leucémie alors que les cellules exprimant le shHOXA9 meurent (peu de présence de cellules GFP-positives dans la rate au sacrifice) (**Figure 53.B**).

IV.I.B) Invalidation par shRNA d'HOXA9 et implantation de la leucémie

Une lignée cellulaire THP-1-luciférase a été générée par infection lentivirale pour expression du gène codant la luciférase. Un clone cellulaire a été sélectionné et amplifié afin de suivre visuellement et quantitativement l'implantation des cellules au cours du temps. Les souris ont été imagées sur les plans dorsaux (**Figure 54.A**) et ventraux (**Figure 54.B**) entre 10 et 15 minutes après injection de luciférine (150 mg/kg). L'intensité de luminescence générée par l'ensemble de la souris a été quantifiée en flux de photons par seconde.

Que ce soit dorsalement (**Figure 54.A**) ou ventralement (**Figure 54.B**), les souris injectées de cellules shCTR commencent à être envahies de cellules THP-1-luciférase dès 28 jours et le sont complètement à 40 jours, tandis que les souris injectées de cellules shHOXA9-1F2 ou -1F3 ne présentent que très peu d'envahissement par les cellules THP-1-luciférase à 40 jours (**Figure 54**). Les différences d'intensité du signal entre les conditions shHOXA9 et shCTR sont significatives dès 20 jours et s'intensifient jusqu'à 40 jours post-injection des cellules dans les souris (**Figure 54.A et B**).

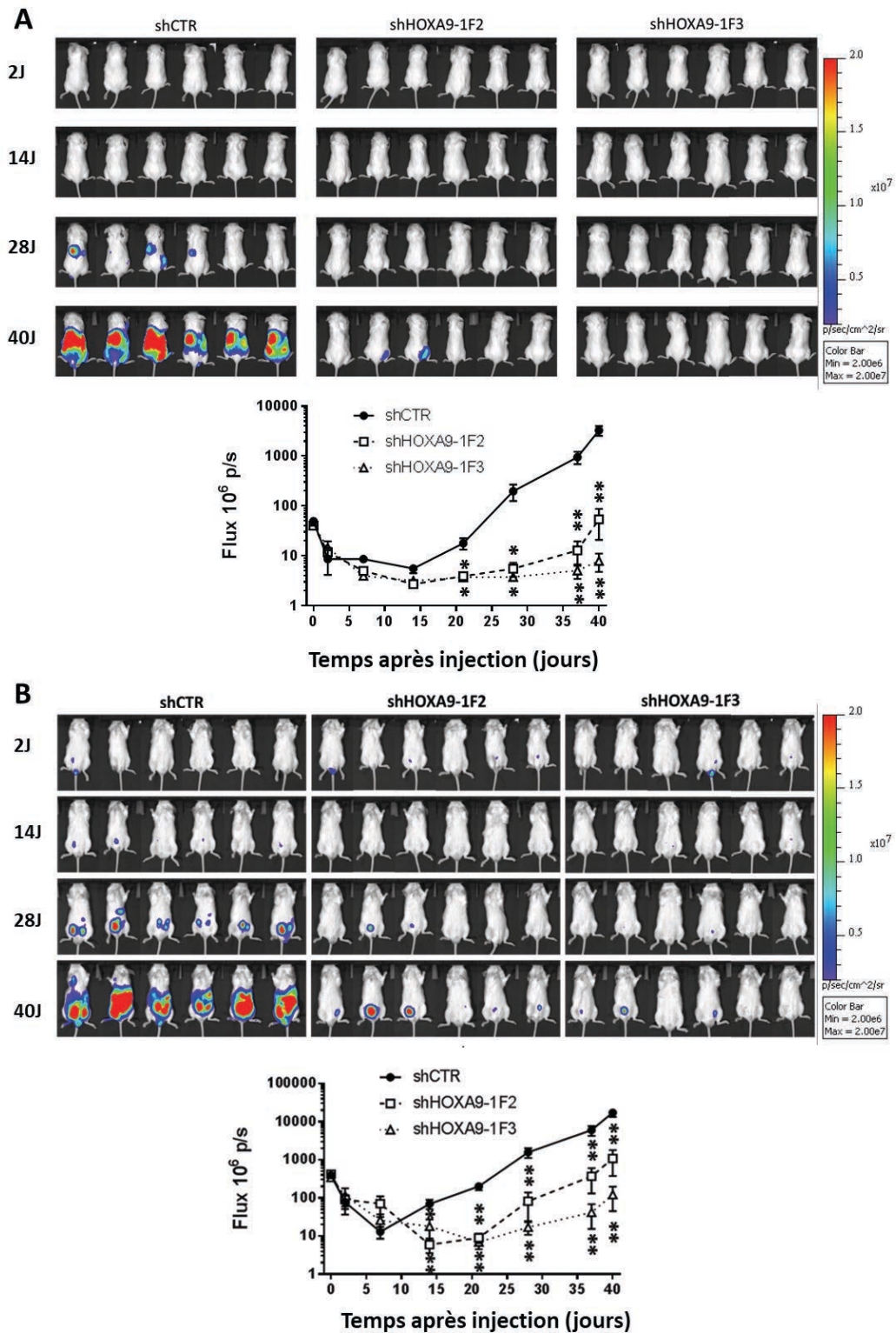


Figure 54 : Suivi de l'implantation au cours du temps des cellules THP-1-luciférase shHOXA9. Les souris sont imagées au cours du temps dorsalement (A) ou ventralement (B) après injection de luciférine (150 mg/Kg) sur l'IVIS50. L'intensité de luminescence générée par l'ensemble de la souris a été quantifiée en flux de photons par seconde et est présentée dans les graphiques. n = 6 +/- SEM, unpaired t-test, p-value: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

L'inhibition d'HOXA9 dans les cellules de lignées LAM ralentit leur implantation et augmente la survie des souris. D'autres expériences ont été menées, afin d'isoler les cellules implantées dans les organes, avec les lignées cellulaires EOL-1, THP-1 et U937 (**Figure 55**) transduites pour l'expression de shRNA (shCTR, shHOXA9-1F2 et -1F3). La lignée cellulaire U937 n'a été transduite que par le shHOXA9-1F2. Deux millions de cellules transduites ont été injectées en intra-péritonéal dans les souris, 24 h post-infection lentivirale. Au sacrifice à 3 semaines (U937 et EOL-1) ou 5 semaines (THP-1), le pourcentage de cellules CD45⁺/GFP⁺ (exprimant le shRNA) a été déterminé au sein de la rate et de la moelle osseuse par cytométrie en flux.

Le pourcentage de cellules CD45⁺/GFP⁺ exprimant le shHOXA9-1F2 ou -1F3 est drastiquement diminué dans la rate et la moelle osseuse des souris pour les 3 lignées cellulaires transduites et injectées : pour EOL-1, dans la rate, d'environ 6 à 2 % (shCTR et shHOXA9) de cellules et dans la moelle osseuse d'environ 15 à 2 % (shCTR et shHOXA9) de cellules ; pour THP-1, dans la rate, d'environ 1 à 0.1 % (shCTR et shHOXA9) de cellules et dans la moelle osseuse d'environ 1 à 0.5 % (shCTR et shHOXA9) de cellules et enfin, pour U937, d'environ 20 à 1 % (shCTR et shHOXA9) de cellules et dans la moelle osseuse d'environ 25 à 2 % (shCTR et shHOXA9) de cellules.

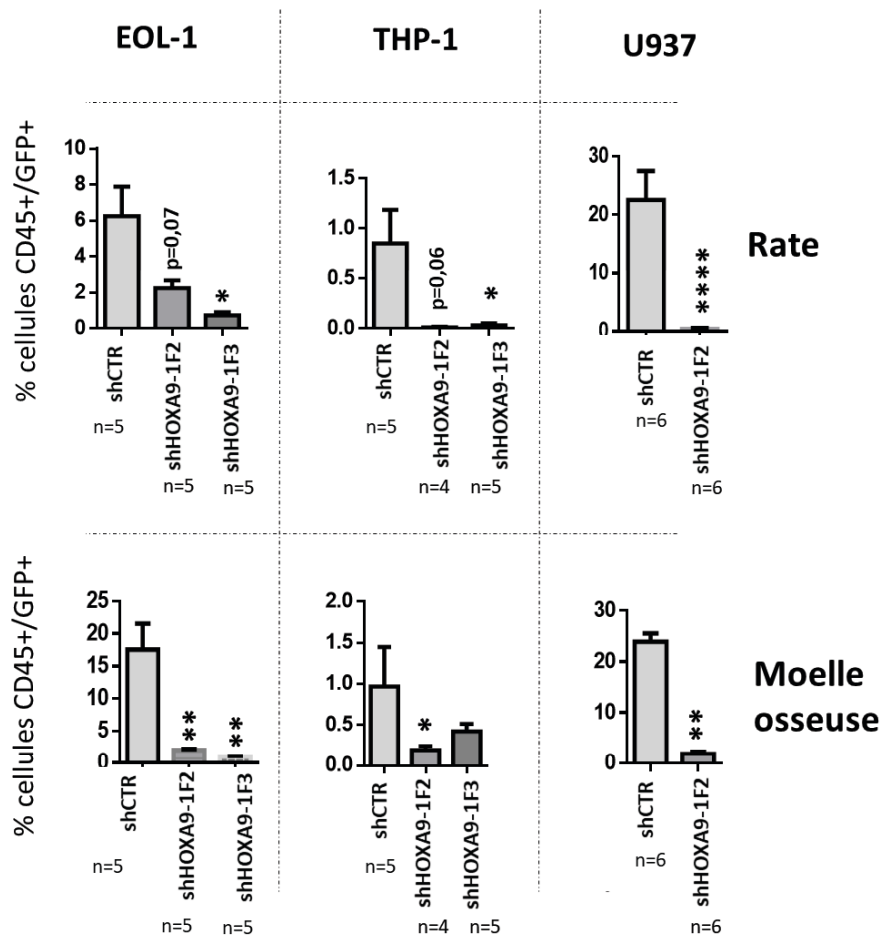


Figure 55 : Implantation dans la rate et la moelle osseuse de souris NSG des cellules de lignées LAM transduites pour l'expression du shHOXA9-1F2 ou -1F3. Deux millions de cellules EOL-1, THP-1 ou U937 ont été transduites 24 h pour l'expression du shHOXA9 et puis injectées aux souris NSG en intra-péritonéal. Les souris ont été sacrifiées 3 semaines post-injection (EOL-1 et U937) ou 5 semaines post-injection (THP-1). Les cellules de rate et de moelle osseuse ont été récupérées et marquées avec un anticorps anti-CD45 humain pour déterminer par cytométrie en flux le pourcentage de cellules CD45 et GFP (exprimant le shRNA) doublement positives. +/- SEM, unpaired t-test, p-value : * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$.

Cette première partie expérimentale *in vivo* a permis de **valider l'implication d'HOXA9 dans la leucémogénèse associée aux modèles de LAM U937, EOL-1 et THP-1.** Ces modèles sont donc ainsi tout à fait pertinents pour l'étude des effets anti-leucémiques des composés inhibiteurs de la liaison d'HOXA9 à l'ADN. En particulier, nous avons retenu les modèles THP-1 et EOL-1 et réduit notre étude au composé DB1055 pour la validation de son effet anti-leucémique.

IV.II) Effet anti-leucémique du composé DB1055 sur des modèles murins de lignées de LAM humaines

Les modèles de souris injectées de cellules EOL-1 (**Figure 56.A**) ou THP-1 (**Figure 56.B**) ont été utilisés afin de mesurer l'impact de l'inhibition fonctionnelle d'HOXA9 par le composé DB1055 *in vivo*. Après une (EOL-1) ou deux (THP-1) semaines d'implantation, les souris ont été traitées avec le composé DB1055 (20 mg/kg) ou à l'AraC (100 mg/kg). L'implantation des cellules THP-1 étant plus longue que celle des cellules EOL-1, le schéma de traitement choisi était de 2 semaines post-injection pour le modèle EOL-1 et de 3 semaines pour le modèle THP-1 à raison de 1 injection trois fois par semaine aux jours 1, 3 et 5 (**Matériel et méthodes, Figure 61**).

Dans ces deux modèles leucémiques (**Figure 56**), le traitement des souris au DB1055 induit une diminution de la splénomégalie associée au développement des LAM tandis que le traitement avec l'agent chimiothérapeutique AraC ne réduit pas cette splénomégalie. Il est connu dans la littérature que les cellules THP-1 sont résistantes au traitement à l'AraC (Wang *et al.* 2013). Le traitement des souris au DB1055 et à l'AraC n'impacte pas le poids des souris au cours du traitement, ni le poids des reins au sacrifice (**Annexe 2 et 3**).

Tout comme *in vitro*, l'inhibition fonctionnelle d'HOXA9 par le composé DB1055 conduit à la différenciation des cellules THP-1 (non évaluable dans le modèle EOL-1, les cellules étant toutes CD11b-positives à plus de 90 % de façon basale dans les souris non traitées) caractérisée par l'augmentation de l'expression du récepteur CD11b à la surface des cellules (**Figure 56.C**). Contrairement au traitement à l'AraC, le DB1055 entraîne une augmentation légère de la différenciation des cellules THP-1 (hCD45⁺/hCD11b⁺), dans la rate, le sang et le liquide d'ascite (**Figure 56.C**). Ainsi, le traitement au DB1055 des souris leucémiques EOL-1 et THP-1 réduit la splénomégalie associée à la pathologie et provoque une différenciation des cellules circulantes sanguines et localisées dans le liquide d'ascite. Le syndrome de différenciation généré par le traitement à l'ATRA dans les LAP est associé au développement de liquide d'ascite (Zhang *et al.* 1996).

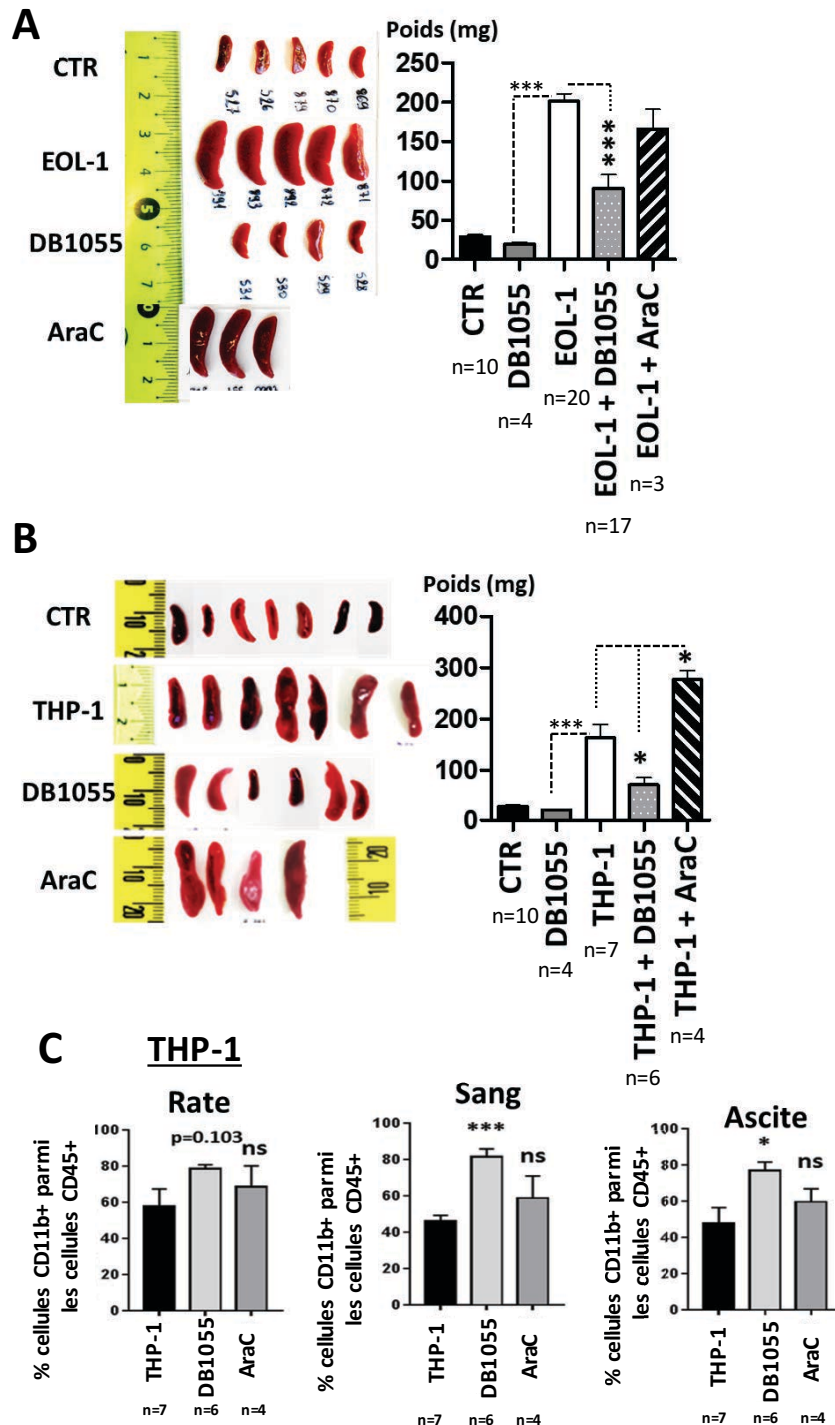


Figure 56 : Effets anti-leucémiques du composé DB1055 sur les modèles de souris EOL-1 et THP-1. 5 millions de cellules EOL-1 (A) ou THP-1 (B) ont été injectées en intra-péritonéal aux souris NSG ; les cellules sont implantées 1 (EOL-1) ou 2 semaines (THP-1) avant que les souris ne soient traitées 2 (EOL-1) ou 3 (THP-1) semaines à raison de 3 fois par semaine au DB1055 (20 mg/kg). C. Pourcentage de cellules CD11b-positives des cellules THP-1 retrouvées au sacrifice dans la rate, le sang et l'ascite. Les cellules de la rate, du sang et de l'ascite sont marquées par des anticorps anti-CD45 et anti-CD11b humains et sont quantifiées en cytométrie en flux. +/- SEM, unpaired t-test, p-value : *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

IV.III) Evaluation de l'effet anti-leucémique du composé DB1055 dans des modèles de PDX (*patient-derived-xenografts*)

In vivo, le composé DB1055 s'est avéré efficace contre l'implantation des cellules leucémiques avec une diminution caractéristique de la splénomégalie. Des prélèvements de blastes de patients ont été obtenus dans le cadre d'une demande de ressources biologiques auprès de la cellulothèque de Lille et ont ainsi pu être implantés dans les souris afin de générer des modèles de xéno greffes de blastes de patients, PDX. Les blastes sont isolés des échantillons de sang et de moelle osseuse et sont injectés aux souris en intra-tibial dans le but d'améliorer la prise de greffe et de mimer au mieux l'implantation des cellules devenues leucémiques conduisant au développement de la leucémie (Meyer & Debatin 2011).

Deux échantillons de blastes de patients présentant des mutations de *NPM1* associée à une surexpression d'*HOXA9* ont été xéno greffés (PDX1 et PDX2). Les blastes sont injectés aux souris qui sont, dès lors, suivies (pesée chaque semaine et prélèvement sanguin toutes les deux semaines) afin d'observer l'implantation des blastes. Le suivi de cette injection primaire permet également d'établir le temps nécessaire à l'implantation des cellules afin de mettre en place le protocole de traitement optimal.

Les souris sont sacrifiées lorsqu'elles présentent un fort envahissement avec plus de 70 à 80 % de blastes dans le sang et/ou des signes de détresse (paralysie, prostration, perte de poids etc). La rate des souris est alors prélevée, broyée, le sang et la moelle osseuse prélevés et les cellules sont marquées par un anticorps anti-CD45 afin de quantifier la présence des blastes humains spléniques par cytométrie en flux. Pour les deux modèles PDX1 et PDX2 établis, les rates des souris injectées de blastes de patients présentaient plus de 98 % de cellules humaines. Nous avons donc pu directement ré-injecter ces blastes sans trier les cellules. Après cette étape permettant l'amplification du nombre de blastes et l'établissement de caractéristiques liées au développement de la leucémie, les cellules humaines présentes dans la rate sont injectées en intra-tibial dans plusieurs souris dites secondaires qui seront alors traitées (**Figure 57**). Quatre semaines d'implantation des blastes sont nécessaires dans les souris dites secondaires. Les souris sont alors traitées à raison de 3 administrations par semaine au DB1055 (40 mg/kg), à l'AraC (100 mg/kg) ou au sérum physiologique (contrôles), toutes les 3 semaines. Un temps de latence de deux semaines est réalisé entre chaque semaine de traitement (**Matériel et méthodes, Figure 61**).

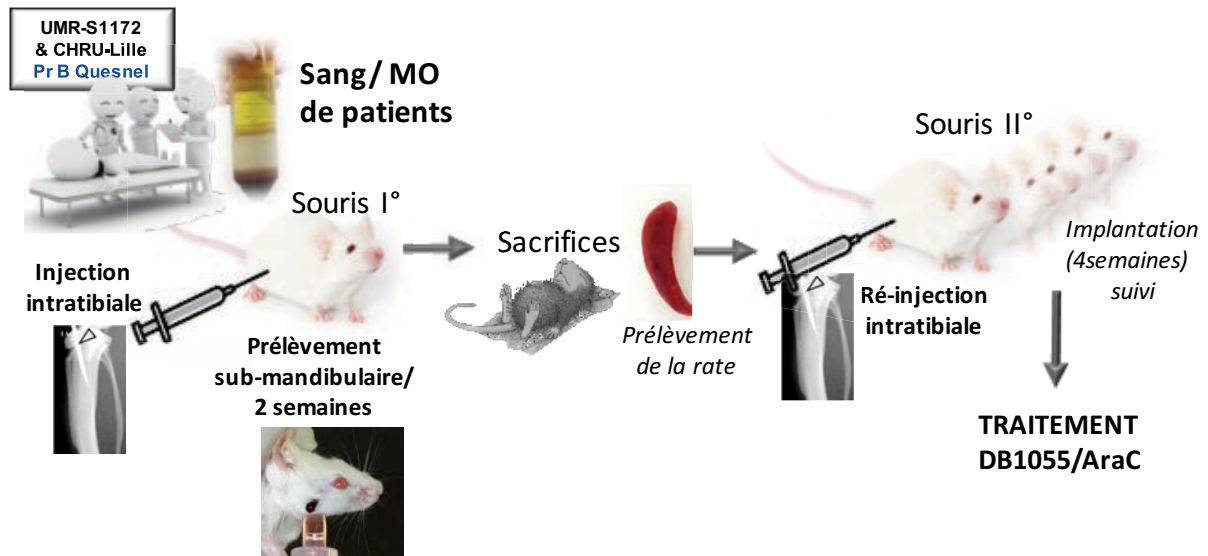


Figure 57 : Mise en place des modèles de xéno greffe de blastes de patients, PDX pour le traitement au DB1055 ou à l’AraC.

Les souris PDX1 ont été sacrifiées à 12 semaines post-injection. Comparativement à la condition contrôle, les traitements au DB1055 et à l’AraC induisent une forte réduction de la splénomégalie et de la dissémination des blastes au niveau splénique. (*Figure 58.A*) Le traitement à l’AraC diminue drastiquement le nombre de cellules dans le sang périphérique et la moelle osseuse contrairement au traitement au DB1055 qui diminue le nombre de blastes dans le sang et pas dans la moelle osseuse. Les souris PDX2 ont été sacrifiées à 16 semaines post-injection. Les traitements au DB1055 ou à l’AraC induisent également une régression de la splénomégalie ainsi qu’une diminution de la dissémination des blastes au niveau de la moelle osseuse et du sang (*Figure 58.B*). Tout comme les modèles EOL-1 et THP-1, le traitement des souris au DB1055 ou à l’AraC n’impacte pas le poids des souris, ni le poids des reins au sacrifice (*Annexes 2 et 3*).

En résumé, le traitement au DB1055 des modèles PDX1 et PDX2 induit une diminution de la dissémination des cellules et de la splénomégalie associée au développement leucémique.

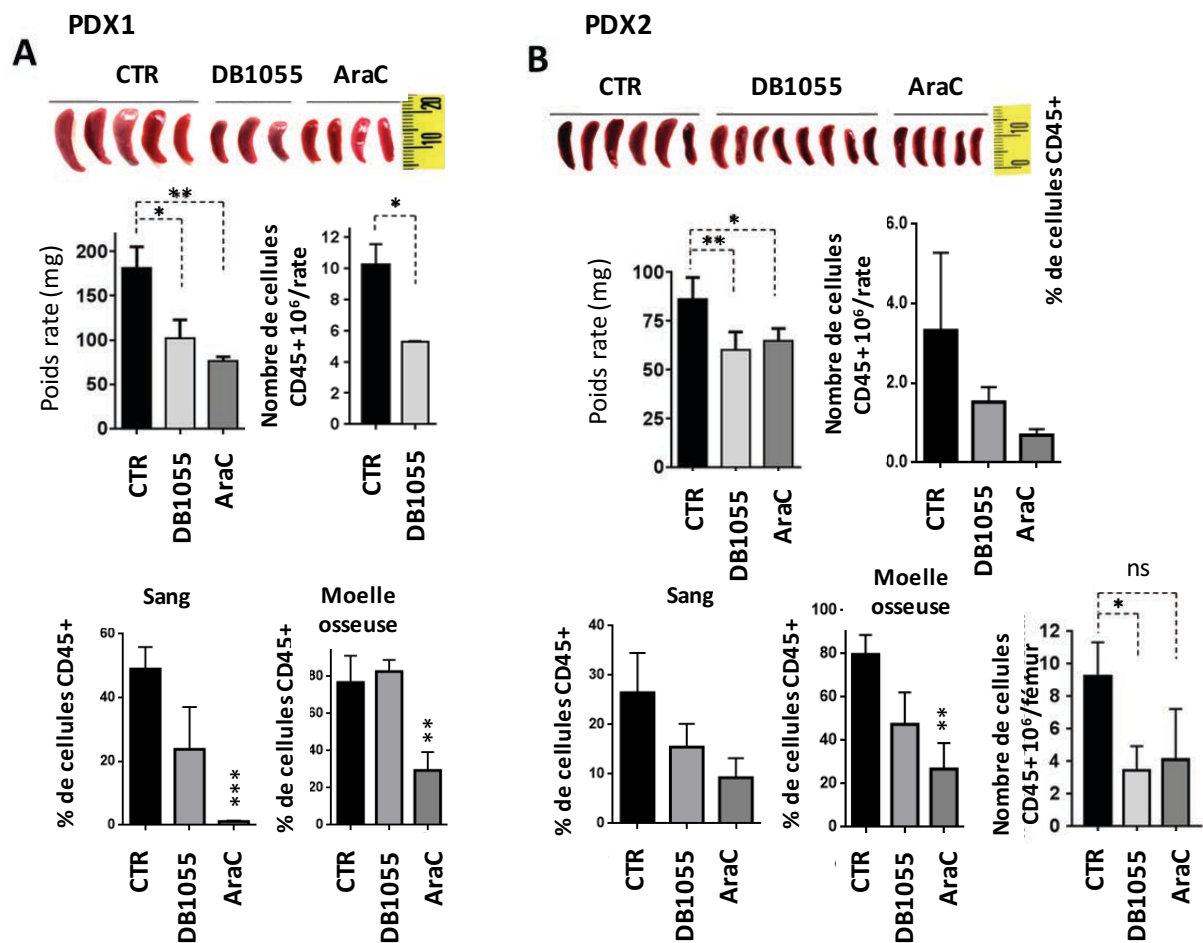


Figure 58 : Effet du traitement au DB1055 dans des modèles de xéno greffes de blastes de patients, PDX. Des souris injectées en intra-tibial avec des blastes surexprimant HOXA9 ont été traitées au DB1055 ou à l'AraC. Les souris PDX1 (A) et PDX2 (B) ont été sacrifiées respectivement à 12 et 16 semaines post-injection des blastes. Les rates ont été prélevées et pesées. Les cellules de la rate, de la moelle osseuse (issues des tibias et fémurs) et du sang ont été comptées et marquées avec un anticorps anti-CD45 humain afin de détecter le pourcentage de blastes humains infiltrés. +/- SEM, unpaired t-test, p-value : *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

CONCLUSION PARTIE IV

Evaluation du composé DB1055 sur des modèles murins implantés de cellules issues de lignées de leucémies aiguës myéloïdes et sur des modèles de PDX (*patient-derived-xenografts*)

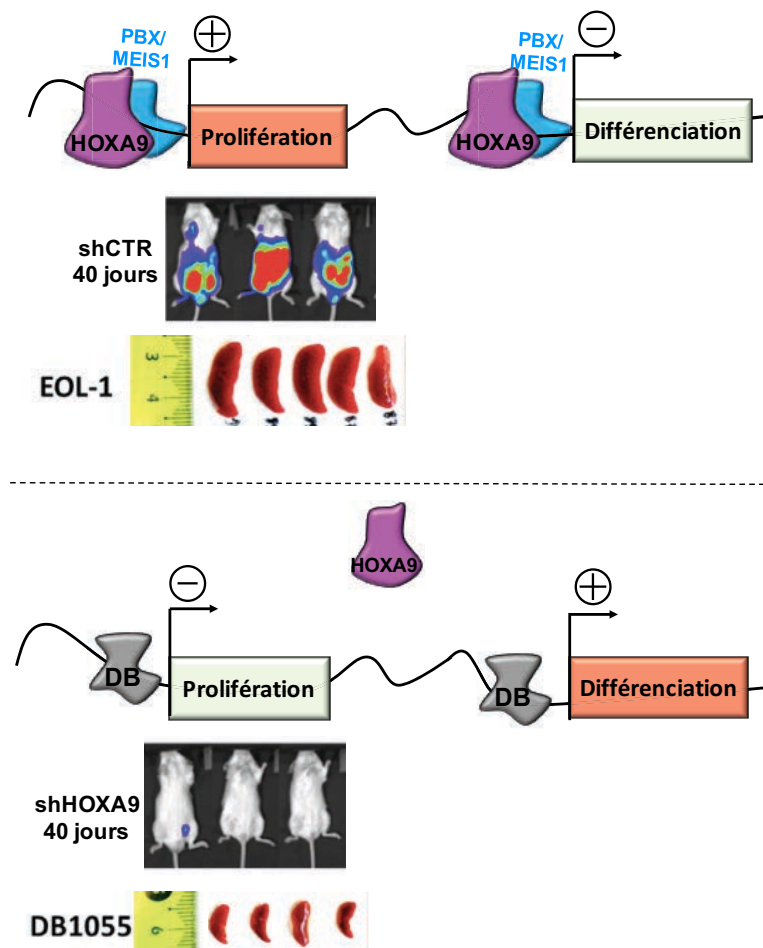


Figure 59: Conclusion partie IV. L'inhibition d'HOXA9 par shRNA diminue l'implantation des cellules leucémiques. Le traitement de souris leucémiques (lignées et PDX) au DB1055 induit une diminution de la splénomégalie associée au développement de la maladie.

Les expérimentations menées *in vitro* sur lignées cellulaires et sur blastes de patients LAM ont permis de démontrer, dans ces modèles, l'effet des composés DB1055 et DB818 sur la prolifération, la survie et la différenciation. Face à ces observations réalisées *in vitro*, nous avons évalué *in vivo* la pertinence physiologique de ces traitements par le développement de modèles de souris leucémiques.

L'inhibition d'HOXA9 par shRNA réduit les capacités leucémogènes des cellules leucémiques U937, EOL-1 et THP-1, se caractérisant par une **diminution de la dissémination des cellules dans la souris**, observée grâce aux expériences d'imagerie par bioluminescence, et en particulier dans les organes tels que la rate ou la moelle osseuse. L'inhibition de l'expression d'HOXA9 se manifeste également par un **gain de survie** des souris qui meurent plus tardivement suite à la dissémination des cellules non transduites par le lentivirus pour l'expression du shRNA. Ces données confortent celles publiées dans la littérature dans d'autres modèles cellulaires, telles que les lignées MOLM-14 (MLL-AF9) ou SEMK2 (MLL-AF4) (Faber *et al.* 2009b).

Le traitement au DB1055 des modèles de souris **EOL-1 et THP-1** s'avère efficace en induisant **une réduction de la splénomégalie**. De plus, la diminution de la dissémination des cellules est associée, pour le modèle THP-1, à une augmentation du pourcentage de cellules CD11b-positives présentes dans la rate, la moelle osseuse et le sang.

Après avoir mis en place les modèles PDX et en avoir déterminé la cinétique d'implantation des blastes sélectionnés pour leur surexpression d'HOXA9 et leur sensibilité *in vitro* aux composés DB1055 et DB818, un protocole de traitement avec le DB1055 a été établi pour chacun d'entre eux (PDX1 et PDX2). Ce traitement au DB1055 conduit à une **réduction de la splénomégalie dans les modèles PDX1 et PDX2** associée à une **diminution de la dissémination des cellules** dans la rate et la moelle osseuse des souris injectées en intra-tibial.

CHAPITRE 3 :

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Face aux trop faibles résultats des thérapies actuelles des LAM, il est crucial de trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques. La thérapie ciblée en est-une, encore faut-il identifier la bonne cible. Une des stratégies thérapeutiques d'avenir dans les LAM est l'induction de la différenciation à l'instar du traitement des LAP ciblant PML-RARA.

Ainsi, l'identification d'une cible protéique associée au blocage de la différenciation des LAM et le développement de thérapie ciblée pour l'inhiber est une stratégie d'avenir prometteuse. C'est l'approche mise en place en clinique tout récemment par le ciblage d'IDH1/2 (Stein *et al.* 2017). C'est pourquoi la FDA a approuvé la commercialisation de l'IDHIFA® en août 2017 pour le traitement des patients adultes atteints de récurrence de LAM associées à une mutation IDH2 (Mullard 2017). D'autres stratégies sont développées par des inhibiteurs de DOT1L, protéine associée au complexe MLL (Dafflon *et al.* 2017b). C'est également l'approche que nous avons initiée au laboratoire en ciblant directement HOXA9. Ce facteur de transcription est impliqué dans le blocage de la différenciation (Dorsam *et al.* 2004; Vijapurkar *et al.* 2004; Faber *et al.* 2009; Collins & Hess 2016) de 70% des LAM dont les sous-types à mutations IDH1/2 et translocations MLL mais aussi d'autres sous-types cytogénétiques ou moléculaires tels que les LAM mutées sur NPM1 ou EZH2, ou encore à protéines de fusion MYST-CREBPP ou NUP98-NSD1 (**Chapitre 1-II. II. A**).

Mon projet de thèse avait pour but de (1) caractériser les effets leucémogènes d'HOXA9 dans des modèles cellulaires (lignées cellulaires leucémiques et blastes de patient) et (2) d'évaluer les effets des composés DB1055 et DB818 *in cellulo* et *in vivo*. Ainsi, nous avons montré que l'inhibition d'HOXA9 par les composés DB1055 et DB818 ou par shRNA régule l'expression d'un panel de gènes impliqués dans la différenciation, l'arrêt de la prolifération et la mort des cellules, fonctions que nous avons évaluées *in cellulo*. Nous avons également montré que les composés DB1055 et DB818 diminuent l'implantation des blastes leucémiques *in vivo*.

Aussi, dans ce dernier chapitre, je discuterai les grands questionnements que suscite ce projet à visée thérapeutique à savoir :

- Face à la multiplicité des anomalies génétiques conduisant au développement de LAM, est-il pertinent de cibler HOXA9 pour le traitement des leucémies aiguës myéloïdes ?
- Le ciblage spécifique de l'ADN est-il une stratégie prometteuse pour le traitement des LAM ?

- Les composés DB1055 et DB818 sont-ils spécifiques et efficaces pour le traitement des LAM ?
- Quel futur pour les composés DB1055 et DB818 ?

Face à la multiplicité des anomalies génétiques conduisant au développement de LAM, est-il pertinent de cibler HOXA9 pour le traitement des leucémies aiguës myéloïdes ?

La découverte et la classification des nombreuses anomalies génétiques en cause dans les LAM a permis d'appréhender l'évolution de la pathologie et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients.

Actuellement, l'ère de l'immunothérapie dans le traitement des LAL donne de nouveaux espoirs quant au développement de ces stratégies pour le traitement des LAM (*Chapitre 1-I.III.C.2*) (Lichtenegger *et al.* 2017). D'autres stratégies sont actuellement en cours d'étude ciblant les acteurs épigénétiques (histone méthyle transférase, histone déacétylase) ou encore de manière plus directe les effecteurs mutés tels que FLT3 (*Chapitre 1-I.III.C.1/3*). Aujourd'hui, il est plus que nécessaire de développer de nouvelles thérapies contre les LAM et pour cela de trouver des cibles thérapeutiques pertinentes. Mais qu'est-ce qu'une cible thérapeutique de choix ?

Les technologies de pointe en génomique et protéomique permettent d'identifier les acteurs inhérents au développement de la pathologie. Leur activité et leur lien de cause à effet permettent le développement de nouvelles stratégies de ciblage à leur encontre. On estime, de nos jours, qu'environ 500 effecteurs seraient ciblés par l'ensemble des médicaments sur le marché alors que le génome humain est constitué d'environ 25 000 gènes codant de nombreux potentiels oncogènes, ainsi, on peut imaginer l'étendue du champ exploratoire à ce jour non couvert (Van Hijfte *et al.* 1999). Afin de définir une cible thérapeutique, il est nécessaire de connaître l'action précise de l'effecteur ciblé afin d'appréhender les conséquences de son inhibition pharmacologique.

La surexpression d'HOXA9 est corrélée à un faible pronostic en termes de réponse au traitement (Golub *et al.* 1999). A l'inverse, l'expression faible d'HOXA9 est corrélée à un meilleur pronostic pour le traitement des patients (Andreeff *et al.* 2008). Plusieurs études utilisant des lignées cellulaires surexprimant HOXA9 ou des modèles d'inactivation d'HOXA9 ont démontré son rôle d'inducteur de leucémies (*Chapitre 1- I.II.A*)

(Thorsteinsdottir *et al.* 2001, 2002; Dorsam *et al.* 2004; Ghannam *et al.* 2004; Vijapurkar *et al.* 2004; Faber *et al.* 2009; Chen *et al.* 2017).

Aussi, les résultats que nous avons obtenus *in cellulo* et *in vivo* confirment l'activité leucémogène d'HOXA9 dans les lignées U937, EOL-1 et THP-1. Nous avons montré une levée du blocage de la différenciation (**Figure 38, 39, 48, 49, 50, 56 et 58**), une diminution de la prolifération (**Figure 44, 45**) et une induction de la mort des cellules (**Figure 47**). Cibler HOXA9 représente un large champ thérapeutique dans les LAM pour lesquelles il est largement surexprimé. Le but du ciblage d'HOXA9 est de contraindre à la différenciation terminale l'ensemble des cellules le surexprimant, c'est-à-dire, d'éradiquer l'ensemble des cellules présentant les anomalies génétiques responsables de la leucémogénèse médiée par cette protéine.

Dans ce cas, est-il plus judicieux de cibler en amont les anomalies responsables de sa surexpression ou son activité de facteur de transcription ? Notons que la surexpression d'*HOXA9* est liée majoritairement aux altérations de *NPM1* et aux anomalies *MLL*.

Des stratégies de ciblage d'acteurs ou de cofacteurs du complexe *MLL* sont actuellement en cours de développement et d'essais cliniques, des inhibiteurs de *DOT1L* ou des inhibiteurs de *MENIN* (**Chapitre I - I. III. C. 3.2 et II. III. A**). Les anomalies de *MLL* sont retrouvées dans environ 10% des LAM et sont associées à un mauvais pronostic des patients d'où l'intérêt de ce ciblage (Chen & Armstrong 2015; Dafflon *et al.* 2017a). Cependant, outre son recrutement par le complexe *MLL* dérégulé dans les LAM, *DOT1L* est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et dans la réponse aux dommages de l'ADN (Kim *et al.* 2014). Aussi, il faut envisager le fait que toutes les activités subissant un « *highjacking* » dans les blastes LAM puissent être indispensables aux cellules non cancéreuses. C'est pourquoi, l'inhibition de ces complexes peut avoir de nombreux effets collatéraux tels que des instabilités chromosomiques et des défauts de l'hématopoïèse normale comme cela a été reporté pour les inhibiteurs de *DOT1L* (Nguyen *et al.* 2011; Kim *et al.* 2012). Pour l'utilisation de ces composés, il conviendra d'évaluer la fenêtre thérapeutique nécessaire à leur utilisation afin de prévenir les potentiels effets indésirables. Aussi, cibler le facteur *HOXA9*, qui n'est exprimé que dans un nombre restreint de cellules non pathologiques, est une stratégie intéressante car ce facteur agit en aval des anomalies touchant des acteurs clefs, et dans la pathologie, et dans la physiologie normale.

En l'état, il est difficile d'envisager des thérapies ciblant la protéine NPM1 mutée dans les LAM. En effet, si l'implication des mutations de la protéine NPM1 est clairement identifiée dans le développement de 50 % des LAM, ses mécanismes d'action sont encore largement incompris à ce jour. Il a été montré que de manière indirecte l'inhibition de DOT1L permettait l'inhibition de l'expression NPM1 (Kuhn *et al.* 2016). Aussi, le ciblage de la protéine HOXA9, dont l'activité est inhérente dans ce groupe de LAM, semble être la solution la plus efficace (Hourigan & Aplan 2016).

De ce fait, HOXA9 est donc une cible thérapeutique intéressante pour le développement de nouvelles thérapies ciblées. C'est pourquoi, l'équipe du Docteur Morgan, de l'Université de Bradford, Royaume-Uni, s'intéresse au ciblage direct d'HOXA9 pour l'inhibition de son interaction avec son cofacteur PBX. L'inhibition de la dimérisation HOXA9/PBX par le peptide HXR9, est cytotoxique à la fois pour les lignées cellulaires dérivées de LAM et pour les cellules LAM primaires provenant de patients. Le mécanisme de la mort cellulaire engendré ne dépend pas de l'apoptose mais implique plutôt une forme régulée de nécrose appelée nécroptose. La mort induite par HXR9 est renforcée par les inhibiteurs de la signalisation de la protéine PKC (Alharbi *et al.* 2017). Au laboratoire, nous nous intéressons à une autre stratégie novatrice de ciblage du facteur de transcription HOXA9 qu'est le blocage direct de sa liaison à l'ADN.

Le ciblage de l'ADN est-il une stratégie efficace pour le traitement des LAM ?

Les molécules de chimiothérapie conventionnelle utilisées pour le traitement des LAM sont des molécules anciennes, ciblant l'ADN de manière non spécifique perturbant la réplication et la transcription. Ces molécules agissent en se fixant de façon covalente à l'ADN (alkylants), en empêchant la synthèse d'ADN (anti métabolites) ou encore en s'insérant entre deux bases de l'ADN (inhibiteurs de topoisomérases) (Roboz 2012).

Ces molécules de chimiothérapie, administrées depuis des décennies, ciblant l'ADN de manière non spécifique, agissent sur les cellules cancéreuses afin de les éradiquer mais elles sont sources de grande toxicité de par leur action sur les cellules saines également. Actuellement, cibler l'ADN par agents chimiothérapeutiques de manière non spécifique est la seule solution proposée (hormis le traitement à l'ATRA des LAP) pour le traitement des LAM. Malgré les effets toxiques, le ciblage de l'ADN a été une réelle révolution thérapeutique pour le traitement des cancers. De sorte que le ciblage de l'ADN de manière spécifique dans les cellules cancéreuses représente une stratégie réellement prometteuse

(Hurley 2002). L'efficacité des petites molécules ciblant l'ADN repose sur la sélectivité de la structure de l'ADN et de la séquence ciblée (Hurley 2002). Par exemple, les structures formant des G-quadruplex (appariements de bases formant un plateau de résidus de guanine) représentent une nouvelle classe de cibles moléculaires pour les composés ciblant les télomères qui, de par leur richesse en guanines, ont la capacité de former des quadruplex (Sun *et al.* 1997). Le ciblage spécifique de l'ADN par de petites molécules est facilité par la chimie moderne qui développe une grande diversité de molécules originales et spécifiquement conçues pour se lier au niveau des sites de liaison des facteurs de transcription. Des composés de bas poids moléculaire se lient à l'hélice d'ADN et entrent en compétition avec les facteurs de transcription selon trois modes : l'intercalation, l'alkylation ou la liaison au sillon de l'ADN (Bouhleb *et al.* 2015) (*Annexe 1*).

Dérivés à la fois de la distamycine et de la pentamidine, les composés diamidines hétérocycliques synthétisés par le groupe du Pr DW Boykin ont été développés contre la trypanosomiase humaine africaine pour leur capacité à cibler des séquences d'ADN riches en paires de base AT (Thuita *et al.* 2008a; Mdachi *et al.* 2009).

De manière intéressante, certaines diamidines hétérocycliques, partageant ou non les activités anti-trypanosomes, se sont avérées être de puissants inhibiteurs de facteur de transcription pour leur liaison à l'ADN. Le premier composé, ayant montré cette capacité d'inhibiteur, est le DB293 (Peixoto *et al.* 2008). En utilisant une approche de criblage dérivée de puces et basée sur un mélange de 54 facteurs de transcription évalués simultanément pour leur liaison de l'ADN, deux facteurs de transcription (PIT-1 et BRN-3) ont été mis en évidence pour leur inhibition de liaison à l'ADN en présence du DB293. Un second composé diamidine identifié en tant qu'inhibiteur actif de la liaison du facteur de transcription ERG à l'ADN a été identifié (Nhili *et al.* 2013). ERG appartient au membre de la famille ETS et est impliqué dans le cancer de la prostate, le sarcome d'Ewing et différents sous-types de leucémie, faisant de ce facteur une cible pertinente pour le traitement du cancer (Tsuzuki *et al.* 2011; Kolar *et al.* 2013; Feng *et al.* 2014).

PU.1 est un autre membre de la famille ETS, impliqué dans les leucémies. Il a été montré que son inhibition par le DB2313, dérivé des composés DB1976 et DB1977 sélectionnés préalablement (Munde *et al.* 2014b), montre des activités anti-leucémiques *in cellulo* et une diminution de l'implantation des cellules *in vivo* (Antony-Debré *et al.* 2017). La réduction de l'activité de PU.1 dans les cellules leucémiques humaines et murines induites conduit à une

diminution de la croissance cellulaire et de la clonogénicité. Cependant, son rôle dans l'induction des leucémies n'est pas clairement défini (Takahashi 2011).

Il a été montré récemment que la désactivation du cluster RUNX à l'aide de polyamides pyrrole-imidazole conjugués à un agent alkylant, conçus pour se lier spécifiquement aux séquences de liaison RUNX, était très efficace contre les cellules de LAM (MV411, LAM-M5) *in vivo* (Morita *et al.* 2017).

Aussi, cibler l'ADN de manière spécifique contre la liaison de facteurs de transcription clairement oncogène tel qu'HOXA9 représente un réel espoir pour le traitement des LAM.

Les composés DB1055 et DB818 sont-ils spécifiques et efficaces pour le traitement des LAM ?

Les composés DB818 et DB1055 ont été sélectionnés au laboratoire pour l'inhibition de l'interaction d'HOXA9 à sa séquence consensus 5'atgATTTA, seul ou sous forme d'hétérodimère avec PBX1. Les composés DB sont capables de déstabiliser l'ensemble du complexe HOXA9/PBX1 bien que la fixation de l'hétérodimère soit plus affine pour l'ADN qu'HOXA9 seul. D'autres expériences menées *in vitro* ont permis de montrer, sur des séquences de promoteurs de gènes décrits dans la littérature tels que CYBB, que les composés DB1055 et DB818 inhibent la fixation d'HOXA9 sur ces séquences au même titre que la séquence consensus utilisée préalablement. Cette séquence a, par ailleurs été retrouvée dans ces promoteurs (*Chapitre 1. III. II. C*).

Des constructions oligonucléotidiques, dont les séquences intègrent le site consensus, ont été utilisées afin de réaliser des tests d'activité luciférase dans la lignée K562. Ces expériences ont permis de mettre en évidence une régulation fine et spécifique de l'interaction d'HOXA9 à sa séquence consensus. Les composés DB1055 et DB818 inhibent la fixation d'HOXA9 seul ou en hétérodimère avec PBX1 ou MEIS1 mais également de la protéine de fusion NUP98-HOXA9. De même qu'*in vitro*, PBX1 et MEIS1 ne modulent pas l'activité transcriptionnelle en absence d'HOXA9 alors que les hétérodimères HOXA9/cofacteur renforcent cette activité.

Les composés DB1055 et DB818 ont montré des activités inhibitrices de la liaison d'HOXA9 à l'ADN *in vitro* et *in cellulo* (tests luciférase). Actuellement, il est difficile d'envisager des études à l'échelle du génome *in vivo* par ChIP-sequencing. Les modèles de ChIP-sequencing jusqu'alors réalisés pour l'étude de la liaison d'HOXA9 ont été faits dans des modèles cellulaires de surexpression de la protéine HOXA9 associée à une étiquette en raison de l'absence d'anticorps commerciaux de qualité contre la protéine HOXA9. Le ChIP-sequencing permettrait d'étudier la modulation de l'interaction d'HOXA9 à l'ADN en présence des composés DB1055 et DB818, de s'assurer de leur efficacité et de leur spécificité *in vivo* mais aussi d'en évaluer les éventuels sites « *off-target* ». Les expériences de ChIP-sequencing permettraient de répondre à d'autres interrogations, à savoir, est-ce que les cellules progénitrices non cancéreuses exprimant HOXA9 présentent les mêmes sites de liaison que les cellules leucémiques ? L'amélioration de la technologie et des réactifs permettra, nous espérons, de répondre dans le futur à ces questions.

Afin d'avancer dans l'étude de la spécificité d'inhibition d'HOXA9 à l'ADN par les composés DB1055 et DB818, des expériences de DNase-sequencing ont été réalisées au laboratoire par le Docteur Amine Bouhlel. Le DNase-sequencing permet d'identifier et de localiser des régions régulatrices grâce au clivage par la DNase I de régions ouvertes de la chromatine (Crawford *et al.* 2006). Ces expériences de DNase-sequencing, réalisées sur la lignée THP-1 traitée ou non au composé DB1055, au DB818 ou après invalidation d'HOXA9, permettront de déterminer grâce à la structure de la chromatine les zones communément dérégulées par l'inhibition d'HOXA9. Il sera alors intéressant de regarder les gènes localisés à proximité de ces zones actives et de comparer les résultats obtenus à ceux du transcriptome réalisé au cours de ce travail de thèse. De manière plus globale, l'état de compaction de la chromatine après traitement avec les composés DB1055 ou DB818 ou après invalidation par shRNA, pourra être analysée par des mesures globales de l'activité de la machinerie épigénétique ou par des expériences de ChIP contre les marques activatrices ou répressives de l'ADN ou des histones.

Peu de gènes cibles d'HOXA9 sont jusqu'alors décrits dans la littérature, aussi, l'analyse transcriptomique réalisée dans ce travail de thèse a permis de révéler la présence de potentielles cibles directes ou indirectes d'HOXA9. Parmi, ces gènes, nous avons montré que, tout comme l'ATRA dans les LAP, l'inhibition d'HOXA9 permettait l'expression et la présentation des récepteurs de surface CD11b (Drayson *et al.* 2001; Tang *et al.* 2009b) et CD14 (Kim *et al.* 2005). L'ATRA induit la sénescence précoce des cellules LAP par la

régulation de *p21* et *p16* (Lim *et al.* 2011). Nous avons montré que l'inhibition d'HOXA9 augmente l'expression de *p21* mais également d'autres cibles dérégulées également par le traitement différenciateur à l'ATRA dans les LAP tels que *IRF8* (Liu *et al.* 2017), *MTSS1* (Schemionek *et al.* 2015b) ou encore *ASB2* (Kohroki *et al.* 2001) (**Figure 40**).

Il sera intéressant, pour la suite, d'étudier les séquences des promoteurs de ces gènes cibles. Des expériences d'empreinte à la DNase I permettront de rechercher la séquence spécifique de fixation d'HOXA9 au niveau de ces séquences promotrices. Des tests d'activité luciférase pourront être réalisés afin d'évaluer l'activité de ces promoteurs en présence d'HOXA9 et des inhibiteurs. Enfin, des expériences de CHIP-Q-PCR pourront être réalisées dans des modèles cellulaires tels que la lignée THP-1-TY-HOXA9 à l'aide d'un anticorps anti-TY.

Afin de déterminer et d'évaluer les effets cellulaires de l'inhibition d'HOXA9 par les composés DB1055 et DB818, ceux-ci ont été comparés aux effets d'ARN interférents dirigés spécifiquement contre l'ARNm d'*HOXA9*. Cette stratégie nous a permis de montrer que l'inhibition d'HOXA9 par shRNA ou par le traitement avec les inhibiteurs module l'expression d'un large panel commun de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. Le traitement avec les composés DB818 et DB1055 induit des changements transcriptionnels et fonctionnels qui sont aussi retrouvés par l'inactivation d'HOXA9 par shRNA. Les composés DB1055 et DB818 sont efficaces et semblent spécifiques puisque de nombreux gènes sont communément régulés avec le shHOXA9 et entraînent les mêmes conséquences cellulaires. Aussi, nous avons montré que le traitement au DB1055 réduit drastiquement l'envahissement des organes des souris par les cellules LAM et conduit à leur différenciation en monocyte/macrophage.

Pour aller plus loin dans l'évaluation des effets médiés par l'inhibition d'HOXA9, il serait intéressant d'en comprendre la mise en place. A savoir, est-ce que les mécanismes de diminution de la prolifération et d'induction de la mort cellulaire subviennent en même temps que la levée du blocage de la différenciation, ou est-ce les cellules différenciées qui vont alors mourir ? La question est de comprendre si la répression de l'activité d'HOXA9 conduit à une différenciation totale et terminale conduisant à la mort cellulaire des cellules ? Pour cela, il serait intéressant de trier par cytométrie en flux les cellules différenciées sur la base de critères de différenciation, par exemple en déterminant si les cellules CD11b⁻/CD14⁻ deviennent-elles CD11b⁺/CD14⁻ puis CD11b⁺/CD14⁺. Pour cela, il faudrait trier les cellules de

chacune des populations et suivre au cours du temps leur devenir. Il serait également important de suivre sur chacune des populations isolées, plus ou moins différenciées, l'induction de la mort cellulaire. En particulier, il serait intéressant de regarder le type de mort cellulaire engendré suite à l'inhibition d'HOXA9 par des marqueurs de l'apoptose (marquage Annexine V/IP, clivage des caspases etc.). En effet, il a été montré les cellules LAP traitées à l'ATRA meurent d'apoptose par l'intermédiaire de la cytokine TRAIL capable d'induire la mort cellulaire programmée (Altucci *et al.* 2001).

Le traitement des LAP par l'ATRA engendre un syndrome de différenciation avec le traitement à l'ATRA chez un quart des patients alors que l'arsenic induit l'apoptose ou mort programmée des cellules (Montesinos & Sanz 2011). Le syndrome de différenciation est caractérisé par l'augmentation de la leucocytose. La prise en charge du syndrome de différenciation repose sur l'administration de dexaméthasone (hormone glucocorticoïde de synthèse) associée à l'arrêt de l'ATRA.

Il est connu que les cellules monocytaires se différencient en macrophages dotés d'une variété de récepteurs activés par des stimuli leur permettant d'acquérir des phénotypes fonctionnels spécialisés. Dans les années 2000, une nouvelle classification des macrophages a été établie distinguant les macrophages selon leur métabolisme (Mills *et al.* 2000). Ainsi, les macrophages peuvent être activés de manière classique en macrophages dits M1 à caractère pro-inflammatoire ou de manière alternative en macrophages dits M2 à caractère anti-inflammatoire (Martinez & Gordon 2014; Hume 2015). Les macrophages M1 sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires, produisent des espèces réactives de l'oxygène tandis que les macrophages M2 sont caractérisés par leur forte capacité phagocytaire et leur implication dans le remodelage tissulaire (Martinez & Gordon 2014). La polarisation en macrophage de type M1 ou M2 dépend de stimuli spécifiques tels que le LPS et l'IFN-gamma pour les macrophages M1 ou l'IL4, l'IL13 ou encore l'IL10 pour les macrophages M2 (Mantovani *et al.* 2004). Les macrophages de type M1 sont caractérisés par une expression de marqueur de surface tels que CD68, CD80, CD86 ou encore TLR4 et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1B, le TNF α , l'IL12 et l'IL18 (Toshchakov *et al.* 2002; Krausgruber *et al.* 2011). Les macrophages de type 2 sont caractérisés par l'expression de récepteurs « scavenger », qui reconnaissent et dégradent les lipoprotéines de basse densité, tels que CD163 ou encore CD206 et sécrètent des cytokines telles que l'IL10 ou l'IL4 (Bouhlef *et al.* 2007; Porta *et al.* 2009). De plus, les macrophage M2 présentent une forte

activité de l'arginase 2, qui catalyse l'hydrolyse de l'arginine en ornithine et urée, bloquant la production de l'acide nitrique (Mills *et al.* 2000) et favorisant ainsi la prolifération cellulaire et la réparation tissulaire (Rath *et al.* 2014).

Il a été montré que le traitement à l'ATRA de cellules THP-1 induisait une différenciation de celles-ci en macrophages M2 à caractère pro-angiogénique (Takahashi *et al.* 2014). D'autres études, ont montré que le traitement à l'ATRA engendre des dérégulations conduisant à une présence plus importante de macrophages de type M1 et permettait ainsi de restaurer la balance entre macrophages de type M1 et macrophage de type M2 (Feng *et al.* 2017; Vellozo *et al.* 2017).

Les résultats, obtenus dans ce travail de thèse, montrent une différenciation des cellules THP-1 après inhibition d'HOXA9 par shRNA ou après traitement au DB1055 ou au DB818 avec une expression des récepteurs CD11b et CD14, une sécrétion de TNF α et d'IL1B et une activation de la voie TREM1 et des TLR supposant d'une différenciation des cellules en macrophages de type M1. Aussi, afin de caractériser au mieux cette différenciation, plusieurs expériences sont à envisager :

La présence de cytokines pro-inflammatoires ou de LPS se trouvant à la surface des agents pathogènes induisent une différenciation terminale en macrophage à caractère pro-inflammatoires de type M1 ou pro-tumorigène de par leur action angiogénique et pro-proliférative de type M2. Ainsi, il serait intéressant d'observer si le traitement avec les composés DB1055 et DB818 engendre une différenciation en macrophage de type M1 ou de type M2 en présence d'un cocktail de cytokines mimant les conditions physiologiques. Les cellules différenciées par les composés inhibiteurs et stimulées à l'aide de cytokines seront alors caractérisées par cytométrie en flux grâce aux marqueurs de surface CD163, CD206 (macrophages M2) ou CD80, CD86, TLR4 (macrophages M1). Le métabolisme de ces cellules différenciées et activées pourrait aussi être étudié, notamment la production d'acide nitrique et d'espèces réactives de l'oxygène.

Les surnageants de culture des cellules différenciées et activées pourront être récupérés et mis en contact soit avec d'autres cellules naïves, afin d'évaluer la capacité de ces cellules à se différencier ou mourir, ou soit sur des lymphocytes T afin d'étudier la réponse immunitaire médiée. Une analyse en spectrométrie de masse pourra également être réalisée sur les

surnageants de culture afin d'étudier plus finement le sécrétome des cellules traitées au DB1055 et au DB818.

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation, l'activation des effecteurs des cascades de signalisation TREM1 et TLR, dérégulées de manière significative suite à l'inhibition d'HOXA9, par shRNA et par traitement au DB1055 ou au DB818 (**Figure 41**), sera étudiée. Le traitement à l'ATRA de cellules LAP active la voie des TLR en particulier TLR5 (Cho *et al.* 2011) et il a été montré, dans un autre contexte que les LAP, que l'ATRA facilitait l'expression de TLR4 (Li *et al.* 2017b), gène dont l'expression est dérégulée dans les cellules THP-1 suite à l'inhibition d'HOXA9 (**Figure 40**). En particulier, l'activation de NFκB, médiateur principal activé dans ces voies de signalisation, pourrait être étudiée plus finement. Le facteur de transcription NFκB permet en effet d'activer les cellules phagocytaires grâce au complexe CD14-TLR reconnaissant certains signaux telles que le LPS. Aussi, la capacité de phagocytose des cellules différenciées par les composés DB1055 et DB818 puis stimulées par un cocktail de cytokines pourra être évaluée par des tests fonctionnels (phagocytose de billes, modulation du pH intracellulaire). L'activation de NFκB a été mise en évidence suite à d'autres stimuli tels que certains facteurs pro-apoptotiques, les espèces réactives de l'oxygène ou encore les cytokines (Hoesel & Schmid 2013). De plus, des modèles *in vivo* de suivi de l'activation de NFκB par imagerie grâce à un rapporteur luciférase (Mann 2002).

- **Quel futur thérapeutique pour les composés DB1055 et DB818 ?**

Les résultats obtenus ont mis en évidence la capacité de nouveaux inhibiteurs de la liaison d'HOXA9 à induire la différenciation de cellules LAM *in vitro* et *in vivo* sur une lignée de LAM-M5 (THP-1, MLL-AF9). L'induction de la différenciation des blastes leucémiques *in vivo* devra être évaluée plus finement par l'évaluation de nouveaux marqueurs de différenciation des cellules et la présence de cytokines caractéristiques dans le sérum sanguin. Nous avons évalué *in vivo* l'effet anti-leucémique du DB1055 qui est mieux toléré à l'injection que le DB818.

Quid de la toxicité ? L'évaluation préliminaire de la toxicité du DB1055 et le DB818 sont actuellement à l'étude au laboratoire par le Docteur Samy Jambon. Sur des cellules progénitrices CD34⁺, la toxicité semble modérée (calcul d'IC₅₀ comparé aux drogues cytotoxiques conventionnelles telles que l'imatinib). *In vivo*, le traitement intrapéritonéal au DB1055 ou le DB818 ne modifie pas la formule sanguine de souris C57Bl/6J traitées une

semaine aux jours 1, 3 et 5 puis suivies pendant 15 jours. Pour le DB289 utilisé dans le traitement de la trypanosomiase africaine entré en phase d'essais cliniques I/II (2001-2004) et III (2006 -2008), il a été montré dans une étude supplémentaire que les patients présentaient des toxicités hépatiques et rénales. Au niveau rénal, le traitement des souris avec le DB1055 ou le DB818 n'engendre pas de modification des taux de créatinine, d'urée plasmatique, ni d'atteinte observable au niveau histologique, de même au niveau du foie.

Aussi, sur la base de ces premiers éléments, les composés DB818 ou DB1055 représentent un réel espoir de traitement des LAM surexprimant HOXA9. Par ailleurs, ce traitement pourrait également être évalué pour le traitement d'autres pathologies dans lesquelles HOXA9 semble impliqué (glioblastomes, myélomes multiples, cancers de l'ovaire, du rein, de la prostate, endométriose etc.) (Chapman *et al.* 2009; Chen *et al.* 2012; Ko *et al.* 2012; Pires-Luís *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017). Il sera nécessaire d'avérer l'implication d'HOXA9 dans ces pathologies afin d'évaluer les effets des composés DB1055 et DB818 au sein de ces nouvelles niches thérapeutiques.

Enfin, actuellement au laboratoire, de nouvelles perspectives s'écrivent par l'étude de nouveaux composés DB aux structures originales qui s'avèrent plus efficaces que les composés DB1055 et DB818 *in vitro*, pour leur activité d'inhibition d'HOXA9 au niveau de sa liaison à l'ADN et leur capacité d'induction de la différenciation des cellules THP-1.

CONCLUSION GENERALE

Le traitement des LAM est un véritable challenge depuis 40 ans. Malgré le travail d'amélioration du schéma d'administration des molécules de chimiothérapie pour augmenter leur efficacité, les rechutes persistent et il reste nécessaire d'investiguer de nouvelles voies pour le développement de thérapies ciblées utilisables seules ou en combinaison avec la chimiothérapie (Mayer *et al.* 1994; Larson 2007; Stary *et al.* 2014; Stahl *et al.* 2017).

J'ai réalisé ce travail de thèse dans l'équipe du Pr Bruno Quesnel qui étudie les facteurs de persistance des cellules leucémiques et plus particulièrement dans le groupe du Dr Marie-Hélène David-Cordonnier, spécialisé dans le ciblage de l'ADN. Au sein de cet environnement aux versants « leucémique » et « thérapeutique », mes recherches ont conduit à la validation des effets anti-leucémiques de deux inhibiteurs spécifiques de la liaison d'HOXA9 à l'ADN. Cette stratégie innovante dans le ciblage spécifique de facteur de transcription donne de grands espoirs pour le traitement des LAM dont HOXA9 est largement surexprimé. A l'instar du ciblage de PML-RARA dans les LAP ou des inhibiteurs d'IDH dont la commercialisation a été récemment approuvée par la FDA, le ciblage d'HOXA9 dans les LAM lève le blocage de la différenciation des cellules leucémiques, diminue leur prolifération et induit leur mort permettant ainsi une réduction de l'implantation des blastes *in vivo* et un gain de survie des souris (**Figure 60**).

Des études complémentaires menées *in vitro* au laboratoire ont montré des effets synergiques du traitement au DB1055 ou au DB818 en combinaison avec l'AraC. On peut imaginer une réelle efficacité de la combinaison de ce nouveau traitement en association avec la chimiothérapie conventionnelle. Les molécules de chimiothérapie pourront être administrées, à moindre dose pour en réduire la toxicité, en combinaison des composés DB pour, d'une part éliminer les cellules cyclantes par la chimiothérapie conventionnelle, et d'autre part induire la différenciation des blastes exprimant *HOXA9* précurseurs du développement de la leucémie.

Enfin, les réels espoirs de traitement par le ciblage d'HOXA9 dans les LAM, mais aussi dans d'autres pathologies pour lesquelles l'activité d'HOXA9 est associée, reposent également et surtout sur l'évaluation de nouveaux composés DB inhibiteurs d'HOXA9 dont l'efficacité *in vitro* semble supérieure à celle des composés DB1055 et DB818.

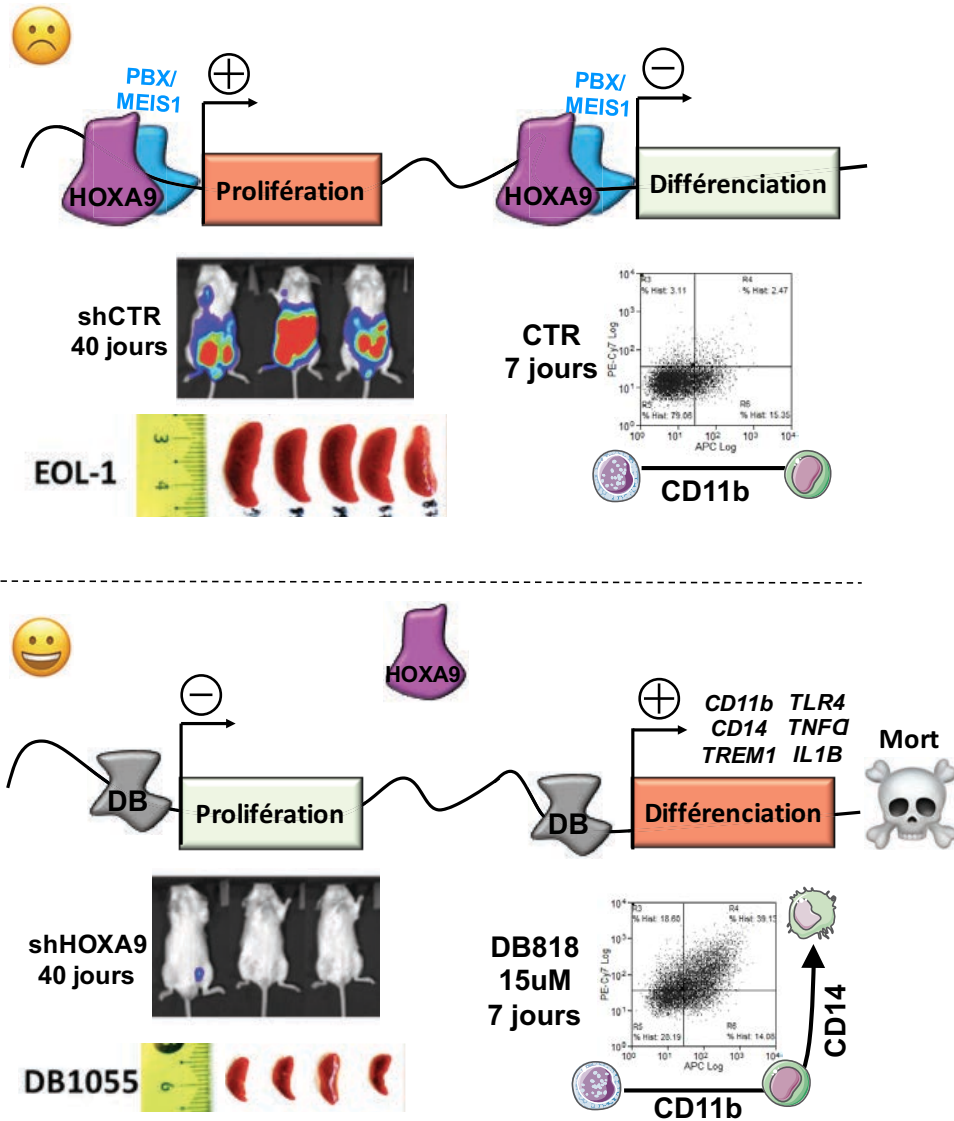


Figure 60 : Conclusion générale. Le traitement avec des inhibiteurs spécifiques d'HOXA9 pour sa liaison à l'ADN lève le blocage de la différenciation et induit la mort des cellules leucémiques réduisant drastiquement l'implantation des cellules leucémiques.

MATERIEL ET METHODES

I) Composés étudiés

Les composés DB sont obtenus dans le cadre d'une collaboration avec les professeurs David Boykin et David Wilson de l'Université d'Atlanta (Géorgie, USA). Les composés lyophilisés sont resuspendus selon leurs propriétés physico-chimiques dans le DMSO ou l'eau stérile à la concentration finale de 10 mM et sont aliquotés et stockés à -20°C.

II) Biologie moléculaire

II.I) Vecteurs plasmidiques

II.I.A) Clonage

Les plasmides sont digérés par des enzymes de restriction appropriées (1unité/μg, Biolabs) pendant 1 heure à 37°C dans 20 μl final de tampon de digestion spécifique. Les produits de digestion sont séparés et récupérés sur gel d'électrophorèse (gel d'agarose 1% préparé dans 120 ml de TBE (Tris Borate EDTA 1X, pH 8, additionné de 5μl de bromure d'éthidium (10 mg/mL). Après ajout de solution de dépôt (DNA Loading Buffer, Thermo Fisher Scientific), les échantillons d'ADN et un marqueur de poids moléculaire (1Kb DNA ladder, NEB) sont déposés dans les puits. Les fragments d'ADN d'intérêt sont excisés du gel sous rampe à UV et purifiés à l'aide du kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up Gel (Macherey-Nagel).

Les oligonucléotides sont synthétisés à façon par la société Eurogentec (Liège, Belgique) et sont repris dans l'eau MQ, dénaturés par chauffage à 95°C suivi d'une hybridation complémentaire par retour progressif à température ambiante. La ligation avec le plasmide ouvert est réalisée à l'aide de la T4 DNA ligase (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur pendant 16 H à 16°C.

Pour la technique In-Fusion, le plasmide est ouvert par digestion enzymatique. Le fragment est amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques (kit Platinum®PCR SupermiX High Fidelity) afin d'être inséré par fusion dans le plasmide ouvert (Kit In-Fusion® HD Cloning, Clontech®).

II.I.B) Transformation bactérienne

Les bactéries *Escherichia coli* Top10 ou Stbl3 sont cultivées à 37°C sous agitation à 125 rpm dans du milieu Luria-Bertani (LB Broth, Thermo Fisher Scientific) et sont rendues

compétentes selon la méthode au CaCl_2 : elles sont centrifugées et reprises dans une solution glacée de CaCl_2 à 50mM pour une dilution finale d'environ 10^{10} bactéries/ml puis placées 30min à 0°C. La transformation bactérienne s'effectue par choc thermique de 90 secondes à 42°C afin de les perméabiliser. Les bactéries sont cultivées 45 min à 37°C dans un milieu nutritif riche (milieu SOC, Invitrogen™) pour permettre l'expression de la cassette de résistance (ampicilline) portée par le plasmide. Enfin, 160 μl de cette solution sont étalés sur milieu LB gélosé (LB + agar 1,5%) contenant de l'ampicilline (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

II.I.C) Amplification/Extraction des plasmides

Les clones isolés sont mis en culture dans du LB contenant de l'ampicilline (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et incubés une nuit à 37°C sous agitation. Les plasmides sont extraits en mini- (<10 ml) ou maxi-préparation (~250-500 ml) à l'aide des kits Plasmid DNA Purification respectifs (Macherey-Nagel) selon le protocole fourni.

II.I.D) Quantification de l'ADN

Les concentrations plasmidiques sont quantifiées au Nanodrop (ThermoScientific) grâce au ration 260/280 nm et les plasmides sont séquencés (société GATC Biotech).

I.II) Système lentiviral

I.II.A) Production du vecteur lentiviral

Afin de garantir la biosécurité de la production des vecteurs lentiviraux, l'utilisation de 3 plasmides permet de réduire les risques d'encapsider les ARN viraux, mais également de s'affranchir des risques de recombinaison entre les différentes séquences d'ADN codant le vecteur et les gènes du virus. Pour la production d'un lentivirus, des cellules HEK-293T sont transfectées avec 3 vecteurs : (1) pPAX2 (vecteur d'encapsidation), (2) pMD2G (vecteur exprimant la protéine d'enveloppe VSVG) et (3) le vecteur lentiviral spécifique pRRL-TYHOXA9 (TY-tag en 5'd'HOXA9 cDNA), pLenti CMV Puro LUC (ADDGENE) ou pRRL-shRNA (shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 dont les séquences sont basées sur celles de l'article de Faber et *al.*, 2009 et sous-clonées dans le plasmide shLuc pRRL lentiviral vector (ADDGENE)). 3 millions de cellules HEK-293T sontensemencées la veille en boîte de pétri de 10cm de diamètre dans 10 ml de milieu complet DMEM. La transfection est réalisée par co-précipitation au CaCl_2 du mélange plasmidique (dépôt de 1 ml/par boîte). Le milieu est remplacé 4 à 6 H après transfection et les cellules sont cultivées 48 h pour permettre la

production lentivirale. Le surnageant de culture est alors collecté, filtré (filtre Stericup 0,45 µm, 250 ml, Merck Millipore®) et centrifugé deux fois 90 min à 19000g, 4°C. Le culot est repris dans 100µl de PBS/BSA 1%. Le surnageant lentiviral est aliquoté et congelé à -80°C.

I.II.B) Titration du lentivirus (LV)

I.II.B.1. Titration physique par dosage ELISA de la protéine de capsid virale p24

La quantité de protéine p24 au sein des cellules est dosée par dilutions du lentivirus par test ELISA direct. Ce test permet aussi de s'assurer que les cellules sont p24-négatives après plusieurs passages et ainsi de baisser leur confinement de biosécurité. Ce dosage permet également de s'assurer que le lentivirus n'est pas répliatif après au minimum 5 lavages dans 10ml de milieu (kit HIV-1 p24 Antigen ELISA, RETROtek Gentaur®).

I.II.B.2. Titration fonctionnelle par quantification de la GFP en cytométrie en flux

50 000 cellules HEK-293T sont ensemencées en plaque 6 puits et infectées durant 48 h par des quantités croissantes de solution lentivirale puis récoltées. Environ 100 µl de milieu contenant les cellules infectées sont fixées 10 min au formaldéhyde 4% (Sigma Aldrich), centrifugées puis reprises dans 500µl de PBS afin d'évaluer le taux d'infection par le lentivirus par cytométrie en flux sur la base la co-expression de la protéine GFP (λex 488nm, λem 525, sur le CyAnADP XL9 Beckman Coulter®). L'efficacité du shRNA sur la cible est validée par H. (**I.III. B.2**)

I.III) Expression génique et protéique

I.III.A) Extraction d'ARN

L'extraction d'ARNm s'effectue à l'aide du kit RNeasy Micro Kit (<500 000 cellules) ou avec le kit Qiagen RNeasy (0,5 à 10 millions de cellules) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules sont lysées dans du tampon supplémenté de β-mercapto-éthanol (3,5 µL (100 %) dans 350 µL de tampon de lyse) avant d'être lysées par 5 passages successifs dans une seringue montée d'une aiguille 25 G. L'élution de l'ARN est réalisée dans 14µl d'eau stérile RNase-free. L'éluat est dosé au Nanodrop, aliquoté et conservé à -80°C.

I.III.B) PCR quantitative en temps réel

La RT-qPCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN.

I.III. B.1) Rétro-transcription

Cette étape s'effectue à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription en présence d'inhibiteur de RNase (Applied Biosystems). 10 µl de Mix du kit (contenant les hexanucléotides) sont ajoutés à 10 µl d'ARN (1µg) dans chaque tube placé dans le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) pour rétro-transcription par le programme :10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 5 min à 85°C puis maintien à 4°C avant stockage à -20°C.

I.III. B.2) RT-qPCR

I.III. B.2.1 SYBR Green

La RT-qPCR s'effectue l'aide de SYBR Green qui permet de quantifier les acides nucléiques en solution n'interférant que peu avec la réaction en chaîne par polymérase, il est le principal marqueur séquence aspécifique utilisé en PCR en temps réel. Les séquences des primers pour la Q-PCR en SYBR Green ont été identifiées à l'aide du logiciel primer-Blast (H.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) et synthétisées par la société Eurogentec (**Tableau 8**).

La spécificité de la réaction repose sur la spécificité des amorces établie à partir d'une gamme d'ADN de 100, 50, 25, 10 et 1 ng. Le mélange réactionnel se compose de 12,5 µl de Master Mix (SYBR®Green Master Mix Applied Biosystems) comprenant les nucléotides, l'enzyme et le tampon réactionnel, 1µl de primers forward et reverse spécifiques (200 nM final), 2 µl d'ADNc (10ng final) et d'eau qsp 25 µl par puit. Les échantillons sont préparés en plaque 96 puits MicroAmp® Fast Optical qui est filmée et centrifugée brièvement pour culoter la solution au fond des puits. Les amplifications exponentielles sont réalisées selon le programme suivant : 20 sec 95°C, 1 min 95°C, 20 sec 60°C (x40) au sein de l'appareil StepOne™ Real-Time PCR systems (Thermo Fisher Scientific).

I.III. B.2.2 TaqMan®

La RT-qPCR peut être réalisée selon la méthode TaqMan®. Le principe de la sonde TaqMan® repose sur l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase qui clive une sonde

marquée lors de son hybridation à la séquence complémentaire permettant l'émission d'une fluorescence. Le mélange réactionnel est composé de 16 µl de mix (kit TaqMan® Universal Master Mix) et de 4 µl d'ADNc à 2,5 ng/µl. Le programme de PCR est le suivant : 40 cycles : 2 min à 50°C, 20 min à 95°C puis 40 cycles de 1 min à 95°C et 20 sec à 60°C au sein de l'appareil StepOne™ Real-Time PCR systems (Thermo Fisher Scientific).

	Gène	Forward	Reverse
SYBR Green	HOXA9	CCACGCTTGACACTCACACT	CAGTTGGCTGCTGGGTTATTG
	TBP	CTGGCCATAGTGATCTTTGC	TCAATTCCTTGGGTTATCTTCACA
	CD11b	TGGGTTCAACTTGGACACTGAA	CACCACCTGGATCCCTGA
	CD14	CCTAAAGGACTGCCAGCCAA	GGATTCCCCTCCAGTGTGTCAG
	p21	GCGACTGTGATGCGCTAATG	GAAGGTAGAGCTTGGGCAGG
	TLR4	CATTGGTGTGTCGGTCCTCA	CCATGGTGAGAGCAGATCCAA
	MTSS1	ATCAGCGACATGAAGGGGAG	CCTGGTGTGCATGAGGCTG
	NKD2	GGAGAGAGGGCAGCAAACC	AGATGGTGTGCATGAGGCTG
	KCNA3	GACGACCCCACTTCAGGTTT	CTGGGTGCATATCGCCGTAA
	EMP1	AGTGAAGATGCCCTCAAGACAG	TGTAGATGGACACCCCAACA
	ASB2	ACACCGCTCTACAAAGCCTG	TCCAGGTCATTGCGAGACAC
	CTSG	GGCTGAGGCAGGGGAGAT	TGACCTGCTGGACTCTGGAT
	SLC7A7	CTCGTCCCCTCAAGCTCAG	GGTCGCTTATGTTCTGGCAC
TaqMan®	IRF8	Hs00175238-m1	
	CD38	Hs001120068-m1	

Tableau 8 : Liste des amorces de RT-qPCR (SYBR®Green et TaqMan®).

I.III.C) Extraction de protéines et dosage

Les cellules sont lysées par ajout de 100 µL de tampon RIPA par culot de 10 millions de cellules (Tris-HCl 50 mM ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM ; Triton X-100 1 % ; désoxycholate de sodium 1 % ; SDS (sodium dodécyl sulfate 0,1%) contenant 1 % d'inhibiteurs de protéases (P8340 SIGMA, Protease Inhibitor Cocktail, pH 8). Les surnageants sont ensuite récupérés après centrifugation 15 min à 4°C à 2 300 g. Le dosage a été réalisé à l'aide du kit BCA (BiCinchoninic acid Assay, BioradProteinAssay, Biorad) et selon les informations du fournisseur.

I.III.D) Expression protéique par western blotting

Les protéines ont été dénaturées en chauffant les échantillons 10 min à 95°C. Les marqueurs de taille utilisés sont le Seeblue Plus 2 et le Magic Mark (Invitrogen). Les expériences d'immunoblotting ont été réalisées à l'aide des gels NuPAGENovex 4-12 % Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm pour la séparation électrophorétique des échantillons protéiques. Le transfert des protéines sur membrane (iBlot™ Transfer Stack, nitrocellulose) s'effectue grâce

à l'appareil Western blot iBlot® 7-Minute Blotting System (Thermofisher). L'anticorps primaire d'intérêt est le TY-HOXA9. Il est dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS-Tween 0.2% / 3% lait en poudre. La protéine de ménage utilisée comme contrôle est l'HSP70, l'anticorps est dilué de la même façon au 1/7000^{ème}. L'anticorps secondaire du TY-HOXA9 et de l'HSP70 est un anticorps ECL Anti Goat IgG (dilué au 1/7000^{ème}) couplé à la HRP, pour détecter la luminescence. La révélation se fait par ajout d'ECL™ Western blot Detection Reagents et est imagé au LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Applications	Protéine	Etiquette	Référence	Fournisseur
Western-Blot	TY-tag	/	C15200054	Diagenode
	HSC70	/	sc-7298	Santa-Cruz
	II° Goat anti-mouse IgG	HRP	sc-2031	Santa-Cruz
Cytométrie en flux	Anti-Human CD11b	APC	17-0118-42	eBioscience
	Anti-Human CD14	PECY7	25-0149-42	
	Anti-Human CD45	APC	17-9459-42	
	Anti-Human CD45	eFluor 450	48-9459-42	
	Mouse IgG1 K iso control	APC	17-4714-42	
	Mouse IgG1 K iso control	PECY7	25-4714-42	
	Mouse IgG1K iso control	eFluor 450	48-4714-82	

Tableau 9 : Listes des anticorps utilisés pour le western blot et la cytométrie en flux.

I.IV) Analyse transcriptomique

I.IV.A) Puces Agilent, génération des données

Les puces à ADN ont été réalisées sur 4 réplicats indépendants d'ARN pour chaque condition : CTR (contrôle cellules non traitées) à 24 h, DB1055 (10 µM) à 24 h, DB818 (10 µM) à 24 h, TY-clone1 (surexprimant HOXA9) à 24 h, TY-clone5 (exprimant davantage HOXA9 que le clone 1) à 24 h, shCTR (contrôle shRNA) à 48 h et shHOXA9-1F3 à 48 h. Les ARNs ont été extraits à partir de 5 millions de cellules par condition, extraits et dosés au nanodrop (*Matériel et Méthodes section I.III.A*).

Pour la suite et jusqu'à la génération des données, les puces à ADN ont été réalisées sur la plateforme de génomique structurale et fonctionnelle de Lille (Dr Martin Figeac). Le rendement et la qualité des ARNs totaux sont évalués sur le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). Des puces à ADN (039494_D_F_20150612, SurePrint G3 humain GE v2 8x60K Microarray, Agilent Technologies) ont été utilisées pour analyser l'expression des gènes. Le marquage, l'hybridation et la détection de l'ARNc ont été effectués conformément aux instructions du fournisseur (Agilent Technologies). Pour chaque

puce, des ARNc marqués à la cyanine 3 ont été synthétisés avec le kit de marquage QuickAmp provenant de 50 ng d'ARN total. Un calibrateur interne est ajouté dans tous les tubes et utilisés comme contrôles positifs des étapes de marquage et d'amplification. Les ARNc marqués ont été purifiés et 600 ng ont ensuite été hybridés et lavés. Les puces à ADN ont été scannées sur un scanner Agilent G2505C et les données ont été extraites à l'aide du logiciel Agilent Feature Extraction © (FE version 10.7.3.1).

Les conditions DB1055, DB818, TY-clone ont été normalisées avec le CTR, la condition shHOXA9-1F3 a été normalisée avec la condition shCTR. Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel Genespring en utilisant un t-test modéré et une correction de Benjamini-Hochberg avec un seuil significatif à $p=0,05$.

I.IV.B) Analyse par GSEA et IPA

Les études ont été réalisées en utilisant le logiciel Ingenuity Pathway Analysis © (IPA) ou le logiciel GSEA (Gene Set Enrichment Analysis Desktop v3.0). Certains gènes ont été validés par RT-qPCR selon le protocole défini en (*Matériel et Méthodes section I.III. B.2*) et avec les amorces présentées dans le tableau 8. Le logiciel Ingenuity® Systems⁶ a été utilisé pour l'analyse des voies basée sur l'expression différentielle des gènes. Les voies significativement dérégulées dans IPA ont été identifiées en utilisant le test exact de Fisher et, ont été retenues, les fonctions dont les p-value étaient les plus élevées et associées à un Z-score $> |1,65|$ ont été retenues. Le logiciel GSEA a été utilisé pour mettre en évidence les ensembles de gènes (geneset) impliqués dans des processus biologiques spécifiques : les composantes cellulaires et les fonctions moléculaires, les signatures oncogéniques et les ensembles de gènes curatifs. Les ensembles de geneset significativement enrichis ont été sélectionnés sur la base de leur valeur de FDR $\leq 0,05$.

III) Biologie cellulaire

III.I) Culture cellulaire

Les lignées cellulaires sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 ou DMEM GlutaMAX™-1 (Gibco®, Life Technologies™) complémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco®, Life Technologies™) et 100 U/ml de pénicilline/streptomycine (Sigma-Aldrich), à l'étuve sous atmosphère saturée à 90 % d'humidité, 5 % de CO₂ et à 37°C.

Les cellules U937 (ATCC_CRL-1593.2), THP-1 (ATCC_TIB202) et EOL-1 (DSMZ_ACC-386) sont en suspension. La lignée HEK-293T (ATCC_CRL-11268) est adhérente (**Tableau 10**). Elles sont divisées 2-3 fois par semaine selon les recommandations du fournisseur afin de les maintenir en phase exponentielle de croissance. Les cellules sont testées pour l'absence de mycoplasme selon le kit Mycoplasma Detection Kit (Thermo Fisher Scientific) et sont comptées au bleu trypan sur cellule de Malassez au cours des expériences et passages.

CELLULES humaines	TYPE TISSULAIRE/ PATHOLOGIE	CARACTERISTIQUES
U937	Effusion pleurale ; Lymphome généralisé	Fusion CALM/AF10 avec surexpression d'HoxA9 ; LAM-M5
EOL-1	Sang périphérique ; LAM (éosinophile)	Fusion F1P1L1-PDGFR; <i>MLL</i> (MLL-PTD); LAM-M4
THP-1	Sang périphérique ; LAM	Translocation t(9,11); <i>MLL-MLLT3</i> (MLL-AF9); LAM-M5
HEK293T	Cellules rénales embryonnaires	Transformées par l'antigène T de SV40 ; permettent la production de lentivirus.

Tableau 10 : Liste des lignées cellulaires et de leurs caractéristiques.

III.II) Prélèvement de sang ou de moelle osseuse de patients LAM

Des prélèvements de blastes de patients ont été obtenus dans le cadre d'une demande de ressources biologiques auprès de la cellulothèque de Lille (Pr Claude Preudhomme et Dr Christophe Roumier). Le volume de sang issu de l'ampoule de prélèvement ou de la moelle prélevé est dilué au 1/2 dans du PBS. Le sang ou la moelle osseuse diluée est déposé précautionneusement au-dessus du Ficoll (1/3 de Ficoll, 2/3 de sang ou moelle osseuse diluée, Human Pancoll) puis centrifugé 30 min à 400 g sans accélération ni décélération. L'anneau de cellules mononuclées est récupéré puis lavé plusieurs fois par du PBS avant comptage sur cellule de Malassez.

III.III) Mesure des effets cytotoxiques des composés

Les tests MTS et MTT sont des méthodes rapides de numération des cellules vivantes. Le principe de ces tests est le même mais leur sensibilité est différente. Aussi la numération des blastes issus de prélèvements de patients est évaluée par test MTT pendant 96 h et celle des lignées cellulaires est évaluée par test MTS pendant 72 h. MTT et MTS permettent de

déterminer la concentration pour laquelle un composé évalué induira 50% de diminution du nombre de cellules vivantes (IC₅₀). Le cycle de tétrazolium du réactif MTS/MTT est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. La quantité de formazan formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

Les cellules sontensemencées en plaque 96 puits à la densité de 15 000 cellules par puit et sont traitées ou non en duplicat. La gamme de concentration en composés DB (0,1 à 50 µM) permet de déterminer l'IC₅₀ correspondant à la concentration pour laquelle 50 % des cellules sont mortes relativement à la population totale définie par le contrôle (cellules non traitées par les DB) à 72 h (MTS) ou 96 h (MTT).

Pour le test MTT, 20 µL de solution de MTT (5mg/ml dans le PBS) sont ajoutés dans chaque puit et les plaques sont incubées à 37°C pendant 3 h. Les cristaux formés sont dissous par ajout de 100 µL de DMSO. L'absorbance est déterminée à 570nm sur un lecteur de microplaque (Spectramax, Molecular Devices). Pour le test MTS, le kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay est utilisé, 20 µL sont ajoutés par puit et les plaques incubées à 37°C pendant 3 H. L'absorbance est déterminée à 492 nm sur un lecteur de microplaque (Spectramax, Molecular Devices).

I.IV) Infection lentivirale des cellules

Un million de cellules sontensemencées dans 2 ml de milieu dépourvu de SVF. La solution lentivirale (400 ng équivalent p24) est déposée sur les cellules 4 à 6 h post-infection avant lavage et culture en milieu + 10% SVF.

III.V) Tests clonogéniques

3000 cellules sontensemencées en plaque 6 puits dans 1 mL de methylcellulose (MethoCult H4535 ; StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) traitées en triplicat avec les composés DB (1,5 ; 2,5 et 5 µM) ou AraC (0,1 ; 0,2 ou 0,3 µM). Les colonies formées sont comptées sous un microscope inversé à 12 et 14 jours selon les lignées cellulaires.

III.VI) Cytométrie en flux

Les cellules sont traitées aux composés DB sélectionnés (5, 10 ou 15 µM), au PMA (2ng/ml) ou infectées par les lentivirus exprimant les shRNA d'intérêt. Les cellules infectées

par les lentivirus pour l'expression du shRNA co-expriment la GFP détectée par cytométrie en flux (λ_{exc} 488nm, λ_{em} 525, sur le CyAnADP XL9 laser Beckman Coulter®).

III.VI.A) Mesure de la prolifération cellulaire, CellTrace™ (CFSE, violet)

La prolifération cellulaire est évaluée par cytométrie en flux grâce à la sonde fluorescente CellTrace™ violet (shRNA) ou CFSE (DB) (CellTrace™ Cell Proliferation Kit, Molecular Probes, ThermoFisher) dissoute dans le DMSO à la concentration de 5 mM et stockée à -20°C. Les cellules (10^6) sont reprises dans 3 mL de solution PBS + 5% SVF + 5 μ M final de sonde et sont incubées à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 5 min. Les cellules sont lavées 3 fois successivement par 15 mL de PBS + 5 % SVF suivi de centrifugations (150 g, 5 min). Les cellules sontensemencées dans du milieu de culture et leur fluorescence est suivie au cours du temps par cytométrie en flux. La fluorescence décroît au fur et à mesure des divisions cellulaires. Les expériences sont répétées 3 fois.

III.VI.B) Analyse du cycle cellulaire

Les cellules sont perméabilisées et fixées à l'éthanol froid 70 %, pendant 30 min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées au PBS puis incubées dans une solution de PBS supplémenté d'iodure de propidium (50 μ g/mL, Sigma-Aldrich) et de ribonucléase A (100 μ g/mL, Sigma-Aldrich) avant d'être analysées en cytométrie en flux.

III.VI.C) Marquage membranaire de marqueurs de différenciation et analyse de la mort cellulaire.

A 48, 72, 96 h et 7 jours, 100 000 cellules sont lavées au PBS, centrifugées et reprises dans 50 μ l de solution tampon PBS + BSA 3% +1 μ l de Fc Recepteur Block humain (eBioscience) afin de saturer les récepteurs aux anticorps (FcR) avant ajout 30 min à 4°C d'anticorps (0,1 μ g/ μ l) anti CD11b couplé à l'APC et anti CD14 couplé à la PE-Cy7 (eBioscience® Dx), ou avec leurs isotypes respectifs (**Tableau 9**). Les cellules sont analysées au cytomètre en flux CYAN Beckman-Coulter. L'iodure de propidium (1 μ L d'une solution à 1 mg/mL) est ensuite ajouté dans chacun de tube afin de discriminer les cellules mortes des vivantes. Les données sont traitées avec le logiciel Summit (Beckman Coulter). Les expériences sont répétées 6 fois.

III.VI) Tests ELISA

Le kit Inflammatory Cytokines Multi-Analyte ELISArray™ (Qiagen) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur pour la détection simultanée de 12 cytokines inflammatoires : IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17A, IFN γ , GMCSF à 48 et 72h dans le surnageant des cellules, post-traitement (CTR non traitées, DB1055 10 μ M, DB818 10 μ M et PMA 2 ng/mL) ou après infection lentivirale (shCTR et shHOXA9). Les concentrations en IL1B et TNF α des surnageants de culture ont été déterminées grâce aux kits IL-1B Human ELISA™ et TNF α Human ELISA™ (invitrogen) grâce à une gamme de concentrations selon les recommandations du fournisseur.

IV) Expérimentations animales

Les animaux sont utilisés en accord avec un protocole vu et approuvé par le comité d'éthique de Lille. Les souris NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ sont générées par l'animalerie Haute technologie Lille.

IV.I) Transplantation dans les souris

Les souris sont injectées avec des cellules de lignées leucémiques en intra-péritonéal (1, 2 ou 5 millions de cellules selon le type cellulaire et le type d'expérimentation) ou de blastes de patients en intra-tibial (2 millions de blastes).

IV.II) Analyse de l'inhibition d'HOXA9

Les cellules THP-1-Luciférase ont été générées via un vecteur viral permettant l'intégration du gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur CMV. Après sélection à la puromycine, un clone a été isolé. Les cellules THP-1 ou THP-1-Luc sont transduites 24 h avant l'injection dans les souris par un lentivirus pour l'expression d'un shRNA (shHOXA9-1F2/-1F3 or shCTR) avant d'être lavées 6 à 8 fois (nombre de lavage validé pour l'absence de lentivirus par quantification de la protéine p24 et test d'infectivité du surnageant sur des cellules HEK293T naïves). Les cellules sont injectées en intra-péritonéal ($2 \cdot 10^6$ cellules pour le suivi de survie et $1 \cdot 10^6$ pour le suivi d'implantation des cellules leucémiques, n =5 à 6 par groupe).

Par quantification de l'activité luciférase, la dissémination des cellules est suivie toutes les semaines suivant l'injection des cellules. Les images sont prises en position ventrale puis dorsale avec l'IVIS50® imaging system (PerkinElmer) dans les 10 à 15 min après l'injection

de luciférine (150 mg/kg). Pour la survie globale, les souris sont observées chaque jour et une quantification par cytométrie en flux de la dissémination des cellules est réalisée par un marquage par anticorps dirigé contre la protéine de surface CD45 humaine (**Tableau 9**) sur prélèvement sanguin sub-mandibulaire au cours de l'implantation puis au sacrifice sur les cellules de rate, moelle osseuse et sang.

IV.III) Traitement au DB1055 et à l'ARAC

Les souris sont traitées selon les protocoles de traitement figurant en **Figure 61**. L'AraC et le DB1055 sont reconstitués dans du sérum physiologique et stockés à -20°C. L'administration des composés (ou du véhicule dans les souris contrôles) est réalisée par injection intra-péritonéale. Les souris sont pesées chaque semaine et les doses administrées sont calculées en fonction de ce poids pour le DB1055 à 20 mg/Kg (lignées cellulaires) ou 40 mg/kg (blastes de patients), pour l'AraC (100 mg/kg) et sont administrées aux jours 1, 3 et 5 de la semaine selon les schémas décrits par les flèches rouges en **Figure 55**.

Deux modèles de PDX (patient-derived xenografts) ont été générés par l'injection de blastes de prélèvements de patients. Les deux modèles de PDX ont été obtenus par l'injection intra-tibiale de 2×10^6 cellules humaine CD45 issues de la rate de souris primaire servant pour l'amplification des cellules dans des souris secondaires. Après 3 à 4 semaines d'implantation (1-3% de cellules humaines dans le sang observés par cytométrie en flux sur prélèvement sanguin sub-mandibulaire).

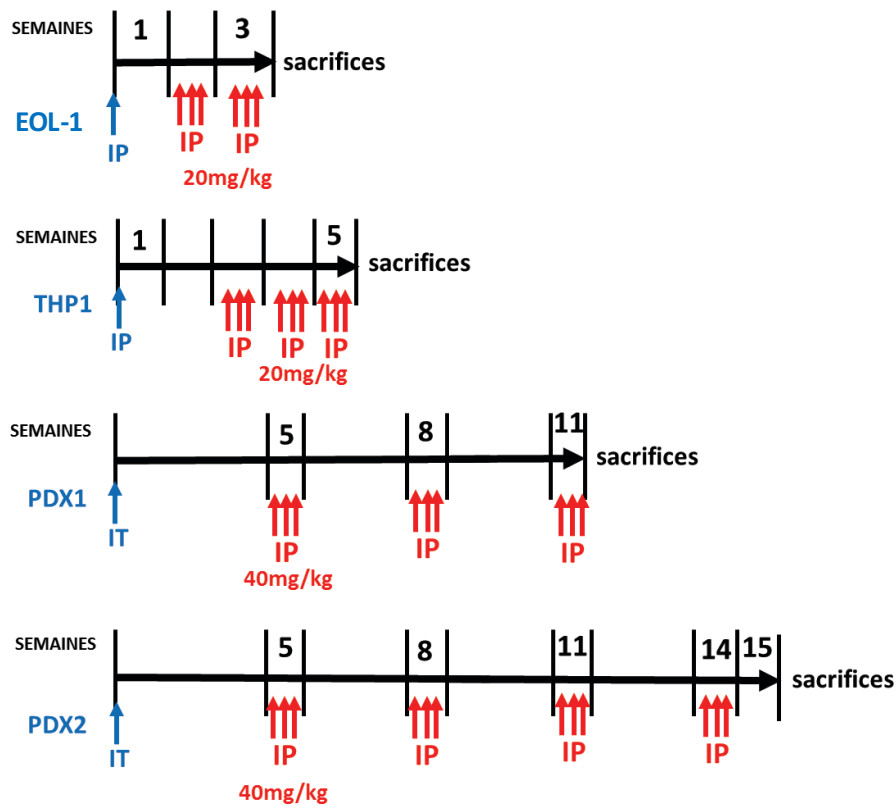


Figure 61 : Schéma d'administration de traitement des modèles de lignées LAM, de PDX-1 et PDX-2. En bleu : injection des cellules, en rouge : traitement avec le composé DB1055.

Au sacrifice, la moelle osseuse issue des tibias et des fémurs, le sang prélevé en intracardiaque, la rate, les liquides d'ascite éventuels, le foie et les reins sont récupérés. Les organes sont pesés et mesurés. Les cellules de la rate sont dissociées mécaniquement à l'aide d'un piston de seringue 5 mL contre un tamis cellulaire (Falcon Cell Strainers, 40 μ M, Fisher Scientific). La dissémination des cellules humaines dans les organes de souris est analysée par cytométrie en flux grâce au marquage du CD45 humain.

V) Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques (à part les analyses transcriptomiques) ont été réalisées grâce au logiciel Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) en utilisant un Student bilateral unpaired t-tests ou un Log-rank (Mantel-Cox) test (Kaplan-Meier survival curves).

REFERENCES

- Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R et al. 2012 ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell* 22 180–193. (doi:10.1016/j.ccr.2012.06.032)
- Abu-Daya A, Brown PM & Fox KR 1995 DNA sequence preferences of several AT-selective minor groove binding ligands. *Nucleic Acids Research* 23 3385–3392.
- Adimy M, Bernard S, Clairambault J, Crauste F, Génieys S & Pujo-Menjouet L 2008 Modélisation de la dynamique de l'hématopoïèse normale et pathologique Modelling the dynamics of normal and pathological haematopoiesis. *Hématologie* 14 339–350. (doi:10.1684/hma.2008.0282)
- Alatrash G, Daver N & Mittendorf EA 2016 Targeting Immune Checkpoints in Hematologic Malignancies. *Pharmacological Reviews* 68 1014–1025. (doi:10.1124/pr.116.012682)
- Alatrash G, Garber HR, Zhang M, Sukhumalchandra P, Qiu H, Jakher H, Perakis AA, Becker L, Yoo SY, Dwyer KC et al. 2017 Cathepsin G is broadly expressed in acute myeloid leukemia and is an effective immunotherapeutic target. *Leukemia* 31 234–237. (doi:10.1038/leu.2016.249)
- Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, Meani N, Diverio D, Bernard L, Tizzoni L et al. 2005 Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood* 106 899–902. (doi:10.1182/blood-2005-02-0560)
- Alharbi RA, Pandha HS, Simpson GR, Pettengell R, Poterlowicz K, Thompson A, Harrington K, El-Tanani M & Morgan R 2017 Inhibition of HOX/PBX dimer formation leads to necroptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. (doi:10.18632/oncotarget.20023)
- Altucci L, Rossin A, Raffelsberger H, Reitmair A, Chomienne C & Gronemeyer H 2001 Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nature Medicine* 7 680–686. (doi:10.1038/89050)
- Amatangelo MD, Quek L, Shih A, Stein EM, Roshal M, David MD, Marteyn B, Farnoud NR, de Botton S, Bernard OA et al. 2017 Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response. *Blood* 130 732–741. (doi:10.1182/blood-2017-04-779447)
- Andreeff M, Ruvolo V, Gadgil S, Zeng C, Coombes K, Chen H, Kornblau S, Barón AE & Drabkin HA 2008 HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia* 22 2041–2047. (doi:10.1038/leu.2008.198)
- Ansede JH, Anbazhagan M, Brun R, Easterbrook JD, Hall JE & Boykin DW 2004 O -Alkoxyamidine Prodrugs of Furamidine: In Vitro Transport and Microsomal Metabolism as Indicators of in Vivo Efficacy in a Mouse Model of Trypanosoma brucei rhodesiense Infection. *Journal of Medicinal Chemistry* 47 4335–4338. (doi:10.1021/jm030604o)
- Ansede JH, Voyksner RD, Ismail MA, Boykin DW, Tidwell RR & Hall JE 2005 In vitro metabolism of an orally active O-methyl amidoxime prodrug for the treatment of CNS trypanosomiasis. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 35 211–226. (doi:10.1080/00498250500087671)
- Antony-Debré I, Paul A, Leite J, Mitchell K, Kim HM, Carvajal LA, Todorova TI, Huang K, Kumar A, Farahat AA et al. 2017a Pharmacological inhibition of the transcription factor PU.1 in leukemia. *The Journal of Clinical Investigation* 127 4297–4313. (doi:10.1172/JCI92504)
- Arango Duque G & Descoteaux A 2014 Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology* 5 491. (doi:10.3389/fimmu.2014.00491)
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M & Vardiman JW 2016 The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127 2391–2405. (doi:10.1182/blood-2016-03-643544)
- Argiropoulos B, Yung E & Humphries RK 2007 Unraveling the crucial roles of Meis1 in leukemogenesis and normal hematopoiesis. *Genes & Development* 21 2845–2849. (doi:10.1101/gad.1619407)
- Ariës IM, Jerchel IS, van den Dungen RESR, van den Berk LCJ, Boer JM, Horstmann MA, Escherich G, Pieters R & den Boer ML 2014 EMP1, a novel poor prognostic factor in pediatric leukemia regulates prednisolone resistance, cell proliferation, migration and adhesion. *Leukemia* 28 1828–1837. (doi:10.1038/leu.2014.80)
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander

- ES, Golub TR & Korsmeyer SJ 2002 MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genetics* 30 41–47. (doi:10.1038/ng765)
- Arts RJW, Joosten LAB, van der Meer JWM & Netea MG 2013 TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 93 209–215. (doi:10.1189/jlb.0312145)
- Atkinson SP, Koch CM, Clelland GK, Willcox S, Fowler JC, Stewart R, Lako M, Dunham I & Armstrong L 2008 Epigenetic marking prepares the human HOXA cluster for activation during differentiation of pluripotent cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 1174–1185. (doi:10.1634/stemcells.2007-0497)
- Auwerx J 1991 The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 47 22–31. (doi:10.1007/BF02041244)
- Avraham A, Sandbank J, Yarom N, Shalom A, Karni T, Pappo I, Sella A, Fich A, Walfisch S, Gheber L et al. 2010 A similar cell-specific pattern of HOXA methylation in normal and in cancer tissues. *Epigenetics* 5 41–46.
- Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern H & Schnittger S 2006 Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 107 3847–3853. (doi:10.1182/blood-2005-08-3522)
- Bailly C, Dassonneville L, Carrasco C, Lucas D, Kumar A, Boykin DW & Wilson WD 1999 Relationships between topoisomerase II inhibition, sequence-specificity and DNA binding mode of dicationic diphenylfuran derivatives. *Anti-Cancer Drug Design* 14 47–60.
- Bailly C, Tardy C, Wang L, Armitage B, Hopkins K, Kumar A, Schuster GB, Boykin DW & Wilson WD 2001 Recognition of ATGA sequences by the unfused aromatic dication DB293 forming stacked dimers in the DNA minor groove. *Biochemistry* 40 9770–9779.
- Barber BA & Rastegar M 2010 Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 192 261–274. (doi:10.1016/j.aanat.2010.07.009)
- Barilli A, Rotoli BM, Visigalli R, Bussolati O, Gazzola GC & Dall'Asta V 2011 Arginine transport in human monocytic leukemia THP-1 cells during macrophage differentiation. *Journal of Leukocyte Biology* 90 293–303. (doi:10.1189/jlb.0910510)
- Bchir M, Ayed H, Neji H Ben, Kilani O, Kefi S, Zarrouk M, Guermani H, Hentati S, Amouri A & Meddeb B 2016 Leukemia in Patients with Klinefelter Syndrome: A Report of Two Cases. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* 32 66–68. (doi:10.1007/s12288-015-0590-6)
- Beaupre DM & Kurzrock R 1999 RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 1071–1079. (doi:10.1200/JCO.1999.17.3.1071)
- Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Whitman SP, Wu H-Z, Schwind S, Paschka P et al. 2010 Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 596–604. (doi:10.1200/JCO.2009.25.1496)
- Bei L, Lu H & Eklund EA 2005 HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91Phox during myeloid differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 280 12359–12370. (doi:10.1074/jbc.M408138200)
- Bei L, Shah C, Wang H, Huang H, Platanius LC & Eklund EA 2014 Regulation of CDX4 gene transcription by HoxA9, HoxA10, the Mll-Ell oncogene and Shp2 during leukemogenesis. *Oncogenesis* 3 e135. (doi:10.1038/oncsis.2014.49)
- Belson M, Kingsley B & Holmes A 2007 Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environmental Health Perspectives* 115 138–145.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR & Sultan C 1976 Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology* 33 451–458. (doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x)
- Beris P 2008 Les aiguës.
- Berthon C, Raffoux E, Thomas X, Vey N, Gomez-Roca C, Yee K, Taussig DC, Rezai K, Roumier C,

- Heraït P et al. 2016 Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase 1 study. *The Lancet Haematology* 3 e186–e195. (doi:10.1016/S2352-3026(15)00247-1)
- den Besten H, Kuo M-L, Williams RT & Sherr CJ 2005 Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4 1593–1598. (doi:10.4161/cc.4.11.2174)
- Bhagwat AS & Vakoc CR 2015 Targeting Transcription Factors in Cancer. *Trends in Cancer* 1 53–65. (doi:10.1016/j.trecan.2015.07.001)
- Boissan M, Feger F, Guillosson JJ & Arock M 2000 c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases. *Journal of Leukocyte Biology* 67 135–148.
- Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, Raffoux E, Leblanc T, Thomas X, Hermine O et al. 2006 Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3 and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 20 965–970. (doi:10.1038/sj.leu.2404188)
- Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Huchette P, Dombret H & Preudhomme C 2011 Differential prognosis impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 117 3696–3697. (doi:10.1182/blood-2010-11-320937)
- Bonnet D & Dick JE 1997 Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 3 730–737.
- Borkin D, He S, Miao H, Kempinska K, Pollock J, Chase J, Purohit T, Malik B, Zhao T, Wang J et al. 2015 Pharmacologic Inhibition of the Menin-MLL Interaction Blocks Progression of MLL Leukemia In Vivo. *Cancer Cell* 27 589–602. (doi:10.1016/j.ccell.2015.02.016)
- Borthakur G, Lin E, Jain N, Estey EE, Cortes JE, O'Brien S, Faderl S, Ravandi F, Pierce S & Kantarjian H 2009 Survival is poorer in patients with secondary core-binding factor acute myelogenous leukemia compared with de novo core-binding factor leukemia. *Cancer* 115 3217–3221. (doi:10.1002/cncr.24367)
- Boucherat O, Guillou F, Aubin J & Jeannotte L 2009 [Hoxa5: a master gene with multifaceted roles]. *Medicine Sciences : M/S* 25 77–82. (doi:10.1051/medsci/200925177)
- Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N et al. 2007 PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metabolism* 6 137–143. (doi:10.1016/j.cmet.2007.06.010)
- Bouhrel MA, Lambert M & David-Cordonnier M-H 2015 Targeting Transcription Factor Binding to DNA by Competing with DNA Binders as an Approach for Controlling Gene Expression. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 15 1323–1358.
- Boukarabila H, Saurin AJ, Batsche E, Mossadegh N, van Lohuizen M, Otte AP, Pradel J, Muchardt C, Sieweke M & Duprez E 2009 The PRC1 Polycomb group complex interacts with PLZF/RARA to mediate leukemic transformation. *Genes & Development* 23 1195–1206. (doi:10.1101/gad.512009)
- Bouteille B, Oukem O, Bisser S & Dumas M 2003 Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 17 171–181.
- Bowen DT 2006 Etiology of acute myeloid leukemia in the elderly. *Seminars in Hematology* 43 82–88. (doi:10.1053/j.seminhematol.2006.01.005)
- Bowen DT, Frew ME, Hills R, Gale RE, Wheatley K, Groves MJ, Langabeer SE, Kottaridis PD, Moorman A V, Burnett AK et al. 2005 RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood* 106 2113–2119. (doi:10.1182/blood-2005-03-0867)
- Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ & Richard DJ 2016 Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Molecular Biology* 17 19. (doi:10.1186/s12867-016-0073-9)
- Braekeleer E De, Douet-Guilbert N, Basinko A, Bris M-J Le, Morel F & Braekeleer M De 2014 Hox gene dysregulation in acute myeloid leukemia. *Future Oncology* 10 475–495. (doi:10.2217/fon.13.195)
- Bras AE, Beishuizen A, Langerak AW, Jongen-Lavrencic M, Te Marvelde JG, van den Heuvel-Eibrink MM, Zwaan CM, van Dongen JJM & van der Velden VHJ 2016 CD38 expression in

- paediatric leukaemia and lymphoma: implications for antibody targeted therapy. *British Journal of Haematology*. (doi:10.1111/bjh.14310)
- Braun CJ, Witzel M, Paruzynski A, Boztug K, Kalle C von, Schmidt M & Klein C 2014 Gene therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome—Long-term reconstitution and clinical benefits, but increased risk for leukemogenesis. *Rare Diseases* 2 e947749. (doi:10.4161/21675511.2014.947749)
- Bray PG, Barrett MP, Ward SA & de Koning HP 2003 Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology* 19 232–239.
- Breitinger C, Maethner E, Garcia-Cuellar M-P, Schambony A, Fischer KD, Schilling K & Slany RK 2013 HOX genes regulate Rac1 activity in hematopoietic cells through control of Vav2 expression. *Leukemia* 27 236–238. (doi:10.1038/leu.2012.166)
- Breitman TR, Selonick SE & Collins SJ 1980 Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 2936–2940.
- Brock H, Hodgson JW, Petruk S & Mazo A 2009 Regulatory noncoding RNAs at Hox loci This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB's 51st Annual Meeting – Epigenetics and Chromatin Dynamics, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology* 87 27–34. (doi:10.1139/O08-108)
- Bromleigh VC & Freedman LP 2000 p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. *Genes & Development* 14 2581–2586.
- Brown DG, Sanderson MR, Skelly J V, Jenkins TC, Brown T, Garman E, Stuart DI & Neidle S 1990 Crystal structure of a berenil-dodecanucleotide complex: the role of water in sequence-specific ligand binding. *The EMBO Journal* 9 1329–1334.
- Brumatti G, Salmanidis M, Kok CH, Bilardi RA, Sandow JJ, Silke N, Manson K, Visser J, Jabbour AM, Glaser SP et al. 2013 HoxA9 regulated Bcl-2 expression mediates survival of myeloid progenitors and the severity of HoxA9-dependent leukemia. *Oncotarget* 4 1933–1947. (doi:10.18632/oncotarget.1306)
- Buchbinder EI & Desai A 2016 CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American Journal of Clinical Oncology* 39 98–106. (doi:10.1097/COC.0000000000000239)
- Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell NH, Yin JAL, Hunter A, Goldstone AH & Wheatley K 2011 Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 369–377. (doi:10.1200/JCO.2010.31.4310)
- Calero-Nieto FJ, Joshi A, Bonadies N, Kinston S, Chan H-I, Gudgin E, Pridans C, Landry J-R, Kikuchi J, Huntly BJ et al. 2013 HOX-mediated LMO2 expression in embryonic mesoderm is recapitulated in acute leukaemias. *Oncogene* 32 5471–5480. (doi:10.1038/onc.2013.175)
- Calvo KR, Sykes DB, Pasillas MP & Kamps MP 2002 Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene* 21 4247–4256. (doi:10.1038/sj.onc.1205516)
- Camós M, Esteve J, Jares P, Colomer D, Rozman M, Villamor N, Costa D, Carrió A, Nomdedéu J, Montserrat E et al. 2006 Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression. *Cancer Research* 66 6947–6954. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4601)
- Carter NS, Berger BJ & Fairlamb AH 1995 Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* 270 28153–28157.
- Chan IT, Kutok JL, Williams IR, Cohen S, Moore S, Shigematsu H, Ley TJ, Akashi K, Le Beau MM & Gilliland DG 2006 Oncogenic K-ras cooperates with PML-RAR to induce an acute promyelocytic leukemia-like disease. *Blood* 108 1708–1715. (doi:10.1182/blood-2006-04-015040)
- Chapman MA, Brunet J-P, Keats JJ, Baker A, Adli M, Schinzel AC, Ahmann G, Christina H, Moore A, Shanmugam V et al. 2009 HOXA9 Is a Novel Therapeutic Target in Multiple Myeloma.

Blood 114.

- Chase A, Reiter A, Burci L, Cazzaniga G, Biondi A, Pickard J, Roberts IA, Goldman JM & Cross NC 1999 Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12). *Blood* 93 1025–1031.
- Chen C-H & Armstrong SA 2015 Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond. *Experimental Hematology* 43 673–684. (doi:10.1016/j.exphem.2015.05.012)
- Chen F & Capecchi MR 1999 Paralogous mouse Hox genes, Hoxa9, Hoxb9, and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 541–546.
- Chen H, Rassidakis GZ & Medeiros LJ 2006 Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 130 1687–1692. (doi:10.1043/1543-2165(2006)130[1687:NGMIAM]2.0.CO;2)
- Chen JL, Li J, Kiriluk KJ, Rosen AM, Paner GP, Antic T, Lussier YA & Vander Griend DJ 2012 Deregulation of a Hox Protein Regulatory Network Spanning Prostate Cancer Initiation and Progression. *Clinical Cancer Research* 18 4291–4302. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0373)
- Chen S-J, Shen H & Chen Z 2013 A panoramic view of acute myeloid leukemia. *Nature Genetics* 45 586–587. (doi:10.1038/ng.2651)
- Chen S, Yu J, Lv X & Zhang L 2017 HOXA9 is critical in the proliferation, differentiation, and malignancy of leukaemia cells both in vitro and in vivo. *Cell Biochemistry and Function* 35 433–440. (doi:10.1002/cbf.3293)
- Cheng H, Liu J, Yoshida H, Rosen D & Naora H 2005a Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nature Medicine* 11 531–537. (doi:10.1038/nm1230)
- Cheng B, Yu Q, Bai Z, Ke L & He P 2005b Mechanisms of increased expression of toll-like receptor-4 in human monocyte/macrophage-derived foam cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban* 25 477–479.
- Chiba S 2017 Dysregulation of TET2 in hematologic malignancies. *International Journal of Hematology* 105 17–22. (doi:10.1007/s12185-016-2122-z)
- Chichili GR, Huang L, Li H, Burke S, He L, Tang Q, Jin L, Gorlatov S, Ciccarone V, Chen F et al. 2015 A CD3xCD123 bispecific DART for redirecting host T cells to myelogenous leukemia: Preclinical activity and safety in nonhuman primates. *Science Translational Medicine* 7 289ra82–289ra82. (doi:10.1126/scitranslmed.aaa5693)
- Chien CD, Sauter CT, Ishii K, Nguyen SM, Shen F, Tasian SK, Chen H, Dimitrov DS & Fry TJ 2016 Preclinical Development of FLT3-Redirected Chimeric Antigen Receptor T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 128.
- Cho H-H, Choi E-K, Lee S-H, Kim K-H, Park S-J, Lee CK & Lee S-H 2011 All-trans retinoic acid induces TLR-5 expression and cell differentiation and promotes flagellin-mediated cell functions in human THP-1 cells. *Immunology Letters* 136 97–107. (doi:10.1016/j.imlet.2011.01.001)
- Chou H-C, Huang H-H, Hou H-A, Chen C-H, Tang J-L, Yao M, Tsay H, Ko B-S, Wu S-J, Huang S-H et al. 2010 Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood* 116 4086–4094. (doi:10.1182/blood-2010-05-283291)
- Cillo C 1996 [Apropos of the studies of Lewis, Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1995 Nobel prize winners, on the genetic mechanisms of embryonic development of drosophila. A model for human cancer progression]. *Bulletin Du Cancer* 83 527–534.
- Coll M, Aymami J, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A & Wang AH 1989 Molecular structure of the netropsin-d(CGCGATATCGCG) complex: DNA conformation in an alternating AT segment. *Biochemistry* 28 310–320.
- Collins CT & Hess JL 2016a Role of HOXA9 in leukemia: dysregulation, cofactors and essential targets. *Oncogene* 35 1090–1098. (doi:10.1038/onc.2015.174)
- Collins CT & Hess JL 2016c Deregulation of the HOXA9/MEIS1 axis in acute leukemia. *Current Opinion in Hematology* 23 354–361. (doi:10.1097/MOH.0000000000000245)
- Colombo E, Marine J-C, Danovi D, Falini B & Pelicci PG 2002 Nucleophosmin regulates the stability

- and transcriptional activity of p53. *Nature Cell Biology* 4 529–533. (doi:10.1038/ncb814)
- Cory S, Roberts AW, Colman PM & Adams JM 2016 Targeting BCL-2-like Proteins to Kill Cancer Cells. *Trends in Cancer* 2 443–460. (doi:10.1016/j.trecan.2016.07.001)
- Crawford GE, Holt IE, Whittle J, Webb BD, Tai D, Davis S, Margulies EH, Chen H, Bernat JA, Ginsburg D et al. 2006 Genome-wide mapping of DNase hypersensitive sites using massively parallel signature sequencing (MPSS). *Genome Research* 16 123–131. (doi:10.1101/gr.4074106)
- Dafflon C, Craig VJ, Méreau H, Gräsel J, Schacher Engstler B, Hoffman G, Nigsch F, Gaulis S, Barys L, Ito M et al. 2017a Complementary activities of DOT1L and Menin inhibitors in MLL-rearranged leukemia. *Leukemia* 31 1269–1277. (doi:10.1038/leu.2016.327)
- Dai H, Wang H, Lu X & Han H 2016 Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 108. (doi:10.1093/jnci/djv439)
- Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Majer CR, Sneeringer CJ, Song J, Johnston LD, Scott MP, Smith JJ, Xiao H et al. 2011 Selective Killing of Mixed Lineage Leukemia Cells by a Potent Small-Molecule DOT1L Inhibitor. *Cancer Cell* 20 53–65. (doi:10.1016/j.ccr.2011.06.009)
- Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Basavapathruni A, Jin L, Boriack-Sjodin PA, Allain CJ, Klaus CR, Raimondi A, Scott MP et al. 2013 Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood* 122 1017–1025. (doi:10.1182/blood-2013-04-497644)
- Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB & Dockrell DH 2010 The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE* 5 e8668. (doi:10.1371/journal.pone.0008668)
- Dassé E, Volpe G, Walton DS, Wilson N, Del Pozzo H, O'Neill LP, Slany RK, Frampton J & Dumon S 2012 Distinct regulation of c-myc gene expression by HoxA9, Meis1 and Pbx proteins in normal hematopoietic progenitors and transformed myeloid cells. *Blood Cancer Journal* 2 e76. (doi:10.1038/bcj.2012.20)
- Daver N, Basu S, Garcia-Manero G, Cortes JE, Ravandi F, Jabbour EJ, Hendrickson S, Pierce S, Ning J, Konopleva M et al. 2016 Phase IB/II Study of Nivolumab in Combination with Azacytidine (AZA) in Patients (pts) with Relapsed Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* 128.
- Delhommeau F, Dupont S, Valle V Della, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic J-P, Robert F, Alberdi A et al. 2009 Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *New England Journal of Medicine* 360 2289–2301. (doi:10.1056/NEJMoa0810069)
- Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastiris E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J et al. 2011 BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target c-Myc. *Cell* 146 904–917. (doi:10.1016/j.cell.2011.08.017)
- Desplan C, Theis J & O'Farrell PH 1988 The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* 54 1081–1090.
- DiNardo CD, Patel KP, Garcia-Manero G, Luthra R, Pierce S, Borthakur G, Jabbour E, Kadia T, Pemmaraju N, Konopleva M et al. 2014 Lack of association of IDH1, IDH2 and DNMT3A mutations with outcome in older patients with acute myeloid leukemia treated with hypomethylating agents. *Leukemia & Lymphoma* 55 1925–1929. (doi:10.3109/10428194.2013.855309)
- Dintilhac A, Bihan R, Guerrier D, Deschamps S & Pellerin I 2004 A conserved non-homeodomain Hoxa9 isoform interacting with CBP is co-expressed with the 'typical' Hoxa9 protein during embryogenesis. *Gene Expression Patterns* 4 215–222. (doi:10.1016/j.modgep.2003.08.006)
- Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA et al. 2010 Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115 453–474. (doi:10.1182/blood-2009-07-235358)
- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S & Döhner H 2005 Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106 3740–3746. (doi:10.1182/blood-2005-05-2164)
- Döhner H, Weisdorf DJ & Bloomfield CD 2015 Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 373 1136–1152. (doi:10.1056/NEJMra1406184)
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA et al. 2017 Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN

- recommendations from an international expert panel. *Blood* 129 424–447. (doi:10.1182/blood-2016-08-733196)
- Dorsam ST, Ferrell CM, Dorsam GP, Derynck MK, Vijapurkar U, Khodabakhsh D, Pau B, Bernstein H, Haqq CM, Largman C et al. 2004 The transcriptome of the leukemogenic homeoprotein HOXA9 in human hematopoietic cells. *Blood* 103 1676–1684. (doi:10.1182/blood-2003-07-2202)
- Dostie J & Bickmore WA 2012 Chromosome organization in the nucleus – charting new territory across the Hi-Cs. *Current Opinion in Genetics & Development* 22 125–131. (doi:10.1016/j.gde.2011.12.006)
- Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B & Brenner MK 2014 Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological Reviews* 257 107–126. (doi:10.1111/imr.12131)
- Dou H, Milne TA, Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J, Allis CD, Chait BT, Hess JL & Roeder RG 2005 Physical Association and Coordinate Function of the H3 K4 Methyltransferase MLL1 and the H4 K16 Acetyltransferase MOF. *Cell* 121 873–885. (doi:10.1016/j.cell.2005.04.031)
- Douarin N Le & Dieterlen-lièvre F 2008 Les cellules souches , porteuses d ' immortalité. 2008.
- Douay L 2003 Du contr?le de l'h?matopo???se ?? la th?rapie cellulaire: Les perspectives transfusionnelles. *Annales de Biologie Clinique* 61 259–267.
- Drayson MT, Michell RH, Durham J & Brown G 2001 Cell Proliferation and CD11b Expression Are Controlled Independently during HL60 Cell Differentiation Initiated by 1,25 α -Dihydroxyvitamin D3 or All-trans-Retinoic Acid. *Experimental Cell Research* 266 126–134. (doi:10.1006/EXCR.2001.5200)
- Du H & Taylor HS 2016 The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 a023002. (doi:10.1101/cshperspect.a023002)
- Dubois C, Schlageter MH, de Gentile A, Balitrand N, Toubert ME, Krawice I, Fenaux P, Castaigne S, Najean H & Degos L 1994 Modulation of IL-8, IL-1 beta, and G-CSF secretion by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 8 1750–1757.
- Duboule D 1992 The vertebrate limb: A model system to study theHox/hom gene network during development and evolution. *BioEssays* 14 375–384. (doi:10.1002/bies.950140606)
- Duboule D & Dollé P 1989 The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *The EMBO Journal* 8 1497–1505.
- Dupé V, Davenne M, Brocard J, Dollé P, Mark M, Dierich A, Chambon P & Rijli FM 1997 In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development (Cambridge, England)* 124 399–410.
- Edwards KJ, Jenkins TC & Neidle S 1992 Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties. *Biochemistry* 31 7104–7109.
- Ehninger A, Kramer M, Röllig C, Thiede C, Bornhäuser M, von Bonin M, Wermke M, Feldmann A, Bachmann M, Ehninger G et al. 2014 Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal* 4 e218. (doi:10.1038/bcj.2014.39)
- Ekici AB, Strissel PL, Oppelt PG, Renner SP, Brucker S, Beckmann MW & Strick R 2013 HOXA10 and HOXA13 sequence variations in human female genital malformations including congenital absence of the uterus and vagina. *Gene* 518 267–272. (doi:10.1016/j.gene.2013.01.030)
- Erfurth FE, Popovic R, Grembecka J, Cierpicki T, Theisler C, Xia Z-B, Stuart T, Diaz MO, Bushweller JH & Zeleznik-Le NJ 2008 MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 7517–7522. (doi:10.1073/pnas.0800090105)
- Estey E 2007 Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 1908–1915. (doi:10.1200/JCO.2006.10.2731)
- Faber J, Krivtsov A V, Stubbs MC, Wright R, Davis TN, van den Heuvel-Eibrink M, Zwaan CM, Kung AL & Armstrong SA 2009a HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* 113 2375–2385. (doi:10.1182/blood-2007-09-113597)
- Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S & Nicoletti I 2009 Altered

- nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 23 1731–1743. (doi:10.1038/leu.2009.124)
- Fan R, Bonde S, Gao P, Sotomayor B, Chen C, Mouw T, Zavazava N & Tan K 2012 Dynamic HoxB4-regulatory network during embryonic stem cell differentiation to hematopoietic cells. *Blood* 119 e139-47. (doi:10.1182/blood-2011-12-396754)
- Feng FY, Brenner JC, Hussain M & Chinnaiyan AM 2014 Molecular Pathways: Targeting ETS Gene Fusions in Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 4442–4448.
- Feng Z, Yao H, Zhou C, Chen F, Wu F, Wei L, Liu H, Dong S, Redell M, Mo Q et al. 2016 Pharmacological inhibition of LSD1 for the treatment of MLL-rearranged leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* 9 24. (doi:10.1186/s13045-016-0252-7)
- Feng Q, Xu M, Yu H, Hou H, Mi X, Sun YX, Ma S, Zuo XY, Shao LL, Hou M et al. 2017 High-dose dexamethasone or all-trans-retinoic acid restores the balance of macrophages towards M2 in immune thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 15 1845–1858. (doi:10.1111/jth.13767)
- Ferraiuolo MA, Rousseau M, Miyamoto C, Shenker S, Wang XQD, Nadler M, Blanchette M & Dostie J 2010 The three-dimensional architecture of Hox cluster silencing. *Nucleic Acids Research* 38 7472–7484. (doi:10.1093/nar/gkq644)
- Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberg DS, Sallan SE, Silverman LB, Korsmeyer SJ & Look AT 2003 Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 102 262–268. (doi:10.1182/blood-2002-10-3221)
- Friedmann H, Daniel CA, Strickland P & Daniel CW 1994 Hox genes in normal and neoplastic mouse mammary gland. *Cancer Research* 54 5981–5985.
- Frohling S, Scholl C, Bansal D & Huntly BJP 2007 HOX Gene Regulation in Acute Myeloid Leukemia: CDX Marks the Spot? *Cell Cycle* 6 2241–2245. (doi:10.4161/cc.6.18.4656)
- Fu Z, Chen C, Zhou Q, Wang H, Zhao H, Zhao X, Li H, Zheng S, Ye H, Wang L et al. 2017 LncRNA HOTTIP modulates cancer stem cell properties in human pancreatic cancer by regulating HOXA9. *Cancer Letters* 410 68–81. (doi:10.1016/j.canlet.2017.09.019)
- Fujimoto S, Araki K, Chisaka O, Araki M, Takagi K & Yamamura K 1998 Analysis of the murine Hoxa-9 cDNA: an alternatively spliced transcript encodes a truncated protein lacking the homeodomain. *Gene* 209 77–85.
- Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, Wallrabenstein T, Kolbinger B, Köhne CH, Horst HA et al. 2016 RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia* 30 2282–2282. (doi:10.1038/leu.2016.207)
- Gamis AS, Alonzo TA, Meshinchi S, Sung L, Gerbing RB, Raimondi SC, Hirsch BA, Kahwash SB, Heerema-McKenney A, Winter L et al. 2014 Gemtuzumab Ozogamicin in Children and Adolescents With De Novo Acute Myeloid Leukemia Improves Event-Free Survival by Reducing Relapse Risk: Results From the Randomized Phase III Children’s Oncology Group Trial AAML0531. *Journal of Clinical Oncology* 32 3021–3032. (doi:10.1200/JCO.2014.55.3628)
- Gao L, Sun J, Liu F, Zhang H & Ma H 2016 Higher expression levels of the HOXA9 gene, closely associated with MLL-PTD and EZH2 mutations, predict inferior outcome in acute myeloid leukemia. *OncoTargets and Therapy* 9 711. (doi:10.2147/OTT.S95279)
- Gaunt SJ 1988 Mouse homeobox gene transcripts occupy different but overlapping domains in embryonic germ layers and organs: a comparison of Hox-3.1 and Hox-1.5. *Development (Cambridge, England)* 103 135–144.
- Gaynon PS, Zomorodian TJ & Pinkel D History and general issues History of leukemia: historical perspectives.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D et al. 2009 Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 145 788–800. (doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x)
- Ghannam G, Takeda A, Camarata T, Moore MA, Viale A & Yaseen NR 2004 The Oncogene Nup98-HOXA9 Induces Gene Transcription in Myeloid Cells. *Journal of Biological Chemistry* 279

- 866–875. (doi:10.1074/jbc.M307280200)
- Giampaolo A, Sterpetti P, Bulgarini D, Samoggia P, Pelosi E, Valtieri M & Peschle C 1994 Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 84 3637–3647.
- Gilbert PM, Mouw JK, Unger MA, Lakins JN, Gbegnon MK, Clemmer VB, Benezra M, Licht JD, Boudreau NJ, Tsai KKC et al. 2010 HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype. *Journal of Clinical Investigation* 120 1535–1550. (doi:10.1172/JCI39534)
- Gill H, Leung AYH & Kwong H-L 2016 Molecular and Cellular Mechanisms of Myelodysplastic Syndrome: Implications on Targeted Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 17 440. (doi:10.3390/ijms17040440)
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA et al. 1999 Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science (New York, N.H.)* 286 531–537.
- Gonçalves CS, Xavier-Magalhães A, Pojo M, Oliveira AI, Correia S, Reis RM, Sousa N, Rocha M & Costa BM 2015 Transcriptional profiling of HOXA9-regulated genes in human glioblastoma cell models. *Genomics Data* 5 54–58. (doi:10.1016/j.gdata.2015.05.010)
- Gorski DH & Walsh K 2000 The role of homeobox genes in vascular remodeling and angiogenesis. *Circulation Research* 87 865–872. (doi:10.1161/01.RES.87.10.865)
- Goswami M, Hensel N, Smith BD, Prince GT, Qin L, Levitsky HI, Strickland SA, Jagasia M, Savani BN, Fraser JW et al. 2014 Expression of putative targets of immunotherapy in acute myeloid leukemia and healthy tissues. *Leukemia* 28 1167–1170. (doi:10.1038/leu.2014.14)
- Gough SM, Slape CI & Aplan PD 2011 NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood* 118 6247–6257. (doi:10.1182/blood-2011-07-328880)
- Greenwood MJ, Seftel MD, Richardson C, Barbaric D, Barnett MJ, Bruyere H, Forrest DL, Horsman DE, Smith C, Song K et al. 2006 Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 47 1245–1252. (doi:10.1080/10428190600572673)
- Grembecka J, He S, Shi A, Purohit T, Muntean AG, Sorenson RJ, Showalter HD, Murai MJ, Belcher AM, Hartley T et al. 2012 Menin-MLL inhibitors reverse oncogenic activity of MLL fusion proteins in leukemia. *Nature Chemical Biology* 8 277–284. (doi:10.1038/nchembio.773)
- Griffis ER, Altan N, Lippincott-Schwartz J & Powers MA 2002 Nup98 Is a Mobile Nucleoporin with Transcription-dependent Dynamics. *Molecular Biology of the Cell* 13 1282–1297. (doi:10.1091/mbc.01-11-0538)
- Grubach L, Juhl-Christensen C, Rethmeier A, Olesen LH, Aggerholm A, Hokland P & Østergaard M 2008 Gene expression profiling of Polycomb, Hox and Meis genes in patients with acute myeloid leukaemia. *European Journal of Haematology* 81 112–122. (doi:10.1111/j.1600-0609.2008.01083.x)
- Grunwald MR & Levis MJ 2013 FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *International Journal of Hematology* 97 683–694. (doi:10.1007/s12185-013-1334-8)
- Guil S & Esteller M 2012 Cis-acting noncoding RNAs: friends and foes. *Nature Structural & Molecular Biology* 19 1068–1075. (doi:10.1038/nsmb.2428)
- Gurumurthy M, Tan CH, Ng R, Zeiger L, Lau J, Lee J, Dey A, Philp R, Li Q, Lim TM et al. 2008 Nucleophosmin Interacts with HEXIM1 and Regulates RNA Polymerase II Transcription. *Journal of Molecular Biology* 378 302–317. (doi:10.1016/j.jmb.2008.02.055)
- Gwin K, Frank E, Bossou A & Medina KL 2010 Hoxa9 regulates Flt3 in lymphohematopoietic progenitors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 6572–6583. (doi:10.4049/jimmunol.0904203)
- Han H-B, Gu J, Ji D-B, Li Z-H, Zhang H, Zhao H, Wang L-M & Zhang Z-Q 2014 PBX3 promotes migration and invasion of colorectal cancer cells via activation of MAPK/ERK signaling pathway. *World Journal of Gastroenterology* 20 18260. (doi:10.3748/wjg.v20.i48.18260)
- Harrill AH, DeSmet KD, Wolf KK, Bridges AS, Eaddy JS, Kurtz CL, Hall JE, Paine MF, Tidwell RR & Watkins PB 2012 A Mouse Diversity Panel Approach Reveals the Potential for Clinical

- Kidney Injury Due to DB289 Not Predicted by Classical Rodent Models. *Toxicological Sciences* 130 416–426. (doi:10.1093/toxsci/kfs238)
- Harris WJ, Huang X, Lynch JT, Spencer GJ, Hitchin JR, Li H, Ciceri F, Blaser JG, Greystoke BF, Jordan AM et al. 2012 The Histone Demethylase KDM1A Sustains the Oncogenic Potential of MLL-AF9 Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell* 21 473–487. (doi:10.1016/j.ccr.2012.03.014)
- Hatano H, Miura I, Nakamura T, Yamazaki H, Takahashi N & Miura AB 1999 Molecular heterogeneity of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in myelodysplastic syndromes associated with t(7;11)(p15;p15). *British Journal of Haematology* 107 600–604.
- He M, Chen P, Arnovitz S, Li H, Huang H, Neilly MB, Wei M, Rowley JD, Chen J & Li Z 2012 Two isoforms of HOXA9 function differently but work synergistically in human MLL-rearranged leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 49 102–106. (doi:10.1016/j.bcmed.2012.05.003)
- Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI & Schimmer AD 2017 Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia* 31 798–807. (doi:10.1038/leu.2017.30)
- Heinrichs S, Berman JN, Ortiz TM, Kornblau SM, Neuberg DS, Estey EH & Thomas Look A 2005 CD34+ cell selection is required to assess HOXA9 expression levels in patients with myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology* 130 83–86. (doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05555.x)
- Herrera A 2015 Lam & Lal.
- Herviou L, Cavalli G, Cartron G, Klein B & Moreaux J 2016 EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Oncotarget* 7 2284–2296. (doi:10.18632/oncotarget.6198)
- Hess JL 2004 MLL, Hox genes, and leukemia: the plot thickens. *Blood* 103 2870–2871. (doi:10.1182/blood-2004-01-0323)
- Hess JL, Bittner CB, Zeisig DT, Bach C, Fuchs U, Borkhardt A, Frampton J & Slany RK 2006 c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood* 108 297–304. (doi:10.1182/blood-2005-12-5014)
- Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM & Thaller C 1992 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68 397–406.
- Van Hijfte L, Marciniak G & Froloff N 1999 Combinatorial chemistry, automation and molecular diversity: new trends in the pharmaceutical industry. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 725 3–15.
- Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, Estey EH, Dombret H, Chevret S, Ifrah N et al. 2014 Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *The Lancet. Oncology* 15 986–996. (doi:10.1016/S1470-2045(14)70281-5)
- Hoesel B & Schmid JA 2013 The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer* 12 86. (doi:10.1186/1476-4598-12-86)
- Holland PWH, Brooke NM & Garcia-Fernández J 1998 The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 392 920–922. (doi:10.1038/31933)
- Horwitz M 1997 The genetics of familial leukemia. *Leukemia* 11 1347–1359.
- Hou H-A, Kuo H-H, Liu C-H, Chou H-C, Lee MC, Chen C-H, Lin L-I, Tseng M-H, Huang C-F, Chiang H-C et al. 2012 DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood* 119 559–568. (doi:10.1182/blood-2011-07-369934)
- Hourigan CS & Aplan PD 2016 Accurate Medicine: Indirect Targeting of NPM1-Mutated AML. *Cancer Discovery* 6 1087–1089. (doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0917)
- ‘Hox Genes Are Found In The Genomes Of All Animals,... | Chegg.com’.
- Hu H-L, Fong S, Ferrell C, Largman C & Shen H-F 2009 HOXA9 Modulates Its Oncogenic Partner Meis1 To Influence Normal Hematopoiesis. *Molecular and Cellular Biology* 29 5181–5192. (doi:10.1128/MCB.00545-09)
- Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, Gu LJ & Wang ZY 1988 Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72 567–572.
- Huang H, Sitwala K, Bronstein J, Sanders D, Dandekar M, Collins C, Robertson G, MacDonald J, Cezard T, Bilenky M et al. 2012 Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. *Blood* 119 388–398. (doi:10.1182/blood-2011-03-341081)

- Hudlebusch HR, Lodahl M, Johnsen HE & Rasmussen T 2004 Expression of HOXA genes in patients with multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma* 45 1215–1217.
- Hume DA 2015 The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Frontiers in Immunology* 6 370. (doi:10.3389/fimmu.2015.00370)
- Hurley LH 2002 DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2 188–200. (doi:10.1038/nrc749)
- Ilencikova D & Kolenov A 2013 MLL Gene Alterations in Acute Myeloid Leukaemia (11q23/MLL+ AML). In *Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic*. InTech. (doi:10.5772/55141)
- Isaacs H V., Pownall ME & Slack JM 1998 Regulation of Hox gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. *The EMBO Journal* 17 3413–3427. (doi:10.1093/emboj/17.12.3413)
- Isakson P, Bjoras M, Boe SO & Simonsen A 2010 Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood* 116 2324–2331. (doi:10.1182/blood-2010-01-261040)
- Iwamoto M, Asakawa H, Hiraoka H & Haraguchi T 2010 Nucleoporin Nup98: a gatekeeper in the eukaryotic kingdoms. *Genes to Cells* 15 661–669. (doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01415.x)
- J. Durston A, Wacker S, Bardine N & J. Jansen H 2012 Time Space Translation: A Hox Mechanism for Vertebrate A-P Patterning. *Current Genomics* 13 300–307. (doi:10.2174/138920212800793375)
- Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK & Eldredge JH 1951 Recovery from radiation injury. *Science (New York, N.H.)* 113 510–511.
- Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, Vyas P, Weissman IL, Quake SR & Majeti R 2012 Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Science Translational Medicine* 4 149ra118. (doi:10.1126/scitranslmed.3004315)
- Jannin J & Cattand P 2004 Treatment and control of human African trypanosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17 565–571.
- Jemal A, Siegel R, Xu J & Ward E 2010 Cancer statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 60 277–300. (doi:10.3322/caac.20073)
- Jensen RE & Englund PT 2012 Network News: The Replication of Kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology* 66 473–491. (doi:10.1146/annurev-micro-092611-150057)
- Jin G, Yamazaki H, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T, Miyata S & Nakamura T 2007 Trib1 and Evl1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood* 109 3998–4005. (doi:10.1182/blood-2006-08-041202)
- Kalmodia S, Parameswaran S, Ganapathy K, Yang H, Barrow CJ, Kanwar JR, Roy K, Vasudevan M, Kulkarni K, Elchuri S V. et al. 2017 Characterization and Molecular Mechanism of Peptide-Conjugated Gold Nanoparticle Inhibiting p53-HDM2 Interaction in Retinoblastoma. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 9 349–364. (doi:10.1016/j.omtn.2017.10.012)
- Kamps MP, Murre C, Sun XH & Baltimore D 1990 A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* 60 547–555.
- Kantarjian HM, Roboz GJ, Kropf PL, Yee KWL, O'Connell CL, Tibes R, Walsh KJ, Podoltsev NA, Griffiths EA, Jabbour E et al. 2017 Guadecitabine (SGI-110) in treatment-naïve patients with acute myeloid leukaemia: phase 2 results from a multicentre, randomised, phase 1/2 trial. *The Lancet Oncology* 18 1317–1326. (doi:10.1016/S1470-2045(17)30576-4)
- Kasper LH, Brindle PK, Schnabel CA, Pritchard CE, Cleary ML & van Deursen JM 1999 CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Molecular and Cellular Biology* 19 764–776.
- Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ & Hogge DE 1999 Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 13 687–698.
- Kenderian SS, Ruella M, Shestova O, Klichinsky M, Kim MY, Soderquist C, Bagg A, Singh R, Richardson C, Young RM et al. 2016 Leukemia Stem Cells Are Characterized By CLEC12A Expression and Chemotherapy Refractoriness That Can be Overcome By Targeting with Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Blood* 128.
- Kim D-H, Choi S-J, Kim S-H, Chung H-H, Yi S, Kim D-H, Kim C-C & Han T-H 2005 Upregulated hoxC4 induces CD14 expression during the differentiation of acute promyelocytic leukemia

- cells. *Leukemia & Lymphoma* 46 1061–1066. (doi:10.1080/10428190500102589)
- Kim H, Kim R, Park G, Park J-H & Kim J-E 2012 Deficiency of H3K79 Histone Methyltransferase Dot1-like Protein (DOT1L) Inhibits Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 287 5588–5599. (doi:10.1074/jbc.M111.328138)
- Kim H, Choi M & Kim J-E 2014 The histone methyltransferase Dot1/DOT1L as a critical regulator of the cell cycle. *Cell Cycle* 13 726–738. (doi:10.4161/cc.28104)
- Kirito K, Fox N & Kaushansky K 2004 Thrombopoietin Induces HOXA9 Nuclear Transport in Immature Hematopoietic Cells: Potential Mechanism by Which the Hormone Favorably Affects Hematopoietic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology* 24 6751–6762. (doi:10.1128/MCB.24.15.6751-6762.2004)
- Kitchens RL, Ulevitch RJ & Munford RS 1992 Lipopolysaccharide (LPS) partial structures inhibit responses to LPS in a human macrophage cell line without inhibiting LPS uptake by a CD14-mediated pathway. *The Journal of Experimental Medicine* 176 485–494. (doi:10.1084/JEM.176.2.485)
- Klepin HD & Balducci L 2009 Acute myelogenous leukemia in older adults. *The Oncologist* 14 222–232. (doi:10.1634/theoncologist.2008-0224)
- Ko M, Huang H, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R et al. 2010 Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 468 839–843. (doi:10.1038/nature09586)
- Ko SY, Barengo N, Ladanyi A, Lee J-S, Marini F, Lengyel E & Naora H 2012 HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation* 122 3603–3617. (doi:10.1172/JCI62229)
- Kocabas F, Zheng J, Thet S, Copeland NG, Jenkins NA, DeBerardinis RJ, Zhang C & Sadek HA 2012 Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood* 120 4963–4972. (doi:10.1182/blood-2012-05-432260)
- Koeffler HP & Leong G 2017 Preleukemia: one name, many meanings. *Leukemia* 31 534–542. (doi:10.1038/leu.2016.364)
- Köhler A & Hurt E 2010 Gene Regulation by Nucleoporins and Links to Cancer. *Molecular Cell* 38 6–15. (doi:10.1016/j.molcel.2010.01.040)
- Kohroki J, Fujita S, Itoh N, Yamada H, Imai H, Yumoto N, Nakanishi T & Tanaka K 2001 ATRA-regulated Asb-2 gene induced in differentiation of HL-60 leukemia cells. *FEBS Letters* 505 223–228.
- Kolar Z, Burdova A, Jamaspishvili T, Bouchal J, Kucerova R, Bienova M, Kral M & Student V 2013 Relation of ETS transcription factor family member ERG, androgen receptor and topoisomerase 2β expression to TMPRSS2-ERG fusion status in prostate cancer. *Neoplasma*.
- de Koning HP & Jarvis SM 2001 Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta Tropica* 80 245–250.
- Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla B, Hogdal L, Busman T, McKeegan E, Salem AH, Zhu M, Ricker JL et al. 2016 Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discovery* 6 1106–1117. (doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0313)
- Kontermann RE & Brinkmann U 2015 Bispecific antibodies. *Drug Discovery Today* 20 838–847. (doi:10.1016/j.drudis.2015.02.008)
- Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier AA, Allamargot C, Quelle FW & Quelle DE 2005 Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Molecular and Cellular Biology* 25 1258–1271. (doi:10.1128/MCB.25.4.1258-1271.2005)
- Kouzarides T 2007 Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128 693–705. (doi:10.1016/j.cell.2007.02.005)
- Koya J, Kataoka K, Sato T, Bando M, Kato H, Tsuruta-Kishino T, Kobayashi H, Narukawa K, Miyoshi H, Shirahige K et al. 2016 DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. *Nature Communications* 7 10924. (doi:10.1038/ncomms10924)
- Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M & Udalova IA 2011 IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17

- responses. *Nature Immunology* 12 231–238. (doi:10.1038/ni.1990)
- Krivtsov A V, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang H, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG et al. 2006 Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442 818–822. (doi:10.1038/nature04980)
- Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM & Sauvageau G 1998 Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *The EMBO Journal* 17 3714–3725. (doi:10.1093/emboj/17.13.3714)
- Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T & Sauvageau G 2001 NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *The EMBO Journal* 20 350–361. (doi:10.1093/emboj/20.3.350)
- Krumlauf R 1994 Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78 191–201.
- Kugel JF & Goodrich JA 2012 Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends in Biochemical Sciences* 37 144–151. (doi:10.1016/j.tibs.2011.12.003)
- Kuhn MWM, Song E, Feng Z, Sinha A, Chen C-H, Deshpande AJ, Cusan M, Farnoud N, Mupo A, Grove C et al. 2016 Targeting Chromatin Regulators Inhibits Leukemogenic Gene Expression in NPM1 Mutant Leukemia. *Cancer Discovery* 6 1166–1181. (doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0237)
- Kurmis AA, Yang F, Welch TR, Nickols NG & Dervan PB 2017 A Pyrrole-Imidazole Polyamide Is Active against Enzalutamide-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Research* 77 2207–2212. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2503)
- Lallemand-Breitenbach V & de Thé H 2013 Retinoic acid plus arsenic trioxide, the ultimate panacea for acute promyelocytic leukemia? *Blood* 122 2008–2010. (doi:10.1182/blood-2013-06-505115)
- Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V & Lacaud G 2009 The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457 892–895. (doi:10.1038/nature07679)
- Lane SW & Gilliland DG 2010 Leukemia stem cells. *Seminars in Cancer Biology* 20 71–76. (doi:10.1016/j.semcancer.2009.12.001)
- Langlois T, da Costa Reis Monte-Mor B, Lenglet G, Droin N, Marty C, Le Couédic J-P, Almire C, Auger N, Mercher T, Delhommeau F et al. 2014 TET2 Deficiency Inhibits Mesoderm and Hematopoietic Differentiation in Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 32 2084–2097. (doi:10.1002/stem.1718)
- Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F & Berger R 1991 NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 77 1080–1086.
- Lansiaux A, Tanious F, Mishal Z, Dassonneville L, Kumar A, Stephens CE, Hu Q, Wilson WD, Boykin DW & Bailly C 2002 Distribution of furamide analogues in tumor cells: targeting of the nucleus or mitochondria depending on the amidine substitution. *Cancer Research* 62 7219–7229.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA & Dick JE 1994 A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367 645–648. (doi:10.1038/367645a0)
- Lappin TRJ, Grier DG, Thompson A & Halliday HL 2006 HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *The Ulster Medical Journal* 75 23–31.
- LaRonde-LeBlanc NA & Wolberger C 2003 Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes & Development* 17 2060–2072. (doi:10.1101/gad.1103303)
- Larson RA 2007 Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Practice & Research Clinical Haematology* 20 29–37. (doi:10.1016/j.beha.2006.10.006)
- Laughton CA, Tanious F, Nunn CM, Boykin DW, Wilson WD & Neidle S 1996 A Crystallographic and Spectroscopic Study of the Complex between d(CGCGAATTCGCG) 2 and 2,5-Bis(4-guanylphenyl)furan, an Analogue of Berenil. *Structural Origins of Enhanced DNA-Binding Affinity †*. *Biochemistry* 35 5655–5661. (doi:10.1021/bi952162r)
- Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, Fong S, Izon DJ, Humphries RK & Largman C 1997 Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid,

- erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 89 1922–1930.
- Lee BH, Tothova Z, Levine RL, Anderson K, Buza-Vidas N, Cullen DE, McDowell EP, Adelsperger J, Fröhling S, Huntly BJP et al. 2007 FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Cell* 12 367–380. (doi:10.1016/j.ccr.2007.08.031)
- Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR et al. 1999 Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 94 1086–1099.
- Lengerke C & Daley GQ 2012 Caudal genes in blood development and leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1266 47–54. (doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06625.x)
- Levis M 2013 FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2013 220–226. (doi:10.1182/asheducation-2013.1.220)
- Lewis EB 1978 A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276 565–570.
- Lewis EB 1982 Control of body segment differentiation in *Drosophila* by the bithorax gene complex. *Progress in Clinical and Biological Research* 85 Pt A 269–288.
- Li Z, Chen P, Su R, Hu C, Li H, Elkahlon AG, Zuo Z, Gurbuxani S, Arnovitz S, Weng H et al. 2016 PBX3 and MEIS1 Cooperate in Hematopoietic Cells to Drive Acute Myeloid Leukemias Characterized by a Core Transcriptome of the MLL-Rearranged Disease. *Cancer Research* 76 619–629. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1566)
- Li X-X, Zhou J-D, Zhang T-J, Yang L, Wen X-M, Ma J-C, Yang J, Zhang Z-H, Lin J & Qian J 2017a Epigenetic dysregulation of NKD2 is a valuable predictor assessing treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Journal of Cancer* 8 460–468. (doi:10.7150/jca.16914)
- Li H, Gao H, Cui T, Yang T, Liu L, Li T & Chen J 2017b Retinoic Acid Facilitates Toll-Like Receptor 4 Expression to Improve Intestinal Barrier Function through Retinoic Acid Receptor Beta. *Cellular Physiology and Biochemistry* 42 1390–1406. (doi:10.1159/000479203)
- Licht JD 2006 Reconstructing a disease: What essential features of the retinoic acid receptor fusion oncoproteins generate acute promyelocytic leukemia? *Cancer Cell* 9 73–74. (doi:10.1016/j.ccr.2006.01.024)
- Lichtenegger FS, Krupka C, Haubner S, Köhnke T & Subklewe M 2017 Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* 10 142. (doi:10.1186/s13045-017-0505-0)
- Lim JS, Park S-H & Jang KL 2011 All-trans retinoic acid induces cellular senescence by up-regulating levels of p16 and p21 via promoter hypomethylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412 500–505. (doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.130)
- Lin RJ & Evans RM 2000 Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Molecular Cell* 5 821–830.
- Lin J, Hiraoka K, Watanabe T, Kuo T, Shinozaki H, Takatori A, Koshikawa N, Chandran A, Otsuki J, Sugiyama H et al. 2016 Identification of Binding Targets of a Pyrrole-Imidazole Polyamide KR12 in the LS180 Colorectal Cancer Genome. *PLOS ONE* 11 e0165581. (doi:10.1371/journal.pone.0165581)
- Liu H, Shen Z, Chen X, Wang A, Cao Q, Zhu H, Chen S, Chen Z & Wang Z 2003 [Clinical observation of the short-term efficacy of the treatment with combination of all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL)]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi = Zhonghua Xueyexue Zazhi* 24 25–27.
- Liu H, Collar CJ, Kumar A, Stephens CE, Boykin DW & Wilson WD 2008 Heterocyclic Diamidine Interactions at AT Base Pairs in the DNA Minor Groove: Effects of Heterocycle Differences, DNA AT Sequence and Length. *The Journal of Physical Chemistry B* 112 11809–11818. (doi:10.1021/jp804048c)
- Liu X, Chen J, Yu S, Yan L, Guo H, Dai J, Zhang H & Zhu J 2017 All-trans retinoic acid and arsenic trioxide fail to derepress the monocytic differentiation driver Irf8 in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell Death and Disease* 8 e2782. (doi:10.1038/cddis.2017.197)
- Llopis L, Nibourel O, Boissel N, Huchette P, Renneville A, Abdelhamid E & Dombret H 2011 Implication des mutations des gènes. 17. (doi:10.1684/hma.2011.0596)

- Lo-Coco F, Hasan SK, Montesinos P & Sanz MA 2013 Biology and management of therapy-related acute promyelocytic leukemia. *Current Opinion in Oncology* 25 695–700. (doi:10.1097/CCO.0000000000000013)
- Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, Siddiqi T, Chavez JC, Hosing CM, Ghobadi A, Budde LE, Bot A, Rossi JM et al. 2017 Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Molecular Therapy* 25 285–295. (doi:10.1016/j.ymthe.2016.10.020)
- Loke J, Assi SA, Imperato MR, Ptasinska A, Cauchy P, Grabovska H, Soria NM, Raghavan M, Delwel HR, Cockerill PN et al. 2017 RUNX1-ETO and RUNX1-EVII Differentially Reprogram the Chromatin Landscape in t(8;21) and t(3;21) AML. *Cell Reports* 19 1654–1668. (doi:10.1016/j.celrep.2017.05.005)
- Lorenz E & Congdon CC 1954 Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone. *Journal of the National Cancer Institute* 14 955–965.
- Löwenberg B, Downing JR & Burnett A 1999 Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 341 1051–1062. (doi:10.1056/NEJM199909303411407)
- Lund K, Adams PD & Copland M 2014 EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* 28 44–49. (doi:10.1038/leu.2013.288)
- Luo Z, Lin C & Shilatifard A 2012 The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 543–547. (doi:10.1038/nrm3417)
- Lynch JT, Harris WJ & Somerville TCP 2012 LSD1 inhibition: a therapeutic strategy in cancer? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16 1239–1249. (doi:10.1517/14728222.2012.722206)
- Ma H, Zhang H, Mou X, Liu Z, Ru G & Li E 2017 High level of homeobox A9 and PBX homeobox 3 expression in gastric cancer correlates with poor prognosis. *Oncology Letters* 14 5883–5889. (doi:10.3892/ol.2017.6937)
- Mahdipour E & Mace KA 2011 Hox transcription factor regulation of adult bone-marrow-derived cell behaviour during tissue repair and regeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy* 11 1079–1090. (doi:10.1517/14712598.2011.579096)
- Mahfoudhi E, Secardin L, Scourzic L, Bernard O, Vainchenker H & Plo I 2015 Propriétés et rôles biologiques des protéines TET au cours du développement et de l'hématopoïèse. *Médecine/sciences* 31 268–274. (doi:10.1051/medsci/20153103012)
- Malek R, Gajula RP, Williams RD, Nghiem B, Simons BW, Nugent K, Wang H, Taparra K, Lemtiri-Chlieh G, Yoon AR et al. 2017 TWIST1-WDR5- Hottip Regulates Hoxa9 Chromatin to Facilitate Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Research* 77 3181–3193. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2797)
- Maloney KW & Gore L 2017 Agents in Development for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Drugs*. (doi:10.1007/s40272-017-0268-7)
- Mamo A, Kros J, Kroon E, Bijl J, Thompson A, Mayotte N, Girard S, Bisailon R, Beslu N, Featherstone M et al. 2006 Molecular dissection of Meis1 reveals 2 domains required for leukemia induction and a key role for Hoxa gene activation. *Blood* 108 622–629. (doi:10.1182/blood-2005-06-2244)
- Mann DA 2002 The NFkappaB luciferase mouse: a new tool for real time measurement of NFkappaB activation in the whole animal. *Gut* 51 769–770.
- Mansfield JH & McGlenn E 2012 Evolution, expression, and developmental function of Hox-embedded miRNAs. *Current Topics in Developmental Biology* 99 31–57. (doi:10.1016/B978-0-12-387038-4.00002-1)
- Mantovani A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A & LOCATI M 2004 The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25 677–686. (doi:10.1016/j.it.2004.09.015)
- Marshall H, Studer M, Pöpperl H, Aparicio S, Kuroiwa A, Brenner S & Krumlauf R 1994 A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature* 370 567–571. (doi:10.1038/370567a0)
- Martens JHA, Brinkman AB, Simmer F, Francoijs K-J, Nebbioso A, Ferrara F, Altucci L & Stunnenberg HG 2010 PML-RAR α /RXR Alters the Epigenetic Landscape in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Cell* 17 173–185. (doi:10.1016/j.ccr.2009.12.042)
- Martinez FO & Gordon S 2014 The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for

- reassessment. *F1000prime Reports* 6 13. (doi:10.12703/P6-13)
- Mathis AM, Holman JL, Sturk LM, Ismail MA, Boykin DW, Tidwell RR & Hall JE 2006 Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 2185–2191. (doi:10.1128/AAC.00192-06)
- Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR & Frei E 1994 Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 331 896–903. (doi:10.1056/NEJM199410063311402)
- Maynadié M & Troussard X 2015 Épidémiologie des leucémies aiguës. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2015 29–33. (doi:10.1016/S1773-035X(15)30071-X)
- Mayumi M 1992 EoL-1, A Human Eosinophilic Cell Line. *Leukemia & Lymphoma* 7 243–250. (doi:10.3109/10428199209053629)
- McGonigle GJ, Lappin TRJ & Thompson A 2008 Grappling with the HOX network in hematopoiesis and leukemia. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 13 4297–4308.
- Mdachi RE, Thuita JK, Kagira JM, Ngotho JM, Murilla GA, Ndung'u JM, Tidwell RR, Hall JE & Brun R 2009 Efficacy of the Novel Diamidine Compound 2,5-Bis(4-Amidinophenyl)-Furan-Bis-O-Methylamidoxime (Pafuramidine, DB289) against *Trypanosoma brucei rhodesiense* Infection in Vervet Monkeys after Oral Administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 953–957. (doi:10.1128/AAC.00831-08)
- Melnick A & Licht JD 1999 Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93 3167–3215.
- Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB et al. 2003 In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9 327–337.
- Mercader N, Leonardo E, Azpiazu N, Serrano A, Morata G, Martínez-A C & Torres M 1999 Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* 402 425–429. (doi:10.1038/46580)
- Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, Curfman J, Holland KB, Schwind S, Whitman SP et al. 2011 TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 1373–1381. (doi:10.1200/JCO.2010.32.7742)
- Meyer LH & Debatin K-M 2011 Diversity of human leukemia xenograft mouse models: implications for disease biology. *Cancer Research* 71 7141–7144. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1732)
- Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M et al. 2009 New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 23 1490–1499. (doi:10.1038/leu.2009.33)
- Midgley I, Fitzpatrick K, Taylor LM, Houchen TL, Henderson SJ, Wright SJ, Cybulski ZR, John BA, McBurney A, Boykin DW et al. 2007 Pharmacokinetics and metabolism of the prodrug DB289 (2,5-bis[4-(N-methoxyamidino)phenyl]furan monomaleate) in rat and monkey and its conversion to the antiprotozoal/antifungal drug DB75 (2,5-bis(4-guanylphenyl)furan dihydrochloride). *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 35 955–967. (doi:10.1124/dmd.106.013391)
- Miesner M, Haferlach C, Bacher U, Weiss T, Maciejewski K, Kohlmann A, Klein H-U, Dugas M, Kern H, Schnittger S et al. 2010 Multilineage dysplasia (MLD) in acute myeloid leukemia (AML) correlates with MDS-related cytogenetic abnormalities and a prior history of MDS or MDS/MPN but has no independent prognostic relevance: a comparison of 408 cases classified as "AML not otherwise specified" (AML-NOS) or "AML with myelodysplasia-related changes" (AML-MRC). *Blood* 116 2742–2751. (doi:10.1182/blood-2010-04-279794)
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ & Hill AM 2000 M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 6166–6173.

- Ming X, Ju H, Wu H, Tidwell RR, Hall JE & Thakker DR 2009 Transport of dicationic drugs pentamidine and furamidine by human organic cation transporters. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 37 424–430. (doi:10.1124/dmd.108.024083)
- Mohr S, Doebele C, Comoglio F, Berg T, Beck J, Bohnenberger H, Alexe G, Corso J, Ströbel P, Wachter A et al. 2017 Hoxa9 and Meis1 Cooperatively Induce Addiction to Syk Signaling by Suppressing miR-146a in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 31 549–562.e11. (doi:10.1016/j.ccell.2017.03.001)
- Monica K, Galili N, Nourse J, Saltman D & Cleary ML 1991 PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Molecular and Cellular Biology* 11 6149–6157.
- Monroe SC, Jo SY, Sanders DS, Basrur V, Elenitoba-Johnson KS, Slany RK & Hess JL 2011 MLL-AF9 and MLL-ENL alter the dynamic association of transcriptional regulators with genes critical for leukemia. *Experimental Hematology* 39 77–86.e5. (doi:10.1016/j.exphem.2010.09.003)
- Montesinos P & Sanz MA 2011 The differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia: experience of the pethema group and review of the literature. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 3 e2011059. (doi:10.4084/MJHID.2011.059)
- Moore MAS, Chung KY, Plasilova M, Schuringa JJ, Shien J-H, Zhou P & Morrone G 2007 NUP98 Dysregulation in Myeloid Leukemogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1106 114–142. (doi:10.1196/annals.1392.019)
- Morgan R, El-Tanani M, Hunter KD, Harrington KJ & Pandha HS 2017 Targeting HOX/PBX dimers in cancer. *Oncotarget* 8 32322–32331. (doi:10.18632/oncotarget.15971)
- Morita K, Suzuki K, Maeda S, Matsuo A, Mitsuda H, Tokushige C, Kashiwazaki G, Taniguchi J, Maeda R, Noura M et al. 2017 Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects. *Journal of Clinical Investigation* 127 2815–2828. (doi:10.1172/JCI91788)
- Morrison A, Moroni MC, Ariza-McNaughton L, Krumlauf R & Mavilio F 1996 In vitro and transgenic analysis of a human HOXD4 retinoid-responsive enhancer. *Development (Cambridge, England)* 122 1895–1907.
- Moskow JJ, Bullrich F, Huebner K, Daar IO & Buchberg AM 1995 Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Molecular and Cellular Biology* 15 5434–5443.
- Moticka EJ A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology.
- Mrksich M, Wade WS, Dwyer TJ, Geierstanger BH, Wemmer DE & Dervan PB 1992 Antiparallel side-by-side dimeric motif for sequence-specific recognition in the minor groove of DNA by the designed peptide 1-methylimidazole-2-carboxamide netropsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 7586–7590.
- Mullard A 2017 FDA approves first-in-class cancer metabolism drug. *Nature Reviews Drug Discovery* 16 593–593. (doi:10.1038/nrd.2017.174)
- Mullighan CG, Kennedy A, Zhou X, Radtke I, Phillips LA, Shurtleff SA & Downing JR 2007 Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia* 21 2000–2009. (doi:10.1038/sj.leu.2404808)
- Munde M, Wang S, Kumar A, Stephens CE, Farahat AA, Boykin DW, Wilson WD & Poon GMK 2014a Structure-dependent inhibition of the ETS-family transcription factor PU.1 by novel heterocyclic diamidines. *Nucleic Acids Research* 42 1379–1390. (doi:10.1093/nar/gkt955)
- Munde M, Wang S, Kumar A, Stephens CE, Farahat AA, Boykin DW, Wilson WD & Poon GMK 2014b Structure-dependent inhibition of the ETS-family transcription factor PU.1 by novel heterocyclic diamidines. *Nucleic Acids Research* 42 1379–1390. (doi:10.1093/nar/gkt955)
- Muntean AG & Hess JL 2012 The Pathogenesis of Mixed-Lineage Leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 7 283–301. (doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132434)
- Muntean AG, Tan J, Sitwala K, Huang H, Bronstein J, Connelly JA, Basrur V, Elenitoba-Johnson KSJ & Hess JL 2010 The PAF Complex Synergizes with MLL Fusion Proteins at HOX Loci to Promote Leukemogenesis. *Cancer Cell* 17 609–621. (doi:10.1016/j.ccr.2010.04.012)
- Myers K 1993 Shwachman-Diamond Syndrome.
- Mysore VS, Szablowski J, Dervan PB & Frost PJ 2016 A DNA-binding Molecule Targeting the Adaptive Hypoxic Response in Multiple Myeloma Has Potent Antitumor Activity. *Molecular*

- Cancer Research 14 253–266. (doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0361)
- Nagel S, Venturini L, Marquez VE, Meyer C, Kaufmann M, Scherr M, MacLeod RA & Drexler HG 2010 Polycomb repressor complex 2 regulates HOXA9 and HOXA10, activating ID2 in NK/T-cell lines. *Molecular Cancer* 9 151. (doi:10.1186/1476-4598-9-151)
- Nakamura T, Largaespada DA, Shaughnessy JD, Jenkins NA & Copeland NG 1996 Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nature Genetics* 12 149–153. (doi:10.1038/ng0296-149)
- Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski H, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM & Canaani E 2002 ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Molecular Cell* 10 1119–1128.
- Negi V, Vishwakarma BA, Chu S, Oakley K, Han H, Bhatia R & Du H 2017 Hoxa9 and Hoxa10 induce CML myeloid blast crisis development through activation of Myb expression. *Oncotarget* 8 98853–98864. (doi:10.18632/oncotarget.22008)
- Nguyen AT, He J, Taranova O & Zhang H 2011 Essential role of DOT1L in maintaining normal adult hematopoiesis. *Cell Research* 21 1370–1373. (doi:10.1038/cr.2011.115)
- Nguyen E, Gausdal G, Varennes J, Pendino F, Lanotte M, Doskeland SO & Segal-Bendirdjian E 2013 Activation of Both Protein Kinase A (PKA) Type I and PKA Type II Isozymes Is Required for Retinoid-Induced Maturation of Acute Promyelocytic Leukemia Cells. *Molecular Pharmacology* 83 1057–1065. (doi:10.1124/mol.112.081034)
- Nhili R, Peixoto P, Depauw S, Flajollet S, Dezitter X, Munde MM, Ismail MA, Kumar A, Farahat AA, Stephens CE et al. 2013 Targeting the DNA-binding activity of the human ERG transcription factor using new heterocyclic dithiophene diamidines. *Nucleic Acids Research* 41 125–138. (doi:10.1093/nar/gks971)
- Nüsslein-Volhard C & Wieschaus E 1980 Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287 795–801.
- O’Hear C, Heiber JF, Schubert I, Fey G & Geiger TL 2015 Anti-CD33 chimeric antigen receptor targeting of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 100 336–344. (doi:10.3324/haematol.2014.112748)
- Ogawara H, Takuo Katsumoto T, Aikawa H, Shima H, Kagiya H, Soga T, Matsunaga H, Seki T, Araki K & Kitabayashi I 2015 IDH2 and NPM1 mutations cooperate to activate Hoxa9/Meis1 and hypoxia pathways in acute myeloid leukemia. *Cancer Research*. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2200)
- Ohlsson E, Schuster MB, Hasemann M & Porse BT 2016 The multifaceted functions of C/EBP α in normal and malignant haematopoiesis. *Leukemia* 30 767–775. (doi:10.1038/leu.2015.324)
- Owen C, Barnett M & Fitzgibbon J 2008 Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia--a review. *British Journal of Haematology* 140 123–132. (doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06909.x)
- Owens BM & Hawley RG 2002 HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 20 364–379. (doi:10.1634/stemcells.20-5-364)
- Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann H & Tenen DG 2001 Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nature Genetics* 27 263–270. (doi:10.1038/85820)
- Park S-M, Choi E-H, Bae M, Choi JK & Kim H-J 2017 A long-range interactive DNA methylation marker panel for the promoters of HOXA9 and HOXA10 predicts survival in breast cancer patients. *Clinical Epigenetics* 9 73. (doi:10.1186/s13148-017-0373-z)
- Patatanian E & Thompson DF 2008 Retinoic acid syndrome: a review. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 33 331–338. (doi:10.1111/j.1365-2710.2008.00935.x)
- Patel A, Dharmarajan V, Vought VE & Cosgrove MS 2009 On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex. *The Journal of Biological Chemistry* 284 24242–24256. (doi:10.1074/jbc.M109.014498)
- Peixoto P, Liu H, Depauw S, Hildebrand M-P, Boykin DW, Bailly C, Wilson WD & David-Cordonnier M-H 2008 Direct inhibition of the DNA-binding activity of POU transcription factors Pit-1 and Brn-3 by selective binding of a phenyl-furan-benzimidazole dication. *Nucleic Acids Research* 36 3341–3353. (doi:10.1093/nar/gkn208)
- Peller S & Rotter V 2003 TP53 in hematological cancer: Low incidence of mutations with significant

- clinical relevance. *Human Mutation* 21 277–284. (doi:10.1002/humu.10190)
- Pelton JG & Wemmer DE 1989 Structural characterization of a 2:1 distamycin A.d(CGCAAATTGGC) complex by two-dimensional NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 5723–5727.
- Perl AE 2017 The role of targeted therapy in the management of patients with AML. *Blood Advances* 1 2281–2294. (doi:10.1182/bloodadvances.2017009829)
- Phelan ML, Rambaldi I & Featherstone MS 1995 Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Molecular and Cellular Biology* 15 3989–3997.
- Pilon N, Oh K, Sylvestre J-R, Savory JGA & Lohnes D 2007 Wnt signaling is a key mediator of Cdx1 expression in vivo. *Development (Cambridge, England)* 134 2315–2323. (doi:10.1242/dev.001206)
- Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ & Humphries RK 2002 Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Experimental Hematology* 30 49–57.
- Pires-Luís AS, Costa-Pinheiro P, Ferreira MJ, Antunes L, Lobo F, Oliveira J, Henrique R & Jerónimo C 2017 Identification of clear cell renal cell carcinoma and oncocytoma using a three-gene promoter methylation panel. *Journal of Translational Medicine* 15 149. (doi:10.1186/s12967-017-1248-H)
- Plo I, Bellané-Chantelot C, Vainchenker W ATG2B and GSKIP: 2 new genes predisposing to myeloid malignancies. *Mol Cell Oncol.* 2016 Mar; 3(2): e1094564.
- Pollyea DA & Jordan CT 2017 Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* 129 1627–1635. (doi:10.1182/blood-2016-10-696039)
- Poppe B, Van Limbergen H, Van Roy N, Vandecruys E, De Paepe A, Benoit H & Speleman F 2001 Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 128 39–42.
- Poret N, Fu Q, Guihard S, Cheok M, Miller K, Zeng G, Quesnel B, Troussard X, Galiègue-Zouitina S & Shelley CS 2015 CD38 in Hairy Cell Leukemia Is a Marker of Poor Prognosis and a New Target for Therapy. *Cancer Research* 75 3902–3911. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0893)
- Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P et al. 2009 Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 14978–14983. (doi:10.1073/pnas.0809784106)
- Porter DL, Hwang H-T, Frey N V., Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, Bagg A, Marcucci KT, Shen A, Gonzalez V et al. 2015 Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science Translational Medicine* 7 303ra139-303ra139. (doi:10.1126/scitranslmed.aac5415)
- Pownall ME, Tucker AS, Slack JM & Isaacs H V 1996 eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 122 3881–3892.
- Pratz KW & Levis M 2017 How I treat FLT3-mutated AML. *Blood* 129 565–571. (doi:10.1182/blood-2016-09-693648)
- Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela J-M, Tigaud I, de Botton S, Thomas X, Raffoux E, Lamandin C, Castaigne S et al. 2002 Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 100 2717–2723. (doi:10.1182/blood-2002-03-0990)
- Quesnel B 2013 Tumor Dormancy: Long-Term Survival in a Hostile Environment. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp 181–200. (doi:10.1007/978-1-4614-1445-2_9)
- Quintás-Cardama A, Hu C, Qutub A, Qiu H, Zhang X, Post SM, Zhang N, Coombes K & Kornblau SM 2017 p53 pathway dysfunction is highly prevalent in acute myeloid leukemia independent of TP53 mutational status. *Leukemia* 31 1296–1305. (doi:10.1038/leu.2016.350)
- Ramberg H, Grytli H, Nygård S, Wang H, Ögren O, Zhao S, Løvf M, Katz B, Skotheim RI, Bjartell A et al. 2016 PBX3 is a putative biomarker of aggressive prostate cancer. *International Journal of Cancer* 139 1810–1820. (doi:10.1002/ijc.30220)
- Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI & Munder M 2014 Metabolism via Arginase or Nitric Oxide

- Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in Immunology* 5 532. (doi:10.3389/fimmu.2014.00532)
- Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD & Pfeifer GP 2007 Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 5527–5532. (doi:10.1073/pnas.0701059104)
- Rawat VPS, Humphries RK & Buske C 2012 Beyond Hox: the role of ParaHox genes in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 120 519–527. (doi:10.1182/blood-2012-02-385898)
- Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P & Preudhomme C 2008 Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 22 915–931. (doi:10.1038/leu.2008.19)
- Renneville A, Boissel N, Nibourel O, Berthon C, Helevaut N, Gardin C, Cayuela J-M, Hayette S, Reman O, Contentin N et al. 2012 Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. *Leukemia* 26 1247–1254. (doi:10.1038/leu.2011.382)
- Richter E, Ventz K, Harms M, Mostertz J & Hochgräfe F 2016 Induction of Macrophage Function in Human THP-1 Cells Is Associated with Rewiring of MAPK Signaling and Activation of MAP3K7 (TAK1) Protein Kinase. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4 21. (doi:10.3389/fcell.2016.00021)
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E et al. 2007 Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* 129 1311–1323. (doi:10.1016/j.cell.2007.05.022)
- De Robertis EM 2008 Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell* 132 185–195. (doi:10.1016/j.cell.2008.01.003)
- Roboz GJ 2012 Current treatment of acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Oncology* 24 711–719. (doi:10.1097/CCO.0b013e328358f62d)
- Roe K, Gibot S & Verma S 2014 Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1): a new player in antiviral immunity? *Frontiers in Microbiology* 5 627. (doi:10.3389/fmicb.2014.00627)
- de Rooij J, Zwaan C & van den Heuvel-Eibrink M 2015 Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *Journal of Clinical Medicine* 4 127–149. (doi:10.3390/jcm4010127)
- Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, Habdank M, Kugler C-M, Holzmann K, Gaidzik VI et al. 2012 TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood* 119 2114–2121. (doi:10.1182/blood-2011-08-375758)
- Ruijs MWG, Broeks A, Menko FH, Ausems MGEM, Wagner A, Oldenburg R, Meijers-Heijboer H, van't Veer LJ & Verhoef S 2009 The contribution of CHEK2 to the TP53-negative Li-Fraumeni phenotype. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 7 4. (doi:10.1186/1897-4287-7-4)
- Saliba J, Saint-Martin C, Di Stefano A, Lenglet G, Marty C, Keren B, Pasquier F, Valle VD, Secardin L, Leroy G, et al. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nat Genet* 2015; 47(10):1131-40; PMID:26280900; <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3380>
- Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, Largman C, Lawrence HJ & Humphries RK 1994 Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 12223–12227.
- Schemionek M, Kharabi Masouleh B, Klaile H, Krug U, Hebestreit K, Schubert C, Dugas M, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann H et al. 2015a Identification of the Adapter Molecule MTSS1 as a Potential Oncogene-Specific Tumor Suppressor in Acute Myeloid Leukemia. *PLOS ONE* 10 e0125783. (doi:10.1371/journal.pone.0125783)
- Schilling TF & King RD 2001 Origins of anteroposterior patterning and Hox gene regulation during chordate evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 356 1599–1613. (doi:10.1098/rstb.2001.0918)
- Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern H, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T et al. 2002 Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid

- leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100 59–66.
- Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, Alpermann T, Kern H & Haferlach T 2010 IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood* 116 5486–5496. (doi:10.1182/blood-2010-02-267955)
- Schultz M 2008 Rudolf Virchow. *Emerging Infectious Diseases* 14 1480–1481. (doi:10.3201/eid1409.086672)
- Schwartz YB & Pirrotta V 2007 Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nature Reviews Genetics* 8 9–22. (doi:10.1038/nrg1981)
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P & Dieter P 1996 Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of Leukocyte Biology* 59 555–561.
- Seifert A, Werheid DF, Knapp SM & Tobiasch E 2015 Role of Hox genes in stem cell differentiation. *World Journal of Stem Cells* 7 583–595. (doi:10.4252/wjsc.v7.i3.583)
- Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, Kantarjian HM & Estey E 2009 Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood* 113 28–36. (doi:10.1182/blood-2008-05-157065)
- Shah N & Sukumar S 2010 The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nature Reviews Cancer* 10 361–371. (doi:10.1038/nrc2826)
- Shah CA, Bei L, Wang H, Plataniias LC & Eklund EA 2012 HoxA10 Protein Regulates Transcription of Gene Encoding Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) in Myeloid Cells. *Journal of Biological Chemistry* 287 18230–18248. (doi:10.1074/jbc.M111.328401)
- Shapiro TA & Englund PT 1990 Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 950–954.
- Shen WF, Rozenfeld S, Kwong A, Köm ves LG, Lawrence HJ & Largman C 1999 HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Molecular and Cellular Biology* 19 3051–3061.
- Shi J, Shao Z, Liu H, Bai J, Cao H, He G, Tu M, Wang X, Hao H, Yang T et al. 2004 Transformation of myelodysplastic syndromes into acute myeloid leukemias. *Chinese Medical Journal* 117 963–967.
- Shi A, Murai MJ, He S, Lund G, Hartley T, Purohit T, Reddy G, Chruszcz M, Grembecka J & Cierpicki T 2012 Structural insights into inhibition of the bivalent menin-MLL interaction by small molecules in leukemia. *Blood* 120 4461–4469. (doi:10.1182/blood-2012-05-429274)
- Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, Kennedy JA, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW et al. 2014 Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 506 328–333. (doi:10.1038/nature13038)
- Simeone A, Pannese M, Acampora D, D’Esposito M & Boncinelli E 1988 At least three human homeoboxes on chromosome 12 belong to the same transcription unit. *Nucleic Acids Research* 16 5379–5390.
- Skopicki HA, Lyons GE, Schatteman G, Smith RC, Andrés V, Schirm S, Isner J & Walsh K 1997 Embryonic expression of the Gax homeodomain protein in cardiac, smooth, and skeletal muscle. *Circulation Research* 80 452–462. (doi:10.1161/01.res.80.4.452)
- Slape C, Lin H, Hartung H, Zhang Z, Wolff L & Aplan PD 2008 NUP98-HOX translocations lead to myelodysplastic syndrome in mice and men. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 64–68. (doi:10.1093/jncimonographs/IGN014)
- Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM et al. 2000 Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96 4075–4083.
- Smith E, Lin C & Shilatifard A 2011 The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes & Development* 25 661–672. (doi:10.1101/gad.2015411)
- Sohal J, Phan VT, Chan P V., Davis EM, Patel B, Kelly LM, Abrams TJ, O’Farrell AM, Gilliland DG, Le Beau MM et al. 2003 A model of APL with FLT3 mutation is responsive to retinoic acid and

- a receptor tyrosine kinase inhibitor, SU11657. *Blood* 101 3188–3197. (doi:10.1182/blood-2002-06-1800)
- Soulier J, Clappier E, Cayuela J-M, Regnault A, García-Peydró M, Dombret H, Baruchel A, Toribio M-L & Sigaux F 2005 HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 106 274–286. (doi:10.1182/blood-2004-10-3900)
- Speleman F, Cauwelier B, Dastugue N, Cools J, Verhasselt B, Poppe B, Van Roy N, Vandesompele J, Graux C, Uyttebroeck A et al. 2005 A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 19 358–366. (doi:10.1038/sj.leu.2403657)
- Spradling A, Drummond-Barbosa D & Kai T 2001 Stem cells find their niche. *Nature* 414 98–104. (doi:10.1038/35102160)
- Stadler CR, Vegi N, Mulaw MA, Edmaier KE, Rawat VPS, Dolnik A, Bullinger L, Heilmeier B, Quintanilla-Fend L, Spiekermann K et al. 2014 The leukemogenicity of Hoxa9 depends on alternative splicing. *Leukemia* 28 1838–1843. (doi:10.1038/leu.2014.74)
- Stahl M, Lu BY, Kim TK & Zeidan AM 2017 Novel Therapies for Acute Myeloid Leukemia: Are We Finally Breaking the Deadlock? *Targeted Oncology* 12 413–447. (doi:10.1007/s11523-017-0503-8)
- Starikova EA, Sokolov DI, Chernova AA & Freidlin IS 2008 Changes in phenotype of monocyte-like THP-1 cells associated with transendothelial migration. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 146 596–598.
- Stary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E, Donska S, Gonzalez A, Izraeli S, Janic D, Jazbec J et al. 2014 Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 174–184. (doi:10.1200/JCO.2013.48.6522)
- Steger J, Füller E, Garcia-Cuellar M-P, Hetzner K & Slany RK 2015 Insulin-like growth factor 1 is a direct HOXA9 target important for hematopoietic transformation. *Leukemia* 29 901–908. (doi:10.1038/leu.2014.287)
- Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, Stone RM, DeAngelo DJ, Levine RL, Flinn IW et al. 2017a Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 130 722–731. (doi:10.1182/blood-2017-04-779405)
- Stein EM, Walter RB, Erba HP, Fathi AT, Advani AS, Lancet JE, Ravandi F, Kovacsovic T, DeAngelo DJ, Bixby D et al. 2017b A phase 1 trial of vadastuximab talirine as monotherapy in patients with CD33 positive acute myeloid leukemia (AML). *Blood* blood-2017-06-789800. (doi:10.1182/blood-2017-06-789800)
- Stirewalt DL & Radich JP 2003 The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature Reviews. Cancer* 3 650–665. (doi:10.1038/nrc1169)
- Stone RM 2017 Which new agents will be incorporated into frontline therapy in acute myeloid leukemia? *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 30 312–316. (doi:10.1016/j.beha.2017.09.006)
- Stone RM, Larson RA & Döhner H 2017 Midostaurin in FLT3 -Mutated Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 377 1901–1903. (doi:10.1056/NEJMc1711340)
- Sturk LM, Brock JL, Bagnell CR, Hall JE & Tidwell RR 2004 Distribution and quantitation of the anti-trypanosomal diamidine 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan (DB75) and its N-methoxy prodrug DB289 in murine brain tissue. *Acta Tropica* 91 131–143. (doi:10.1016/j.actatropica.2004.03.010)
- Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin SM, Trent JO, Jenkins TC, Neidle S & Hurley LH 1997 Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplex-Interactive Compound. *Journal of Medicinal Chemistry* 40 2113–2116. (doi:10.1021/jm970199z)
- Sundstrom C & Nilsson K 1976 Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int.J.Cancer*.
- Syed J, Pandian GN, Sato S, Taniguchi J, Chandran A, Hashiya K, Bando T & Sugiyama H 2014 Targeted Suppression of EVI1 Oncogene Expression by Sequence-Specific Pyrrole-Imidazole Polyamide. *Chemistry & Biology* 21 1370–1380. (doi:10.1016/j.chembiol.2014.07.019)
- Tahiliani M, Koh KP, Shen H, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno H, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L et al. 2009 Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in

- Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 324 930–935. (doi:10.1126/science.1170116)
- Takahashi S 2011 PU.1, a Versatile Transcription Factor and a Suppressor of Myeloid Leukemia. In *Myeloid Leukemia - Basic Mechanisms of Leukemogenesis*. InTech. (doi:10.5772/25853)
- Takahashi H, Hamada J, Murakawa K, Takada M, Tada M, Nogami I, Hayashi N, Nakamori S, Monden M, Miyamoto M et al. 2004 Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Experimental Cell Research* 293 144–153.
- Takahashi H, Hatta H, Iriyama N, Hasegawa H, Uchida H, Nakagawa M, Makishima M, Takeuchi J & Takei M 2014 Induced Differentiation of Human Myeloid Leukemia Cells into M2 Macrophages by Combined Treatment with Retinoic Acid and 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3. *PLoS ONE* 9 e113722. (doi:10.1371/journal.pone.0113722)
- Takeda A, Goolsby C & Yaseen NR 2006 NUP98-HOXA9 Induces Long-term Proliferation and Blocks Differentiation of Primary Human CD34 + Hematopoietic Cells. *Cancer Research* 66 6628–6637. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0458)
- Tang J-L, Hou H-A, Chen C-H, Liu C-H, Chou H-C, Tseng M-H, Huang C-F, Lee F-H, Liu M-C, Yao M et al. 2009a AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* 114 5352–5361. (doi:10.1182/blood-2009-05-223784)
- Tang H, Chen F, Tan Q, Tan S, Liu L & Zhang F 2009b Regulation of CD11b transcription by decreasing PRC2 and increased acH4 level during ATRA-induced HL-60 differentiation. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 41 588–593. (doi:10.1093/abbs/gmp046)
- Tang L, Chai H, Ye F, Yu H, Cao L, Yang M, Xie M & Yang L 2017 HMGB1 promotes differentiation syndrome by inducing hyperinflammation via MEK/ERK signaling in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget* 8 27314–27327. (doi:10.18632/oncotarget.15432)
- Tanious F, Wilson WD, Wang L, Kumar A, Boykin DW, Marty C, Baldeyrou B & Bailly C 2003 Cooperative Dimerization of a Heterocyclic Diamidine Determines Sequence-Specific DNA Recognition †. *Biochemistry* 42 13576–13586. (doi:10.1021/bi034852y)
- Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CAJ, Wouters BJ, van der Poel-van de Luytgaarde SC, Damm F, Krauter J, Ganser A et al. 2011 Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood* 117 2469–2475. (doi:10.1182/blood-2010-09-307280)
- Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van Driessche A, Cools N, Anguille S, Ladell K, Gostick E, Vermeulen K, Pieters K, Nijs G et al. 2010 Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 13824–13829. (doi:10.1073/pnas.1008051107)
- Testa U, Pelosi E & Frankel A 2014 CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomarker Research* 2 4. (doi:10.1186/2050-7771-2-4)
- de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L & Dejean A 1990 The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347 558–561. (doi:10.1038/347558a0)
- Thokala R, Olivares S, Mi T, Maiti S, Deniger D, Huls H, Torikai H, Singh H, Champlin RE, Laskowski T et al. 2016 Redirecting Specificity of T cells Using the Sleeping Beauty System to Express Chimeric Antigen Receptors by Mix-and-Matching of VL and VH Domains Targeting CD123+ Tumors. *PLOS ONE* 11 e0159477. (doi:10.1371/journal.pone.0159477)
- Thol F, Damm F, Lüdeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, Yun H, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D et al. 2011 Incidence and Prognostic Influence of DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 29 2889–2896. (doi:10.1200/JCO.2011.35.4894)
- Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F & Sauvageau G 2001 Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Molecular and Cellular Biology* 21 224–234. (doi:10.1128/MCB.21.1.224-234.2001)
- Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, Humphries K & Sauvageau G 2002 Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells

- induces stem cell expansion. *Blood* 99 121–129.
- Thuita JK, Karanja SM, Wenzler T, Mdachi RE, Ngotho JM, Kagira JM, Tidwell R & Brun R 2008a Efficacy of the diamidine DB75 and its prodrug DB289, against murine models of human African trypanosomiasis. *Acta Tropica* 108 6–10. (doi:10.1016/j.actatropica.2008.07.006)
- Thuita JK, Kagira JM, Mwangangi D, Matovu E, Turner CMR & Masiga D 2008b *Trypanosoma brucei rhodesiense* Transmitted by a Single Tsetse Fly Bite in Vervet Monkeys as a Model of Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2 e238. (doi:10.1371/journal.pntd.0000238)
- Thuita JK, Wang MZ, Kagira JM, Denton CL, Paine MF, Mdachi RE, Murilla GA, Ching S, Boykin DW, Tidwell RR et al. 2012 Pharmacology of DB844, an orally active aza analogue of pafuramidine, in a monkey model of second stage human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 e1734. (doi:10.1371/journal.pntd.0001734)
- Thuita JK, Wolf KK, Murilla GA, Liu Q, Mutuku JN, Chen H, Bridges AS, Mdachi RE, Ismail MA, Ching S et al. 2013 Safety, Pharmacokinetic, and Efficacy Studies of Oral DB868 in a First Stage Vervet Monkey Model of Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 e2230. (doi:10.1371/journal.pntd.0002230)
- Thuita JK, Wolf KK, Murilla GA, Bridges AS, Boykin DW, Mutuku JN, Liu Q, Jones SK, Gem CO, Ching S et al. 2015 Chemotherapy of second stage human African trypanosomiasis: comparison between the parenteral diamidine DB829 and its oral prodrug DB868 in vervet monkeys. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 e0003409. (doi:10.1371/journal.pntd.0003409)
- Till JE & McCulloch EA 1961 A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research* 14 213–222.
- Toshchakov V, Jones BW, Perera P-H, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BRG, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ et al. 2002 TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nature Immunology* 3 392–398. (doi:10.1038/ni774)
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi H, Kobayashi H, Konno T & Tada K 1980 Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer* 26 171–176. (doi:10.1002/ijc.2910260208)
- Tsuzuki S, Taguchi O & Seto M 2011 Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood* 117 3858–3868.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T & Pennington DJ 2014 Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 2563–2582. (doi:10.1016/J.BBAMCR.2014.05.014)
- Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, Sommermeyer D, Melville K, Pender B, Budiarto TM et al. 2016 CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *Journal of Clinical Investigation* 126 2123–2138. (doi:10.1172/JCI85309)
- Vainchenker H & Plo I 2017 P53 deletion and NrasG12D cooperate for AML. *Blood* 129 271–273. (doi:10.1182/blood-2016-11-750547)
- Vellozo NS, Pereira-Marques ST, Cabral-Piccin MP, Filardy AA, Ribeiro-Gomes FL, Rigoni TS, DosReis GA & Lopes MF 2017 All-Trans Retinoic Acid Promotes an M1- to M2-Phenotype Shift and Inhibits Macrophage-Mediated Immunity to *Leishmania major*. *Frontiers in Immunology* 8 1560. (doi:10.3389/fimmu.2017.01560)
- Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten H, Bijl MA, Sanders MA, Hugens H, Uitterlinden AG, Erpelinck CAJ, Delwel R, Löwenberg B et al. 2005 Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 106 3747–3754. (doi:10.1182/blood-2005-05-2168)
- Vijapurkar U, Fischbach N, Shen H, Brandts C, Stokoe D, Lawrence HJ & Largman C 2004 Protein kinase C-mediated phosphorylation of the leukemia-associated HOXA9 protein impairs its DNA binding ability and induces myeloid differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 24 3827–3837.
- Villa R, Pasini D, Gutierrez A, Morey L, Occhionorelli M, Viré E, Nomdedeu JF, Jenuwein T, Pelicci PG, Minucci S et al. 2007 Role of the Polycomb Repressive Complex 2 in Acute Promyelocytic

Leukemia. *Cancer Cell* 11 513–525. (doi:10.1016/j.ccr.2007.04.009)

- Wang GG, Pasillas MP & Kamps MP 2006 Persistent transactivation by meis1 replaces hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of meis1-pbx and hox-pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Molecular and Cellular Biology* 26 3902–3916. (doi:10.1128/MCB.26.10.3902-3916.2006)
- Wang GG, Cai L, Pasillas MP & Kamps MP 2007 NUP98–NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nature Cell Biology* 9 804–812. (doi:10.1038/ncb1608)
- Wang KC, Yang H, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen H, Lajoie BR, Protacio A, Flynn RA, Gupta RA et al. 2011 A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* 472 120–124. (doi:10.1038/nature09819)
- Wang J, Muntean AG & Hess JL 2012a ECSASB2 mediates MLL degradation during hematopoietic differentiation. *Blood* 119 1151–1161. (doi:10.1182/blood-2011-06-362079)
- Wang J, Muntean AG & Hess JL 2012b ECSASB2 mediates MLL degradation during hematopoietic differentiation. *Blood* 119 1151–1161. (doi:10.1182/blood-2011-06-362079)
- Wang H, Dang H, Liu J & Ouyang X 2016 The function of homeobox genes and lncRNAs in cancer. *Oncology Letters* 12 1635–1641. (doi:10.3892/ol.2016.4901)
- Wang M, Hao C, Huang X, Bao H, Qu Q, Liu Z, Dai H, He S & Yan H 2017 Aberrant Expression of lncRNA (HOXA11-AS1) and Homeobox A (HOXA9 , HOXA10 , HOXA11 , and HOXA13) Genes in Infertile Women With Endometriosis. *Reproductive Sciences* 193371911773432. (doi:10.1177/1933719117734320)
- Wang H, Yin C, Feng L, Ma L, Wei H & Sheng G 2013 Sorting, identification and enrichment of side population cells in THP-1 acute monocytic leukemia cells. *Oncology Reports* 29 1923–1931. (doi:10.3892/or.2013.2316)
- Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat C V., Perl AE et al. 2010 The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17 225–234. (doi:10.1016/j.ccr.2010.01.020)
- Warren AJ 2017 Molecular basis of the human ribosomopathy Shwachman-Diamond syndrome. *Advances in Biological Regulation*. (doi:10.1016/j.jbior.2017.09.002)
- Watanabe K, Kobayashi H, Banno K, Matoba H, Kunitomi H, Nakamura K, Adachi M, Umene K, Kisu I, Tominaga E et al. 2017 Recent advances in the molecular mechanisms of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (Review). *Biomedical Reports* 7 123–127. (doi:10.3892/br.2017.929)
- Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, Karp JE, Le Beau MM & Crispino JD 2002 Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nature Genetics* 32 148–152. (doi:10.1038/ng955)
- Wenzler T, Boykin DW, Ismail MA, Hall JE, Tidwell RR & Brun R 2009 New Treatment Option for Second-Stage African Sleeping Sickness: In Vitro and In Vivo Efficacy of Aza Analogs of DB289. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 4185–4192. (doi:10.1128/AAC.00225-09)
- Whelan JT, Ludwig DL & Bertrand FE 2008 HoxA9 induces insulin-like growth factor-1 receptor expression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22 1161–1169. (doi:10.1038/leu.2008.57)
- Wiederschain D, Kawai H, Shilatifard A & Yuan Z-M 2005 Multiple mixed lineage leukemia (MLL) fusion proteins suppress p53-mediated response to DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry* 280 24315–24321. (doi:10.1074/jbc.M412237200)
- Williams LS, Demir Eksi D, Shen H, Lossie AC, Chorich LP, Sullivan ME, Phillips JA, Erman M, Kim H-G, Alper OM et al. 2017 Genetic analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in a large cohort of families. *Fertility and Sterility* 108 145–151.e2. (doi:10.1016/j.fertnstert.2017.05.017)
- Wilson A & Trumpp A 2006 Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews. Immunology* 6 93–106. (doi:10.1038/nri1779)
- Wilson R, Ainscough R, Anderson K, Baynes C, Berks M, Bonfield J, Burton J, Connell M, Copsey T, Cooper J et al. 1994 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368 32–38. (doi:10.1038/368032a0)

- Xu B, Geerts D, Bu Z, Ai J, Jin L, Li H, Zhang H & Zhu G 2014 Regulation of endometrial receptivity by the highly expressed HOXA9, HOXA11 and HOXD10 HOX-class homeobox genes. *Human Reproduction* 29 781–790. (doi:10.1093/humrep/deu004)
- Xu X, Cai N, Bao Z, You H, Ji J & Liu N 2017 Silencing Pre-B-cell leukemia homeobox 3 decreases the proliferation of human glioma cells in vitro and in vivo. *Journal of Neuro-Oncology* 135 453–463. (doi:10.1007/s11060-017-2603-9)
- Yamatoji M, Kasamatsu A, Yamano H, Sakuma K, Ogoshi K, Iyoda M, Shinozuka K, Ogawara K, Takiguchi H, Shiiba M et al. 2010 State of homeobox A10 expression as a putative prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 23 61–67.
- Yan J, Chen H-X, Desmond A, Silva A, Yang H, Wang H & Hua X 2006 Cdx4 and Menin Co-Regulate Hoxa9 Expression in Hematopoietic Cells. *PLoS ONE* 1 e47. (doi:10.1371/journal.pone.0000047)
- Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng Q-R, Fang Z, Nguyen M, Pierce S, Wei H et al. 2014 Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia* 28 1280–1288. (doi:10.1038/leu.2013.355)
- Yeh JE, Toniolo PA & Frank DA 2013 Targeting transcription factors: promising new strategies for cancer therapy. *Current Opinion in Oncology* 25 652–658. (doi:10.1097/01.cco.0000432528.88101.1a)
- Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, Omura S, Miyazaki T, Hachiya T, Ohno R & Naoe T 1996 Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. *Cancer Research* 56 2945–2948.
- Young T & Deschamps J 2009 Chapter 8 Hox, Cdx, and Anteroposterior Patterning in the Mouse Embryo. pp 235–255. (doi:10.1016/S0070-2153(09)88008-3)
- Zanzinger K, Schellack C, Nausch N & Cerwenka A 2009 Regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression on mouse inflammatory monocytes. *Immunology* 128 185–195. (doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03091.x)
- Zeng C, Wang H, Yu X, Yang L, Chen S & Li H 2015 Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq. *Science China. Life Sciences* 58 1282–1287. (doi:10.1007/s11427-015-4967-4)
- Zhang S, Zhu J, Chen G, Du X, Lu L, Zhang Z, Zhong H, Chen H, Wang Z, Berger R et al. 1996 Establishment of a human acute promyelocytic leukemia-ascites model in SCID mice. *Blood* 87.
- Zhang H, Morrone G, Zhang J, Chen X, Lu X, Ma L, Moore M & Zhou P 2003 CUL-4A stimulates ubiquitylation and degradation of the HOXA9 homeodomain protein. *The EMBO Journal* 22 6057–6067. (doi:10.1093/emboj/cdg577)
- Zhang H, Sicot G, Cui X, Vogel M, Wuertz CA, Lezon-Geyda K, Wheeler J, Harki DA, Muzikar KA, Stolper DA et al. 2011 Targeting a DNA Binding Motif of the EVI1 Protein by a Pyrrole–Imidazole Polyamide. *Biochemistry* 50 10431–10441. (doi:10.1021/bi200962u)
- Zhang H, Choksi S, Chen K, Pobeziinskaya H, Linnoila I & Liu Z-G 2013 ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Research* 23 898–914. (doi:10.1038/cr.2013.75)
- Zhu J, Nasr R, Pérès L, Riaucoux-Lormière F, Honoré N, Berthier C, Kamashev D, Zhou J, Vitoux D, Lavau C et al. 2007 RXR Is an Essential Component of the Oncogenic PML/RARA Complex In Vivo. *Cancer Cell* 12 23–35. (doi:10.1016/j.ccr.2007.06.004)
- Ziegler-Heitbrock HWL & Ulevitch RJ 1993 CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology Today* 14 121–125. (doi:10.1016/0167-5699(93)90212-4)
- Zon LI 1995 Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 86 2876–2891.
- Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, Magoon D, Qi J, Blatt K, Wunderlich M et al. 2011 RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 478 524–528. (doi:10.1038/nature10334)

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1

Targeting transcription factor binding to DNA by competing with DNA binders as an approach for controlling gene expression.

Mohamed Amine BOUHLEL, Mélanie LAMBERT and Marie-Hélène DAVID-CORDONNIER*

Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert (JPARC)-UMR837 INSERM, University of Lille and CHU of Lille, Team 4 « Molecular and Cellular Targeting for Cancer Treatment », Lille, F59045, France

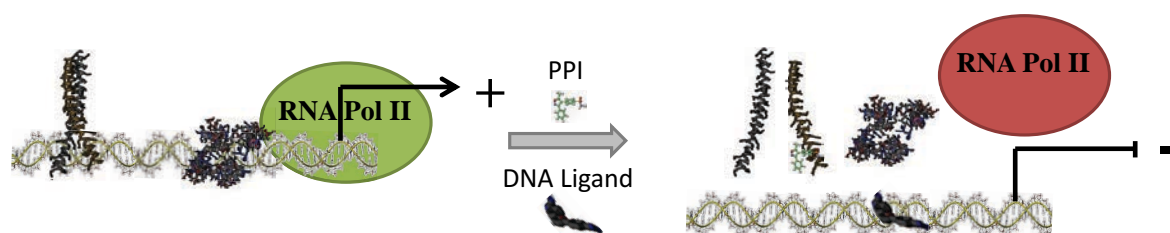
* Address correspondence to this author at the Centre de Recherches Jean-Pierre Aubert (JPARC)-UMR837 INSERM, Team 4 « Molecular and Cellular Targeting for Cancer Treatment », Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), Place de Verdun, F59045 Lille Cedex, France; Phone: +33 3 20 16 92 23; Fax: +33 3 20 16 92 29; E-mail: marie-helene.david@inserm.fr

Abstract

Transcription factors are recognized as the master regulators of gene expression. Interestingly, about 10% of the transcription factors described in mammals are up to date directly implicated in a very large number of human diseases. With the exception of ligand-inducible nuclear receptors, transcription factors have longtime been considered as “*undruggable*” targets for therapeutics. However, the significant breakthroughs in their protein biochemistry and interactions with DNA at the structural level, together with increasing needs for new targeted-approaches particularly in cancers, has changed this postulate and opened the way for targeting transcription factors. Along with a better knowledge of their specific DNA binding sequences by genome wide and high throughput sequencing assay, these informations make possible the potent targeting of the transcription factors by three approaches dependently of their mechanism of action. In this review, we discuss the different physicochemical interactions between the transcription factors and the DNA helix, and the protein/protein interactions within a transcription factor complex and their impacts on the DNA structure. In order to impair transcription factor activities, small molecules compounds can either act by direct interaction on the transcription factor, or by blocking the protein/protein interactions in a transcription complex, or by competing with the transcription factor itself and specifically targeting its cognate binding sequence. For this latter mode of transcription targeting, we pay special attention to the DNA intercalating, alkylating or groove binders for transcription factor/DNA binding modulation.

Graphical Abstract

Inhibiting transcription factor/DNA binding activity with protein/protein inhibitors (PPI) or DNA ligands.



Keywords

Alkylating drugs, Competition, DNA binding, DNA ligands, Gene expression, Groove binders, Intercalators, Transcription factors.

Introduction

Transcription factors are functional proteins that act as master regulators for an exquisite selective and cell specific regulation of the expression of different set of genes from a common genomic storage information. Such pinpointed regulation is responsible for the specific accurate development from a single common genomic package to a well-organized multi-cellular organism as part of specific progressive differentiation of cells in the course of embryogenesis and in response to external modifications in link for instance with cell to cell direct contacts or cytokines used as messengers. Both internal (genetic mutations) and external (xenobiotic, radiation, pathogens...) aggressions are associated with a cellular response that is mediated through an appropriate set of transcription factors activity on appropriate target genes. Understanding how transcription factors control accurate gene expression from a unique genetic storage system is crucial to understand how such transcription factor activity could be inferred when being deregulated in human pathologies.

In a general manner, such storage of information requires an accurate and precise conservation mode over the time. This is the case for DNA and computers for instance. However, if computers were developed based on a binary concept with full information stored as a base 2 system using 0's and 1's in each bit position, life has taken opportunities from a base 4 system consisting on the succession of the four bases adenine, cytosine, guanine and thymine (A, C, G and T). As a security, the bases are paired (A with T and C with G) to give a complementary strands within a DNA double strand helix, thus leading to a copy in the second chromatid, as would do a computer on live backup. In the case of computer storage-information, bits are grouped in octets to give 256 different combinations, whereas, if read as octets, the genetic message would propose 65536 different "words" composed of letters A, C, G and T. Octets are assembled in kilobits, megabits, terabits and so on, while, in the case of genetic information, the 4-base system for a genome of 3.4 billion base pairs corresponds to $4^{3400000000}$ possibilities. Computer information is stored as data ("bit stream") preceded by different "headers" (flags that precise the nature of the coded message, "coding" and "activation" flags, "read access protection" flags, length of the data, etc...) and followed by "trailers" that end the message. Common features are observed in genomic DNA in order to read the ~36,000 genes presents in around 3% of the genome and that encodes more than 100,000 proteins: (i) similarly to computer "bit stream", the coding region is identified between transcription start signals (like "coding flags" as "headers") and a poly-adenylation tail (like "trailers"); but with the difference that reading of the genetic information on the coding sequences is based on the triplet genetic code (64 different combinations in total) that converts the bases to the 20 different amino acids composing proteins; (ii) "activation flags" could be compared to consensus sites for specific DNA binding proteins such as general transcription factors (TATA-box, CAAT-box, GC-box), specific transcription factors that bind to enhancers (estimated to $\sim 10^6$ in human genome), structural and epigenetic signals, high mobility group proteins or insulators (CTCF) for instance [1-5]; (iii) epigenetic marks for condensed chromatin could be assimilated to "read access protection", and (iv), at last but not at least, the biggest part of the genome

(>95%) composed of the evolutionarily conserved non-coding DNA (the so-called “junk” DNA that may be compared to “unindexed pool of bits” in computing language) that probably contains many, still unknown, informations associated with different functions (multiple copies of genes such as for rRNA genes and Alu repeats, pseudogenes, mammalian interspersed or other medium reiterated repeats ...), including large number of transposable elements (retrotransposons, that may be compared to informatics viruses in computer language).

In order to correctly work, the “readers” or “copiers” of genetic information need therefore to have DNA-binding potencies that varies depending on their functions: poorly specific binding, such as histone/DNA, require less selective recognition than highly specific binders, such as transcription factors, that need stronger sequence specificity, particularly at the anchorage points, and/or specificity of the recognition as a function of the length of the covered DNA sequence. DNA transcription is the cellular process that requires the most accurate sequence-selective DNA binding [6-9]. Indeed, DNA transcription is precisely defined and spatiotemporally controlled in living organisms [10,11]. Very recently, the transcription initiation start (TSS) was evidenced to be much more complex than expected with two different transcription initiation mechanisms being used sequentially during embryonic development in zebrafish model: one TSS being a maternal-specific (inherited) TSS that is functional before the mid-blastula transition and that is associated with an active TATA-box; and the second TSS that is active at latter zygotic stage (*de novo*) that did not contained a TATA-box or other AT-rich signals (H-box at the expected -30 bp position but a C/GC/GA/TA/T GC-rich sites at -50 bp from TSS [12].

The basal transcription process itself is activated through a complex signaling network that links individual cells to external stimuli [13] in order to punctiliously induce or repress the transcription of a set of genes at a precise time for a precise duration. A large proportion of diseases among which cancer, diabetes, cardiac or neurodegenerative diseases is associated with transcription deregulations, either through direct implication of transcription factors or through epigenetic modifications of the physical accessibility of specific genomic regions. The fine regulation of open versus closed chromatin through epigenetic marks is another level of transcriptional regulation that will not be presented here and is already well illustrated in the literature (for recent reviews see [14-22]).

Around 2500 proteins are thought to bind DNA. A large proportion among them (~1500) is presumed to act as transcription factors. This large number means that nearly to 1/20th of the genome codes for transcription factors [23]. A recent study from Zhang et al. proposed that transcription factors in animals could be classified in 71 different families, with some of them being bigger than the others, such as zinc-finger C2H2, HLH, homeobox and bZIP families corresponding to ~60% of all transcription factors [23-24]. Among transcription factors, 164 (~10% of all transcription factors) are up to date directly implicated in 277 diseases (for instance, transcription factors represent 20% of the oncogenes in cancers and are implicated in one third of the developmental disorders) [23,25,26]. The transcription factors are organized in different families reflecting homologies in their DNA-binding sequence [27-28].

Transcription factors have long been considered as ‘*undruggable*’ targets for therapeutics. For a long time, nuclear receptors were the unique family of transcription factors considered as “*druggable*” because of clear ligand-binding pockets that presented accessible surfaces for drug targeting, limiting the targeting of transcription factor to hormonal and hormone-like treatments as for the treatment of acute promyelocytic leukaemia (APL) using the retinoid derivative *all-trans*-retinoid acid (ATRA) that binds to the fusion transcription factor PML-RAR α (see below).

The aim of the present review is not to focus on those well studied transcription factors activated by natural ligands but to get an insight on what could be done on the other transcription factors that lack activating ligands and that were for a long time rejected from drug discovery strategies for their supposed “*undruggability*”.

Fortunately, a better knowledge of their protein biochemistry and the increasing needs for new targeted-approaches have changed this postulate and opened new horizons to access transcription factors as therapeutic targets. Cancer is however still the most studied disease for transcription factor targeting as part

of their function in cellular proliferation and also of the convenient use of cancerous cultured cell lines for experimentations.

Studying the precise structural mode of transcription factor's DNA binding as well as the concrete knowledge of their interactions with other factors (transcription factors, co-factors, mediators, inhibitors...) allows us to accurately target their functions as gene regulators which have indeed major consequences on the drug discovery process:

- Knowing their precise DNA binding mode is of major interest to develop compounds as DNA binding competitors or as modifiers of steric conformation in order to dynamically block the protein in a giving orientation of the α -helices or β -sheets implicated in the DNA binding.
- Knowing their protein/protein interaction abilities is crucial for developing protein/protein interface inhibitors (either as small compounds, peptidic chains or peptidomimetics).

Transcription factors as master regulators

In order to regulate gene expression, transcription factors need to bind the DNA helix on their specific DNA binding sequence through their DNA binding domain. Based on DNA binding domain homologies, they are classified in different subgroups. Along with DNA binding domains, trans-activation and/or trans-repression domains confer to the transcription factors their specific activity, depending on the nature and the function of each domain, and are involved in the direct binding to the basal transcription complex comprising RNA polymerase or to different mediators as intermediates for binding to the basal transcription complex. Transcription factors can bind as homo- or hetero-dimers through a dimerization domain that can be either independent or intriguingly associated with the DNA binding domain. Finally, gene transcription is not the consequence of the activity of a single transcription factor but is the result of a combined action within a transcription factor complex. Each factor binds to its consensus binding site and interacts with other transcription factors and regulatory proteins leading to a "concerted activation" of the transcription. Inhibiting pivotal transcription factors could therefore be sufficient to abrogate gene expression.

In this view, both transcription factor/DNA and transcription factor/protein interactions are presented hereinto get an insight on how a transcription factor could be targeted.

Transcription factors at the protein/DNA binding level

Protein/DNA interactions are achieved through hydrogen bonding (either direct or indirect through water molecules) and by van der Waals contacts between the exposed specific amino acids at the appropriate nucleotide bases, either in the major and/or the minor groove, associated or not with more or less bending and kicking of the DNA helix and in a manner that is associated with water displacement [29].

Transcription factors mainly interact with the major groove of the DNA helix. This is the case for all DNA binding domains containing α -helices for leucine zipper coupled to helix-turn-helix (HTH), basic helix-loop-helix (bHLH), zinc finger, ETS, E2F, STAT, NF- κ B or P53 DNA binding domains (Figure 1).

Only a small proportion of transcription factor binds to the minor groove of the DNA helix and among those, the largest number interacts in both the major and minor groove. In this case, the binding occurs through an alpha helix interacting with the major groove with a further stabilization through an unfolded arm trapping the minor groove. This is the case for the zinc finger transcription factor GATA1, the histone-like containing transcription factor NF-H and both homeobox and POU transcription factors. For instance, the members of the large superfamily of homeodomain-containing transcription factors bind to the major groove through the 3rd α -helix of the homeobox (4th α -helix for the TALE derived domains) and in the minor groove using an unfolded N-terminal chain [37-39]. POU transcription factors share two DNA interacting domains: the POU homeobox (POUh) that interact with both the major and the minor groove and the POU specific domain (POUs) that only interacts with the major groove such as OCT-1 and BRN-5 (Figure 2A).

Because of the narrower and the deeper size of the minor groove as compared to the major groove, pure minor groove protein binders do not bind through α -helices, which present a too big steric hindrance, but require unfolded or β -sheets as for the integration host factor (IHF) or the TATA-box binding protein (TBP). This minor groove binding is associated with a strong DNA bending: more than 160° for IHF [46], 90° for the λ repressor [47], 180° for TBP [48,49] or 75 to 110° for HMG-boxes. By contrast, HMG-I/H DNA binding domain do not induce excessive constrains but binds the minor groove though an unfolded arm that smoothly fit in the narrow minor groove (Figure 2B).

In terms of DNA torsion, the major groove binding domains bHLH, zinc fingers and leucine zippers induce a limited or no bending of the DNA structure whereas HTH induce small DNA bends [47]. The only case of α -helix containing DNA binding domain that interacts directly with the minor groove is the HMG-box containing proteins that occurs only as part of a strong bending of the DNA (for instance $\sim 75^\circ$ for SRY [50]; 107° for LEF-1 [51]; $\sim 80^\circ$ to 100° for HMGB1/B2 [52]). This DNA bending increases the width of the minor groove so that the peptidic helix would have enough room to fit in and to make strong contacts. Other DNA intercalation processes may also occur with some other transcription factors, such as for the HMG-like protein SRY, that partially intercalates between adjacent base pairs through binding in the minor groove and induces the strong sharp bend of the DNA [53], or for RNA Pol II that intercalates tyrosine residues [54].

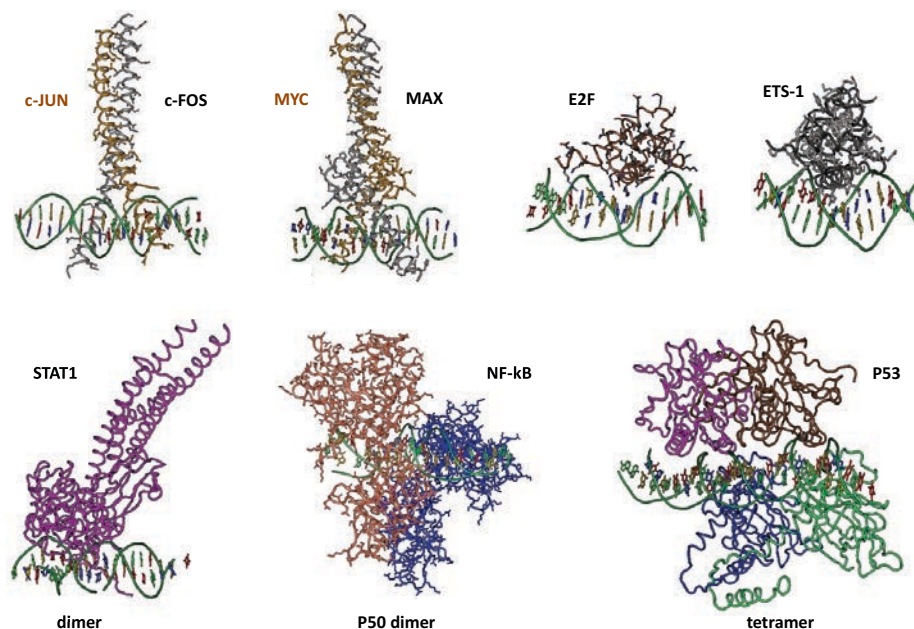


Figure 1. Major groove DNA binding transcription factors. Crystal structures of the leucine zipper heterodimeric transcription factor AP-1 (c-FOS/c-JUN, MMDB 72084, PDB 1FOS, [30]), the basic helix-loop-helix/leucine zipper DNA binding domain of the heterodimer MYC/MAX (MMDB 74091; PDB 1NKP [31]), the specific DNA binding domain for E2F (MMDB 71730, PDB ID 1CF7 [32]) and ETS (MMDB 73746, PDB 1K79 [33]) families, as well as of STAT1 (MMDB 71645, PDB 1BF5 [34]) and NF- κ B (p50) (MMDB 74291, PDB 1SVC [35]) homodimers and P53 tetramer (MMDB 95272, PDB 3T58 [36])

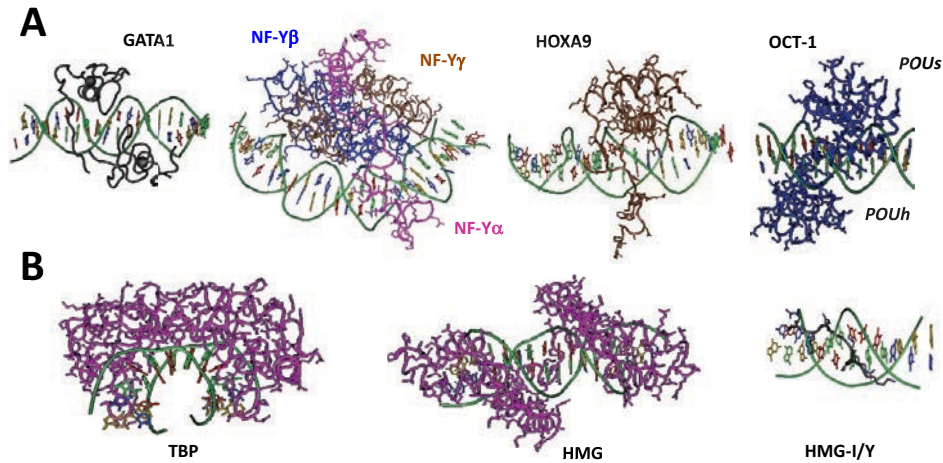


Figure 2: Transcription factors that bind the minor groove of the DNA helix. A. Crystal structure of the major and minor groove DNA binders. The zinc finger protein GATA1 increases the size of the major groove (MMDB 105497, PDB 4HCA [40]). The histone-like DNA binding domain of the NF-H transcription factor complex with NF-Y α that binds in the minor groove whereas NF-Y β and NF-Y γ bind in the major groove and trap the DNA helix around the complex as does the histone complex, showing a large bend of the DNA helix (MMDB 107141, PDB 4AWL [41]). The homeobox of HOXA9 (MMDB 74185, PDB 1PUF [39]) and the POU-domain of OCT-1 (with POU s and POU h DNA binding domains) bind as specified in the text (MMDB 49450, PDB 1HF0 [42]). **B.** Crystal structure of pure minor groove binding transcription factors. Both TBP (MMDB 74310, PDB 1TGH [43]) and HMG-box (MMDB 53300, PDB 2GZK [44]) induce strong DNA bending whereas the HMG-I/H domain (MMDB 53112, PDB 2EZF [45]) does not induce strong modification of the DNA helix.

During the last decade, global genome-analyses associated with next-generation sequencing, such as chromatin immunoprecipitation coupled to sequencing (ChIP-seq) [55-58], DNase-seq [59-62] or high-throughput SELEX [63-65] as well as the emergence of new bioinformatics tools and platforms [24,66-71] have greatly enhanced our knowledge on DNA binding preferences of transcription factors *in vivo* and subsequent implications in pathologies or development [72-74]. For instance, Knoepfler and collaborators recently evidenced two new consensus binding sites for the zinc finger transcription factor MIZ-1 based on Bind-n-seq, ChIP-seq fine analysis and MEME-ChIP analysis [75].

Some of the transcription factors act in a redundant manner on the same binding site. This is notably the case for the following transcription factor super-families: activator protein-1 (AP-1) (JUN/FOS) [76], E2F [77], HOX [78-80] and ETS [81-83]. Similarly, a co-occurrence of EBF1 with nuclear factor-kappaB (NF- κ B) was found in the proximal peaks of ChIP-seq targeting NF- κ B in embryonic stem cells, hepatocytes, lymphocytes and human leukemia cells and could explain the normal progression of B cell development, as expected for both EBF1 and NF- κ B [84]. As another example, PLAGL1 DNA binding motif was enriched in c-MYC sequencing peaks revealed by ChIP-seq experiments performed in 6 different human leukemic or solid tumor cell lines [84], both of PLAGL1 and c-MYC were implicated in apoptosis and cell cycle arrest. PLAG1 was also found associated with SP1 DNA binding in the regulation of p21WAF1 [85].

Finally, the access to their DNA binding sites is dynamically regulated in a manner that is dependent of both the state of the chromatin and the action of pioneer transcription factors. For instance, the state of nucleosome modeling is governed by specific ATP-dependent remodeling complexes associated with local disruption of nucleosome structures [86]. Pioneer transcription factors are the first on-site transcription factors that have the ability to locally access the condensed chromatin and thus to initiate the recruitment of secondary factors [87, 88]. Among those are FOXA1 [89], and more generally FOXA family, as well as GATA4 for estrogen receptors which are implicated in hormone-dependent cancers [90-91], GATA2 for androgen receptors in prostate cancer [92-93], OCT4, SOX2 and KLF4, that bind to closed chromatin, are pioneer transcription factors implicated in stem cell pluripotency [94-96] or C/EBP α that may prime the chromatin to give access to protein complexes, such as HOXA9/MEIS1, for acute myeloid leukemia

initiation and maintenance [97-98] or the master hematopoietic regulator PU.1 on macrophage-specific enhancers or for B-cell orientation during hematopoietic differentiation [99-100].

Hence, these pioneer transcription factors recruit other proteins to fully open the chromatin and give access to other transcription factors.

Transcription factors at the protein/protein level

Further complexity in transcription factor DNA binding selectivity arises from the diversity of co-factors and cooperative transcription factors that modulate both sequence-selectivity and site affinity [60]. This has been shown for HOX/PBX/MEIS complexes, each giving a different consensus binding-site [101,102] to thus interact in different conformations with the basal transcription complex [103].

The nature of the collaborators can also affect the function of a transcription factor, as it has been shown for the ETS-family transcription factor PU.1 which binds DNA along with OCT2, E2A, PAX5 and EBF1 during B-cell development but with C/EBP and AP-1 family transcription factors during macrophages development and function [104-105].

Similarly, transcription factors can bind both directly and indirectly to the DNA, such as MYC, NF-E2, E2F4 and TBP [60]. The ratio between direct and indirect binding is variable within the transcription factors and is dependent of the cellular context, relative to the expression level of the direct DNA protein binder associated with indirect binding.

The precise identification of the genomic sequences occupied by primary transcription factors (direct binding) and by secondary transcription factors (indirect binding) takes advantage from ChIP-seq analysis using the latest advances in bioinformatics, and from further validation using molecular and cellular approaches.

Some other transcription factors present more indirect, or cooperative, than canonical binding, such as E2F1, for which 4782 out of the 6248 (more than 75%) identified sequences by ChIP-seq analysis did not contain the canonical E2F1 binding motif, STAT1 that mainly binds the DNA through OCT4 in mouse embryonic stem cells [106]. Other transcription factors present indirect binding through another transcription factor, such as MYC, that interacts with MIZ-1 or NF-H/DNA complexes to activate or to repress gene expression HOXA9/MEIS1 through, for instance, C/EBP α [97]; CREB [107]; NF κ B for which 90% of the direct target genes contain non-canonical binding sites [108] or P53 [109].

Targeting transcription factors

The main question in order to develop a strategy altering a transcription factor activity is how could it be targeted?

As part of their mechanism of action, several approaches could be envisaged to impair transcription factor's activities:

First of all, functional inhibition could be achieved by a conformational blockade at the protein level through direct action on the transcription factor itself.

A second mode of inhibition at the protein level is to block protein/protein interactions implicating the transcription factor of interest.

A third approach would be to inhibit transcription factor/DNA binding by using small compounds acting as DNA ligands to compete for the transcription factor interaction with its cognate sequence.

Finally, the last possibility could be to directly inhibit the expression of the targeted transcription factor ... but this latter mode of action supposes to interfere with the transcription factors that regulate this target transcription factor, and thus to use one of the three previously cited options.

Direct transcription factor binders

Direct binding of a compound to a transcription factor is a commonly used approach in laboratories, notably the tetracycline-induced control of transcription. The Tet-ON and Tet-OFF gene switch systems are indeed based on the allosteric binding of the antibiotic tetracycline to TetR or rTetR to respectively block or allow their DNA binding propensities in a drug-dependent and reversible manner [110]. Direct interaction of a drug with transcription factors is also a common characteristic of hormone and steroid nuclear receptors and this property was used for a long time to modulate their DNA binding properties in a therapeutic view. For instance, direct binding of *all-trans*-retinoid acid (ATRA) to the chimeric transcription factor PML-RAR α (Figure 3A) inhibits its binding to DNA and prevents the recruitment of co-repressors that block the transcription of genes implicated in the hematopoietic differentiation process in acute promyelocytic leukaemia (APL). Through this transcription factor targeting, treatment of APL is up today the only differentiation approach in cancer therapy [111].

RNA polymerase presents a flexible “*switch region*” to clamp the DNA helix [112] that could be blocked in an open orientation using small compounds (Figure 3B). This interaction has been shown for the natural α -pyrone myxopyronin B [113] and for other compounds more recently identified, such as derivatives of the 5-phenyl-3-ureidothiophene-2-carboxylic acid [114,115], holomycin and myxopyronin hybrid inhibitors [116,117], ripostatins and lipiarmycin [118] or the myxobacterial isolated molecule coralpyronin A that is currently undergoing preclinical evaluation [119].

New compounds were recently developed to target transcription factors but it is not clear yet whether they act through binding to the transcription factor or whether they affect the protein/protein interactions, as for the 2,2'-[[Dihydro-2-(4-pyridinyl)-1,3(2H,4H)-pyrimidinediyl]-bis(methylene)]bis[N,N-dimethylbenzenamine, GANT61 (Figure 3C), targeting the zinc finger 2 and 3 of the DNA binding domain of GLI1 [120]. GANT61 is active on GLI1 and GLI2 but not on other zinc finger family members. It blocks GLI1-regulated genes and megakaryocytic differentiation [121,122], induces apoptosis in gastric cancer, adult T-cell leukemia, Ewing sarcoma, biliary tract cancer, lung cancer and fibrosis models, or autophagy in pancreatic ductal adenocarcinoma and some neuroblastoma cells, and prevents cellular migration in osteosarcoma and ovarian cancer invasion [122-126].

Recently, the 4-[(3E)-3-[(4-nitrophenyl)-methylidene]-2-oxo-5-phenylpyrrol-1-yl] benzoic acid (inS3-54, Figure 3D) was selected for its ability to directly bind to STAT3 DNA binding-domain. The transcription factor STAT3 is constitutively active in castration-resistant prostate cancer in which it represents a promising target. InS3-54 directly blocks the interaction between STAT3 (but not STAT1) and its target DNA sequence as evidenced using EMSA. InS3-54 does not bind to DNA but to STAT3 DNA binding domain through a non-alkylating mode, without affecting STAT3 homodimerization and phosphorylation. Treatment of human lung or breast cancer cell lines with inS3-54 resulted in an induction of apoptosis and a reduction of cell migration and invasion, in correlation with reduced MMP-9 expression, a STAT3 downstream target. Moreover, inS3-54 inhibits STAT3 binding to the chromatin, particularly on cyclin D1 (CCND1) and Twist promoters as evidenced by ChIP experiments [129]. As another mechanism of action implicating irreversible bonding, C48 (NSC-368262) alkylates Cys468 of STAT3 in the DNA binding domain and being involved in its direct interaction with DNA. Consequently, C48 inhibits the DNA binding activity of STAT3 homodimer and, to a lesser extent, STAT3/STAT1 heterodimer but not STAT1 homodimer [130]. Very recently, the fungal metabolite galiellalactone was also identified as an inhibitor of STAT3 DNA binding through covalent bonding of its α,β -unsaturated lactone. Galiellalactone makes covalent bonding on the thiol groups of both the reactive Cys367 and Cys468 in the DNA binding domain, and with Cys542 in the linker domain [131]. In the same transcription factor family, STAT5 is also inhibited through direct interaction of a 12 amino-acid containing peptide aptamer to its DNA binding-domain at the dimer interface with the DNA helix, thus inhibiting protein/DNA complex formation and subsequent target gene expression and proliferation of prostate (PC3) or breast (A431) tumor cell lines [132].

The same mechanism is also shared by VPC-14428 and VPC-14449 (Figure 3E), two compounds specifically designed to selectively bind an accessible pocket of the androgen receptor (AR) DNA binding

domain, a new drug-target site against AR proposed as an alternative to the androgen binding pocket in the ligand binding domain. Those compounds induce AR inhibition by blocking DNA binding and subsequent transcriptional activity of both the full-length and splice variant forms (lacking the ligand binding domain) of AR. The inhibition of DNA binding was addressed using binding approaches (EMSA, Surface Plasmon Resonance affinity measurements), functional test (luciferase and ChIP assays on AR-regulated enhancers such as PSA and FKBP5) in the androgen-dependent prostate cancer cell line LNCaP and the corresponding antitumor animal models [133].

The ETS-family transcription factor ETV1, implicated in fusion proteins in both prostate cancer and Ewing sarcoma, is targeted by the 1,3,5-triazine BRD32048 compound that directly binds ETV1 *in vitro* ($K_D=17\mu\text{M}$) and inhibits its transcriptional activity, as evidenced using SPR and luciferase assays on MMP1 promoter, and cancer cell invasion and proliferation in ETV-1 dependent cell lines LNCaP (prostatic) and 501mel (melanoma) at 20-100 μM range but not in the ETV1-independent prostatic cell line PC3. As part of its mechanism of action, BRD32048 alters ETV1 acetylation by the histone acetyltransferase E1A binding protein p300, leading to subsequent degradation of ETV1 [134].

Another original strategy is to directly target P53 which results in its transcription factor activation in the nucleus. This is the case of ellipticine that directly targets P53 protein leading to an increased nuclear localization of wild-type P53 (WT-P53) and to an induced transactivation of p21 promoter. Ellipticine (Figure 3G) also binds to mutated P53 (mut-P53) and restores its normal conformation and activity [135]. Interestingly, evaluation of ellipticine activity in WT-P53 or mut-P53 human cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cell lines showed apoptotic effect and DNA damage activity (increased levels of $\gamma\text{-H2AX}$) in WT-P53 and G245S mut-P53 but not in R196Stop mut-P53. Moreover P53 activity was partially restored in G245S mut-P53 but not in R196Stop-P53 (null-P53) cell line. But, in CTCL, ellipticine apoptotic effect appeared to be independent of P53 status as evidenced using siRNA directed against P53 [136] and may act through its other activities: DNA intercalation and topoisomerase II poisoning or DNA alkylation [137]. Such reactivation can also be achieved with CP-31398, RITA, STIMA-1 or PRIMA-1 (Figure 3G) to restore WT-P53, through binding to mut-P53 by reversible or covalent binding [138-140]. The cellular consequences could be different with senescence in RITA-treated head and neck cancer cells [141] but apoptosis in PRIMA-1-treated pancreatic cancer cell lines [142]. PRIMA-1 is active in mut-P53 positive pancreatic cancer cells PANC1 and BxPC3 in a manner that is associated with enhanced chemosensitivity toward cisplatin (alkylating drug), gemcitabine (antimetabolite) or doxorubicin (topoisomerase II poison) but not irinotecan (topoisomerase I poison) [142] and shows *in vitro* synergistic effect with daunorubicin on cells isolated from acute myeloid leukemia (AML) patients [139]. APR-246 (PRIMA-1Met, Figure 3G), a derivative of PRIMA-1, induces apoptosis and affects cellular proliferation in mut-P53 expressing small cell lung carcinoma [143]. MDM2 E3 ubiquitin ligase activity, that is essential in P53 degradation through the proteasome, could also be an alternative way to target P53/MDM2 pathway as proposed using deazaflavins [144] or, more recently, SP141 which binds to MDM2 to favor its auto-ubiquitylation and subsequent degradation by the proteasome [145].

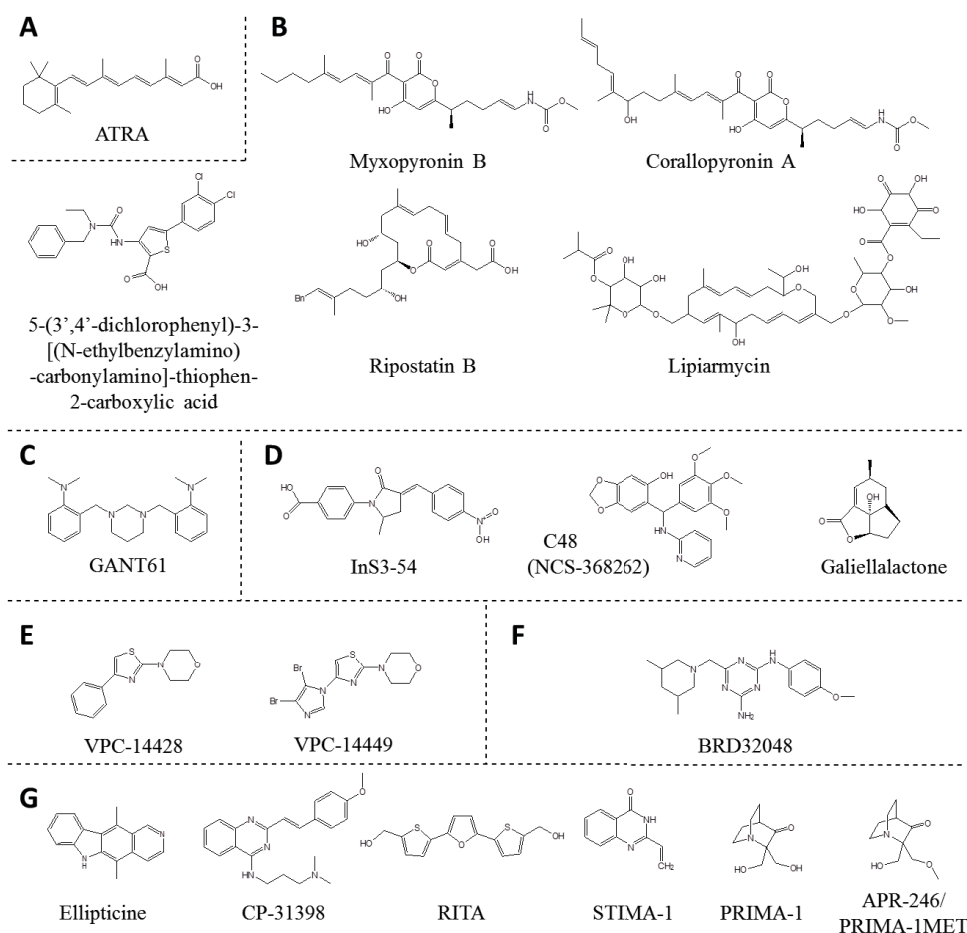


Figure 3. Direct transcription factor binders. Structure of direct protein ligands for PML-RAR α (A), RNA polymerase (B), GLI-1 (C), STAT3 (D), the androgen receptor (E), ETV1 (F) or P53 (G).

Protein/protein inhibitors for transcription factors

Targeting the interaction of transcription factor with several other proteins could be of interest: transcription factor with the same (homodimers) or another (heterodimers) transcription factors interaction, interaction of transcription factor with co-factor/co-activator/mediator or repressor, interaction with a general transcription factor from the basal transcription machinery, proteins implicated in their nuclear translocation, trapping for staying in the cytoplasm or for degradation process.

Protein/protein inhibitors (PPIs) belong to different subclasses of inhibitors: small compounds, peptidomimetics or stapled helix peptides.

Such inhibition of transcription factor/protein binding is well studied for MYC/MAX (transcription factor/transcription factor binding), P53/MDM2 (transcription factor binding to its negative regulator resulting in cytoplasm sequestration and degradation of P53) or HIF heterodimers (transcription factor/transcription factor or transcription factor/co-factor binding) presented here as examples.

Inhibiting P53/MDM2 interaction

P53/MDM2 PPIs are somehow the most studied low molecular weight compounds as PPIs (Figure 4A) with precise description of their binding to MDM2 in the P53-binding pocket (for recent reviews 146,147). Such binding aims to block interaction between P53 and MDM2 through three hydrophobic amino acids Phe19, Trp23 (that interacts with Leu53 of MDM2) and Leu26 of P53, all three being considered as a triad pocket. Based on the implication of P53 in cancer, developing P53/MDM2 PPIs are of major interest for

pharmaceutical companies. The first developed PPI is the chiral (–)Nutlin-3 developed by Roche. It presents a bromophenyl ring deeply hooked in Leu26 pocket, an ethyl ether arm positioned in Phe19 pocket while an imidazoline backbone lies in place of P53 alpha helix. Other structures such as the spiro-oxindoles (MI-43, MI-63 and MI-219) also target Phe19 and Leu26 pockets while benzodiazepine scaffolds, developed by Johnson and Johnson's, bind through each of the three amino acids pockets but may also interact with Val93 on MDM2 and UGI series to Leu26 through its benzyl ring, Phe19 through its the tert-butylamide substituent and π - π stacking between the di-fluoro-benzylamine and His96 of MDM2. Roche is also currently developing pyrrolidine analogues among which RG7388, developed for clinic, that contacts Phe19, Trp23, Leu26 and His96 [148,149]. AMGEN developed piperidinones, such as AM-8553, that contacts Phe19, Trp23 and Leu26, and more recently AMG232, an orally bioavailable derivative for clinical use [150,151], and the morpholinone AM-8735 with similar mode of binding [152]. Similarly, Sanofi developed SAR299155, Novartis CGM097 and Merck MK-8242 for MDM2, MDMX, HDM2 and/or HDMX interaction at the P53 binding pocket [153]. Beside low molecular weight compounds, peptidomimetics and peptide staples are also developed [154-156].

Inhibiting MYC/MAX interaction

MYC and MAX belong to basic helix–loop–helix leucine zipper transcription factors. The special surface of those long helices, which interactions led to a globally rigid structure, makes difficult a specific access, as an anchorage surface, for low molecular weight compounds because of the lack of typical binding pocket (Figure 1). However, several structures were synthesized and efficiently perturbed MYC/MAX heterodimerization. This is the case for the planar compounds (“credit card”-like flat structures) NY2267 (Figure 4B), even if this compound was not selective for MYC/MAX it was also active on the other basic helix–loop–helix leucine zipper transcription factor dimers JUN/FOS [157]. A better targeting surface would be the bHLH domain that binds to the DNA and presents a deep anchorage surface for drug binding and drug design. Among those bHLH targeting compounds, the pyrazolo[1,5- α]pyrimidine derivatives Mycro1 and Mycro2 (Figure 4B) were more selective to MYC/MAX heterodimers [158]. Other compounds, such as 10058-F4 and 10074-G5 (Figure 4B), bind respectively the helix 2-leucine zipper junction at residues 402 to 142 and the N-terminal part of helix 1 of the bHLH portion (amino acids 363 to 381) of the Myc DNA binding domain, and the new related lead compound SF-4-017 [159]. Particularly, 10058-F4 promotes differentiation in microenvironment-mediated drug resistant acute myeloid leukemia cells which are associated with c-Myc overexpression [160,161].

Similarly to the P53/MDM2 pathway, indirect targeting may be obtained using MAX stabilizers, such as NSC13728, that bind the bHLH/leucine zipper junction and specifically stabilize MAX homodimers towards MYC/MAX heterodimers, with ~800 fold decrease of MAX/MAX dissociation constant [162]. Other indirect MYC control consists of the targeting of its interactions with other proteins, such as PTEFb that links to BRD4 in a complex implicated in chromatin opening control through histone lysine acetylation. This was achieved using the triazolobenzo-1,4-diazepines (+)-JQ1 and I-BET-762 as well as the dimethylisoxazole derivative I-BET-151 acting as lysine acetylation mimetics targeting the bromodomain of BRD4, thus releasing PTEF-b for activating the basal RNA Pol II transcriptional complex [163].

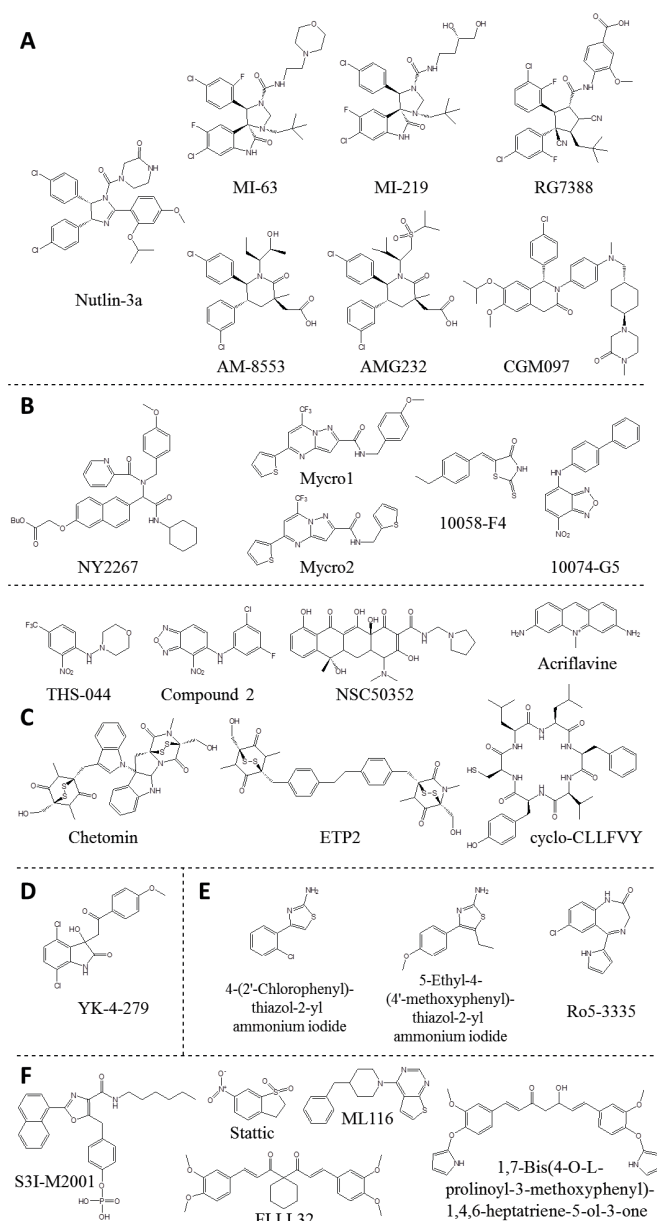


Figure 4. Structure of protein/protein inhibitors. Examples of PPIs against (A) P53/MDM2, (B) MYC/MAX, (C) HIF-1 or -2 heterodimers, (D) EWS-FLI1/RPA interactions, (E) RUNX1/CBF β heterodimer and (F) STAT3 homodimer.

Inhibiting HIF heterodimerization

Scheuermann et al. [164,165] have selected artificial ligands that act as antagonists through their binding to a large hydrophobic internal cavity within PAS-B domain of the basic-helix-loop-helix-PAS heterodimerization domain of HIF-2 α . THS-044 was found to stabilize the PAS-B domain in its folded state through a 100-fold higher binding to the β -sheet conformation rather than unfolded protein, thus protecting HIF-2 α from protease degradation. Similar structural binding is observed for “Compound 2”. *In vitro*, THS-044 and “Compound 2” (Figure 4C), as a 3-chloro-5-fluoroaniline-benzoxadiazole derivative, subsequently inhibit HIF-2 α /ARNT heterodimerization. Disruption of protein/DNA binding was also evidenced using chromatin immuno-precipitation of HIF-2 but not HIF-1 on the EPO enhancer in Hep3B cells pre-treated with “Compound 2” under hypoxic conditions. As a result, pre-treatment for 2 hours of Hep3B cells with 1 or 10 μ M of “Compound 2” leads to a marked reduction of EPO expression, used as a HIF-2 surrogate marker as evidenced using RT-PCR. The binding of “Compound 2” requires the Ser304 residue of the PAS-B domain of HIF-2 α . Indeed, methionine substitution introduces an aliphatic side chain

in the internal pocket without affecting its global folding and ARNT binding strongly affects the orientation of “Compound 2” in the cavity to consequently reduce its binding affinity [166].

In a similar approach, inhibitors of HIF-1 α / β interaction were developed to target their PAS-A domain, such as NSC50352 [167], or the PAS-B domain of HIF-1 α such as the cyclic hexapeptide cyclo-CLLFVY [168] (Figure 4C). Those compounds are inactive on the PAS-B domain of HIF-2 α , by contrast with acriflavine that target both HIF-1 α and HIF-2 α PAS-B domains [169]. Acriflavine also inhibits the promoter binding and/or expression of both HIF-1 and HIF-2 target genes (VEGF, PDK1, GLUT1) under hypoxic conditions and presents potent anti-tumor activities on prostatic PC-3 xenografts in mice, associated with reduced expression of VEGF and GLUT1 within xenografts from treated versus untreated mice.

The HIF-1 α / β heterodimer also interacts with p³⁰⁰CBP to transactivate gene expression. The monomeric epidithiodiketopiperazines gliotoxin and ETP3 as well as the dimeric epidithiodiketopiperazines chetomin, gliotoxin, chaetocin or ETP2 inhibit HIF1/CBP interaction by a mechanism suggesting that they interfere with the zinc-binding site of CBP that is required for HIF1/CBP binding [170]. Those inhibitors decrease VEGF expression and secretion as well as the lactate dehydrogenase and enolase1 expression and are active in both cells and animals [171,172]. When hydroxylated on Pro564 under normoxia, HIF-1 α also forms a protein complex with the von Hippel–Lindau protein–Elongin B–Elongin C (VBC) complex in the cytoplasm, keeping HIF-1 α as a latent transcription factor but also leading to its ubiquitylation and subsequent degradation by the proteasome. As an indirect approach, series of peptide inhibitors were developed to target the interaction between hydroxylated HIF-1 α and VBC in order to prevent the HIF-1 α degradation and to subsequently favor its nuclear translocation as part of a HIF1/CBP complex [173]. Those peptides (around 20 amino-acids) target the interaction between HIF-1 α hydroxylated C-terminal oxygen dependent domain (CDD) and VBC containing the hydroxyproline instead of residue Pro564.

Inhibiting ETS family transcription

Many other transcription factors, from different families, were evaluated at the protein/protein interface with different success. Examples of other PPI targeting transcription factor implicated in cancer are:

- YK-4-279 (Figure 4D) that targets the oncogenic EWS-FLI1, EWS-ERG and EWS-ETV1 fusion transcription factors generated after chromosome translocation in the large majority of Ewing sarcomas [174,175]. It is known to inhibit the interaction of those ETS family members with the RNA helicase A, as part of their oncogenic activities in Ewing sarcoma [174]. Particularly, the (*S*)-enantiomer is active in different molecular, cellular and animal models, inducing cell apoptosis and reducing tumor size of Ewing sarcoma xenografts [175,176]. In prostate models, YK-4-279 is also active on ERG and ETV1 and decreases the expression of PLAU, PLAT and ADAM10, as ERG-regulated genes, and the ETV1-regulated gene MMP13 [177]. Very recently, it shows growth and metastasis inhibition of the LNCaP prostate cancer model in SCID-beige mice xenografts, together with reduced expression of the ETV1 target genes MMP7, FKBP10 and GLYATL2 in YK-4-279 treated mice [178].

- PPI for CBF β binding to RUNX1 (Figure 4E), such as 4-(2'-chlorophenyl)-thiazol-2-yl ammonium iodide, 5-ethyl-4-(4'-methoxyphenyl)-thiazol-2-yl ammonium iodide [179] and the benzodiazepine Ro5-3335 [180], are small molecular weight compounds evaluated as allosteric inhibitors using FRET and ELISA-based assays. Because CBF or RUNX1 are implicated in translocations or inversions in approximately 25% of adult AML and pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL), these compounds were evaluated for cell cytotoxicity in leukemia models, such as ME-1 (CBF β -MYH11 fusion), KASUMI1 (RUNX1-ETO), REH (TEL-RUNX1) human acute leukemia cell lines, being more sensitive than HL60, Kasumi-6 or RS4-11 as non-CBF β or -RUNX1 cell lines.

- One of the PPIs for STAT3 homodimerization (Figure 4F), a transcription factor mainly present in the cytoplasm, is the phosphorylated S3I-M2001, an oxazole-based peptidomimetic, that mimics and binds the STAT3 Src homology 2 (SH2) domain. S3I-M2001 disrupts active STAT3 homodimers (and to a lesser

extend STAT1/STAT3 heterodimers) through the docking of the phosphor-tyrosine moiety in the hydrophobic pocket formed by Arg609, Ser611 and Ser613, as well as the interaction of the naphthalene ring with the Ile634 and the contact between the lipophilic hexyl substituent with the hydrophobic groove formed by Trp623 and Phe716 [181]. Such interference affects STAT3 binding to DNA as evidenced by EMSA. At the cellular level, S3I-M2001 inhibits the migration and invasion of human breast cancer (MDA-MB-231) and pancreatic cancer (Panc-1) cellular models and shows anti-tumor activity in mice using human breast tumor xenografts. Stattic is another inhibitor of STAT3 dimerization that acts by covalent bonding through Michael addition, possibly at the nucleophilic amino acids in or around the SH2 domain. Stattic blocks STAT3 phosphorylation and subsequent nuclear translocation. It increases apoptosis in breast cancer cell lines and mice models [182,183] and is also active against glioma cell migration, colon cancer-initiating cells, and *in vivo* in head and neck squamous cell carcinoma mice models. Since STAT3 over-expression is implicated in chemoresistance of 5-fluorouracil (5-FU) treated colorectal cancer cell lines, Stattic sensitizes colorectal cancer cells and tumors in mice subjected to chemotherapy (5-FU) and/or radiotherapy [184]. Similar observation was shown upon radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma and in nasopharyngeal carcinoma for radiation or cisplatin treatment [185]. More recently, ML116 [186], an inhibitor of STAT3 phosphorylation through a yet unclear mechanism, presented only poor modulation of STAT3-regulated luciferase expression and failed to present potent antitumor activities on brain cancer animal models [187]. Finally, the curcumin-proline conjugate (1,7-Bis(4-O-L-prolinoyl-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatriene-5-ol-3-one) was predicted to be a potent inhibitor of STAT3 based on molecular docking to the STAT3-SH2 domain with comparison to Stattic and LLL32, another curcumin analogue [188]. The proline groups of this curcumin-proline conjugate bind to Glu530 and Val637, whereas the peptide portion makes polar interaction with Lys591, Arg-595 and Arg609. Additional contacts occur between both the hydroxyl and keto groups of the central linker and Ser636.

Among others protein/protein interfaces that are currently targeted is also BCL6 homodimerization in diffuse large B-cell and follicular lymphomas, E2F4/DP2 in prostate carcinoma, or NOTCH1/MALM1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia.

Besides the multiple modes of action already evidenced for curcumin, this yellow polyphenol of the spice turmeric *Curcuma longa* was above implicated as conjugates in the inhibition of protein/protein interaction on STAT3. Curcumin itself was shown to bind directly, but weakly, the DNA helix in the minor groove and RNA [189,190]. It was shown to interfere with SP1 DNA binding/transcriptional control in cellular models. This was evidenced on the SP1-binding element present in the *Pokemon* promoter using ChIP. Curcumin thus decreased *Pokemon* promoter activity as visualized using luciferase assays and reduced *Pokemon* expression in the A549 lung adenocarcinoma cell line [191]. This was also evidenced at the mRNA expression level and using luciferase assays for other SP1 downstream genes and controlled promoters such as ADAM10, calmodulin, EPHB2, HDAC4 and SEPP1 [192]. However, due to poor direct DNA binding propensity as recently confirmed, it is more likely that such transcription factor inhibition is not associated with direct DNA binding in a competition mode but other mode of action, maybe associated with nucleolar localization [193]. Curcumin also indirectly induces JNK phosphorylation, leading to an activation of JUN-D, a transcription factor of the AP1 complex implicated in the expression of the tumor suppressor gene DnaJ-like heat shock protein 40 (HLJ1), leading to an inhibition of cell invasion and metastasis in a lung adenocarcinoma model [194].

Searching for PPI is a very active research area with a multitude of protein/protein interactions that are evaluated. The interaction of a PPI may occur when the complex is bound to DNA or unbound as a free complex inhibited either in the nucleus or in the cytoplasm which represents a unique advantage of this targeting strategy.

In order to target a transcription factor whatever its protein partner is or a transcription factor that acts as a monomer, inhibiting directly its protein/DNA interface is of interest. Moreover, it might be that some transcription factors of the same family may alternatively occupy a response element and a single inhibition would not be sufficient. In those cases, targeting a precise sequence on the DNA to block its access to transcription factors is another interesting strategy developed below.

Transcription factor/DNA binding inhibitors

Modern chemistry allows the development of a large diversity of original molecules specifically designed to bind DNA at the transcription factors binding sites. Low molecular weight compounds bind the DNA helix and compete with transcription factors by three main modes: Intercalation, alkylation or groove binding.

In the nucleus, the DNA helix is mainly organized as a right-handed helix, with imperfect symmetry but a complex geometry responsible for the internal curvature and flexibility of the DNA. DNA helix rotations occur over the three geometrical axes leading to multiple structural movements: twist, tilt, roll or slide effects of the base-steps depending on the nature of the successive bases along the helix, but also indirectly from the presence and nature of salts. For instance, the degree of propeller twist is higher in A•T than in G•C base pairs because of differences in hydrogen bonds between base pairs that allows better overlapping of the bases from van der Waals stacking. Therefore, each type of di-nucleotide in the helix (NpN) presents a different set twist, tilt, roll or slide values that confer a particular configuration to the various steps. Moreover, the twist, tilt, roll or slide values are also dependent of the nature of both 5'- and 3'-bases, thus increasing the variability in the global structure conformation of the DNA helix. For instance, the twist angle is around 30° for ApT step and increases to 40° for TpA step, resulting in a DNA with a zig-zag conformation and containing alternative H/R and R/H base pairs [195]. Similarly, runs of adenines have typical propeller twist with poor changes in the twist, roll and slide values, leading to more rigid DNA with a full helix turn obtained with only 10.0 base pairs for A-tracks instead of 10.6 for mixed-bases DNA [196]. In the same line, TA, GG, CG and GC steps present the highest slide effect together with the lowest twist values resulting in a more flexible helix than DNA containing AA and AT steps that evidence the lowest slide effects, the highest twist values and belong to the rigid subgroup [197,198]. Transcription factors exquisitely manipulate the twist, tilt, roll or slide parameters for optimal DNA binding at specific DNA sequences.

The orientation of DNA binding molecules on the DNA helix is important. Thus, an intercalating drug can only generally cover only a short DNA sequence (the bases surrounding the intercalation site) whereas a groove binding one can lie along the DNA helix and cover a much longer DNA sequence. Only a few numbers of bis-intercalators and even fewer poly-intercalators were developed and are able to recognize longer DNA sequences. For instance, some tetra-intercalators present portions of the molecules lying in the minor (peptidic chains) or the major (adipic acid) grooves of the DNA helix and four naphthalene diimide units as planar chromophores to intercalate between adjacent base pairs to rejoin at several points the minor and major grooves like a thread going through the eye of a needle (namely “threading intercalators”), resulting in a coverage of a 14 bp long DNA sequence [199,200]. In term of stability of the binding, both are labile interactions. Only alkylating drugs are able to form covalent and stable DNA complexes. Typically, intercalation results in a weaker binding constant (ranging from 10^{-4} to 10^{-6} M) than groove binding mode (10^{-5} to 10^{-9} M) together with higher rates for association/dissociation constants. Nevertheless, exceptions with high-affinity intercalators and low-affinity groove binders do exist. The development of compounds that share mixed properties (such as intercalation + groove binding or alkylation + groove binding) is one of the options to increase the efficiency of a molecule to bind the DNA in a sequence-specific manner.

In order to block transcription factor DNA binding, a good knowledge of both the drug and the protein binding to the DNA helix is a prerequisite. Interestingly, some transcription factors could be inhibited by different classes of inhibitors, as for NF-H, ETS-family transcription factors, HIF1 α and so on as exemplified in the following sections.

DNA intercalating drugs for transcription factor/DNA binding

Many (but not all) low molecular weight molecules that contain a flat aromatic chromophore can intercalate between two consecutive base pairs. This process produces specific DNA constraints: the space between two successive base pairs in native DNA helix of around 3.4Å is strongly increased by the incorporation of the planar molecule in the space that rises, in theory, to at least 6.8Å. The planar chromophores could present an orientation perpendicular or parallel to the base-pair axis. The

perpendicular orientation increases the portion of the molecule that protrudes in the major or minor groove of the DNA helix. For example, the two central rings of anthracyclines are positioned perpendicularly to the base pairs (preferentially at CpG/CpG positions) leaving the first non-aromatic ring and the sugar ring of anthracyclines protruding in the minor groove whereas the opposite 4th ring takes place in the major groove. The intercalation process usually occurs preferentially between alternating base pairs but intercalation between identical base pairs can also occur as reported with cryptolepine, an indoloquinoline alkaloid isolated from *Cryptolepis sanguinolenta*, that can easily intercalate between two successive C•G base pairs (CpC/GpG site) [201].

The intercalation also produces an unwinding of the DNA helix that can affect the propensity of a transcription factor to properly bind its cognate sequence. Bis-intercalators are more effective to unwind the DNA helix than mono-intercalators. For instance, the mono-intercalators ethidium bromide and actinomycin D induce an unwinding angle of 26° whereas the anthracycline derivative daunorubicin is less potent and unwinds the DNA by only 11°. Bis-intercalators, bearing two planar chromophores, can nearly double the unwinding angle as for the peptide antibiotic echinomycin with an unwinding angle of 48° [202,203].

Bis-intercalators

Echinomycin (NSC-13502, Figure 5) was first evidenced to interfere with RNA polymerase in the presence of guanine in the DNA, before it was shown to bind the DNA as a bis-intercalator [202,204]. Echinomycin intercalates at 5'-CpG sites within the 5'-CGTACG sequence and its big quinoxaline ring lies in the major groove of the DNA helix whereas alanines are implicated in a sequence-specific hydrogen bonding to guanines in the minor groove [205]. Such bases unwinding and the resulting lengthening of the helix result in a marked hypersensitive site to diethyl pyrocarbonate (DEPC) that highlights the induced helix distortion [206]. Similarly, treatment with the thymidine-targeting reagent osmium tetroxide argues for a large local unwinding of the DNA helix associated with an impossibility to form Hoogsteen base pairing [207]. This modification of the base orientation in the helix axis may favor the interference with transcription factor/DNA binding. At the chromatin level, echinomycin also interacts with the nucleosome core particles [208].

Although echinomycin was first found to affect transcription, using global *in vitro* transcription systems [209,210], and to inhibit DNA replication in *Xenopus* embryonic model [211], it was later identified, by high-throughput screening, as a hypoxia-inducible factor-1 alpha and beta (HIF-1 α and HIF-1 β) DNA binding inhibitor [212]. Echinomycin was found to be specific to HIF-1 and failed to inhibit both AP-1 and NF- κ B DNA binding activities in either EMSA or ChIP assays on the vascular endothelial growth factor (VEGF) promoter (that contains both HIF-1 (HRE), AP-1 and NF- κ B response elements). Such HRE inhibition was also confirmed by luciferase assays and by measuring VEGF mRNA expression level in echinomycin treated cells. HIF1/DNA binding inhibition showed also an effect on REDD1 expression under insulin activation in adipocytes [213], glucose transporter 3 (GLUT3) in ischemia/reperfusion injured brains models [214] and on the human growth hormone promoter [215]. At the therapeutic level, echinomycin was recently evaluated in mouse models of acute myeloid leukemia and shows promising results in the relapse prevention [216]. However, direct interaction of echinomycin with FKBP12 protein and rapamycin was also evidenced using SPR and fluorescence quenching measurements, resulting in a reduced calcineurin phosphatase activity [217]. Such binding can potentially represent an alternative mechanism of echinomycin action and more research is needed to determine the importance of FKBP12 relatively to HIF1 α inhibition in term of target and consequences.

Moreover, under hypoxic conditions, echinomycin strongly inhibits not only HIF-1 but also other transcription factor activities, notably SP1, suggesting a more complex mode of action of echinomycin. To a lesser extent, echinomycin also inhibits EGR1 binding to its cognate sequence [218]. Moreover, in contrast with the expected results, low concentrations of echinomycin, under normoxic conditions, lead to an increase of HIF1 α activity, which could impair its potential use as a cancer treatment [219]. When evaluated in phase I/II clinical trials 20 years ago, echinomycin did not present major side effects, however these trials were stopped due to its minimal objective therapeutic effects in the evaluated solid tumors.

Nevertheless, echinomycin is still used as a tool for HIF-1 targeting, notably in hematological diseases. Since HIF-1 α is an interesting target in leukemic stem cells [220], echinomycin was evaluated and shown to suppress mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway and NOTCH1 signaling in acute leukemia [221] and to induce long-lasting remission in mouse models transplanted with relapsed MLL^{PTD/WT}Flt3^{ITD/WT} acute myeloid leukemia [222].

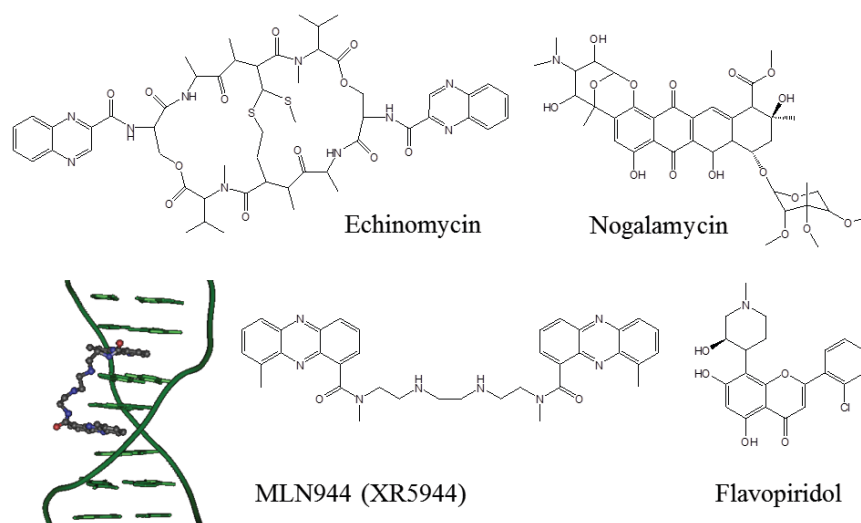


Figure 5. DNA intercalating compounds as transcription factor/DNA binding inhibitors. The solution structure of MLN944 bis-intercalated to the DNA helix is presented as an example of bis-intercalation between adjacent base pairs (MMDB ID: 119822) [223].

In the same line, the bis(phenazine-1-carboxamide) MLN944 (XR5944, Figure 5), co-developed by Millennium Pharmaceuticals and Xenova Ltd., is a second example of bis-intercalators that inhibit transcription factors/DNA binding. Although the compound was originally reported as a dual topoisomerase I and II inhibitors [224], Sappal et al. [225] also showed that it is mainly implicated in DNA intercalation processes. Indeed, no correlation has been shown between topoisomerase I and II expression and MLN944 sensitivity in a large panel of cell lines [226] and the topoisomerases complexes can only be formed after long time exposure [227]. The bis-intercalation of MLN944 between successive base pairs was confirmed by Dai et al. within the AT↓GC↓AT sequence (↓, intercalation sites) using NMR and NOE-restrained molecular dynamics refinement [228]. The two phenazine rings intercalate at 5'-TpG and its complementary sequence 5'CpA (as a palindromic clamp), parallel to the long axes of the flanking DNA base pairs, and the amino-carboxamide linker lies in the major groove of the DNA helix, forming a “Z” view when looking from the major groove. The precise intercalation pattern was recently refined using ¹H and ³¹P-NMR and AMBER12 force field molecular dynamics simulations on both d(ATGCAT)₂, d(TATGCATA)₂ and d(TACGCGTA)₂ duplex sequences [229]. DNA intercalation of MLN944 induces a right-handed twist of the DNA helix and leads to an overall extent of unwinding of 48°. Since this sequence is present in the consensus AP-1 binding site, the authors estimated the impact of MLN944 on c-JUN (a member of AP-1 family) DNA binding using EMSA. MLN944 clearly inhibited c-JUN DNA binding at a concentration range from 25 nM (start of the binding inhibition) to 50 μM (with an almost complete of c-Jun/DNA interaction) but failed to inhibit NF-κB, used a negative control that lacks MLN944 preferred bis-intercalation site. *In vitro* transcription assays showed the implication of the transcription process in the mechanism of action of MLN944 showing that it preferentially inhibits the transcription at the initiation stage, as opposed to actinomycin D, covering a 4 bp sequence and which blocks the elongation step. RNA polymerases inhibition was also confirmed in nuclei isolated from MLN944-treated HeLa cells [230].

More recently, MLN944 was also shown to interact at a 2:1 drug:DNA stoichiometry with the palindromic estrogen response element (ERE) 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3' to block the estrogen receptor alpha/DNA binding. Also, CGG central tri-nucleotide exhibits a better recognition than TTT-spaced ERE sequences, as evidenced using luciferase assays [231].

At the cellular level, MLN944 was confirmed as a topoisomerases-independent drug [226] and presents potent anticancer activities in rhabdomyosarcoma cells [232]. MLN944 can also act in cooperation with other drugs effects with 5-FU or irinotecan in human colon carcinoma cell lines and xenografts in mice [233] and with carboplatin or doxorubicin in COR-L23/P human non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) cells and xenografts [234]. Based on those potent pre-clinical results, MLN944/XR5944 entered phase I clinical trial against solid tumors, evidencing oral mucositis as the most frequent dose limiting toxicity, two cases of acute renal toxicities and moderate hematological toxicities with one partial response [235].

Monointercalators

A first example of mono-intercalating drug that inhibits transcription factor/DNA binding is the anthracycline nogalamycin (Figure 5), which intercalates perpendicularly at G/C-rich sites with extremely slow dissociation kinetics. This compound binds DNA simultaneously in both grooves and induces a 35° helical twist [236,237]. Nogalamycin was evidenced to inhibit EGR1, AP1 and TBP binding to DNA at micromolar range [218].

Another example of mono-intercalating drug is the flavopiridol (alvocidib, Figure 5). This semisynthetic flavone derives from the stem bark of the Indian herbal medicinal plants *Amoora rohituka* and *Dysoxylum binectariferum*. It was first defined as a potent cyclin-dependent kinases (CDKs) inhibitor, through binding in the ATP-pocket of CDKs, and it entered clinical trials (Sanofi-Aventis), either alone or in combination with cytarabine (AraC) and mitoxantrone (FLAM protocol) in acute leukemia [238,239] and in combination with other cytotoxic drugs in advanced ovarian carcinoma [240], relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma [241] and myeloma [242]. However, flavopiridol also interacts with DNA with similar affinity than Hoechst 33258 or ethidium bromide, as evidenced by spectroscopic analysis. Molecular modeling of flavopiridol binding into duplex 5'-TCGTCAA-3' double helix suggested π - π stacking interactions of the chlorophenyl flavopiridol moiety with C and A bases and face-to-face aromatic stacking interactions of the hydroxy-substituted phenyl ring at the opposite end of flavopiridol with G and T bases. A close look at the cytotoxicity profile of flavopiridol on the NCI cancer cell line panel reveals strong similarities with profiles obtained using other intercalating drugs [243] but it does not show any poisoning of topoisomerases I/II. Interestingly, flavopiridol inhibited STAT3/DNA binding, diminished STAT3-directed transcription on STAT3-driven promoters in luciferase assays and identified, using expression of STAT3, direct downstream targets such as MCL1 [244]. Since STAT3 is commonly overexpressed in AML, flavopiridol remains of particular interest against this hematological disorder [245].

Metal complexes

As another class of compound implicated in transcription factor inhibition, DNA binding metal complexes, depending on their nature, can interact either as an intercalator, a major groove or as a minor groove DNA ligand (see below for examples). Ruthenium and platinum containing metallo-intercalators were evidenced using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) as PU.1/DNA binding competitors [246].

DNA alkylating drugs for transcription factor DNA binding modulation

Pluramycins and derivatives

The first DNA alkylating drugs identified to interfere with transcription belong to the pluramycin family of antibiotics [247,248]. Pluramycin (Figure 6A) alkylates DNA at the N7 position of guanines orientated regarding the major groove with the planar chromophore intercalated between adjacent base pairs. Pluramycin preferentially alkylates at 5'-C↓GT > 5'-C↓GG >> 5'-T↓GT sites with intercalation at the 5'-side of the alkylated guanine (alkylated **G** in bold, intercalation indicated with ↓).

Pluramycin induces a strong DNA helix unwinding that facilitates (but does not block) the TBP binding to the TATA box when positioned in the close vicinity of a pluramycin alkylation site on a guanine adjacent to the TATA-box. TBP is one of the main components of the TFIID basal transcription factor complex. In this example, pluramycin does not infer but trap the TBP protein to its consensus binding site to form a TBP-DNA-pluramycin ternary complex. Being already unwound by pluramycin, the alkylated DNA sequence is more accessible to TBP than native DNA. Therefore, the affinity of TBP to the DNA was

increased when pluramycin was previously incubated with the DNA and generates compensatory alterations in DNA that favors the formation of the ternary complex [249]. Adduct of pluramycin on the DNA induces a torsion of the DNA in close vicinity that increases the size of the minor groove to energetically favor the binding of the minor groove binding transcription factor TBP, which is known to induce a strong bent of the DNA helix by an angle of 180° [48,49], as presented above in Figure 2B, left panel.

As a counterpart, TBP binding to the TATA-box increases pluramycin reactivity at its alkylation site [250]. However, this is not a general feature of other AT-rich binding protein since the SV40 T-antigen, AT-tracks of the SV40 origin, inhibited (instead of enhanced for TBP) the reactivity of pluramycin at the GC-box region independently of the direct binding of the T-antigen to that sequence [251]. The bent of the DNA induced upon TBP binding seems to be more important for pluramycin/DNA interaction than its sequence binding since increased pluramycin reactivity to guanines is also observed upon binding to IHF, another minor groove binding protein that induces strong DNA bent ($>140^\circ$ for IHF) [252].

By contrast, the pluramycin derivative hedamycin (Figure 6A), which is also both an alkylating and an intercalating compound, has been shown to inhibit protein/DNA binding [253]. It forms a stable complex at N7 position of deoxyguanosine residues, preferentially at TG sites and intercalates the DNA helix as evidenced using ethidium bromide competition assay. Hedamycin blocked lac repressor and DNA/RNA polymerase interaction at the lac regulatory region [254]. Hence, hedamycin appears to be a potent TBP/DNA binding inhibitor as compared to the minor groove DNA-binders distamycin A and CC-1065 [255]. Using ligation-mediated polymerase chain reaction and DNA sequencing to address hedamycin binding selectivity on genomic DNA of treated cells, Cairns and Murray found an amplification of sequences corresponding to the mixed NF-E2/AP-1 motif [256].

Pluramycin and its derivative hedamycin are both alkylating and intercalating drugs. Among alkylating and non-intercalating drugs that interfere with transcription factor DNA binding are the major groove alkylating drug cisplatin and the minor-groove alkylating drug ecteinascidin 743 (ET743, trabectedin).

Cisplatin and derivatives

Fortuitously discovered around 50 years ago, cisplatin (cis-diaminedichloridoplatinum(II), Figure 6B) is used in clinic since 1978 and is still administrated as one of the most effective anticancer drugs against solid tumors. Cisplatin is a bis-alkylating drug that forms intra- or inter-strand DNA crosslinks and can also generate monovalent DNA adducts. Cisplatin adducts occurs primarily through covalent bonding to the N7 position of guanines, an atom positioned in the major groove of the DNA helix, with preference for 5'-GpG dinucleotide (65%) and 5'-ApG (25%) intra-strand cross-links rather than inter-strand crosslinks (5- 8%). Cisplatin-induced intra-strand crosslinks at 5'-GpG base-pairs result in a DNA helix bending toward major groove with an angle of $55-78^\circ$ associated with DNA distortion that favors local denaturation of the DNA helix by destabilizing the Watson-Crick base pairing [257-261]. The distortion varies and depends on the sequence context, with up to a 7 distorted bp for 1,3-intra-strand crosslinks within a TGTGT sequence [260]. At the protein/DNA binding level, cisplatin adducts are recognized by HMG proteins in a manner that is favored by the large induced bending resulting from cisplatin intra-strand crosslink. Indeed, the cisplatin-induced bent fits perfectly with the L-shaped structure of HMG DNA binding domain (HMG-box) and reduces the "cost" of DNA bending for HMG-box [29]. Insertion of Phe37 of HMG-box is facilitated by the two platinated guanines in 5'-GpG dinucleotide. Both HMG-B1 and HMG-B2 participate in platinated-agent-induced cytotoxicity [262]. The bent platinated-DNA is also a good substrate for other proteins from the HMG-box family such as HMG-B4 [263], the mitochondrial transcription factor A (mtTFA) [264] or the structure-specific recognition protein SSRP1 [265] and for transcription factors containing HMG-box as a DNA binding domain such as SRY, LEF-1 and UBF-1 in a manner associated with changes in the transcriptional regulation [266-269]. Similarly, when located in close vicinity to the TATA-box, the platinum-induced bent of the DNA helix results in a 175-fold increase in binding affinity of the TATA-binding protein (TBP) relatively to unmodified DNA sequence, associated with a decrease or more than 30-fold of the dissociation constant [270]. Such trapping of a transcription factor results in a blockade of a bulky protein that may interfere with the replication machinery as does topoisomerase I and

II poisoning drugs such as camptothecin or etoposide, respectively. By contrast, cisplatin adducts inhibit P53 and p73 binding to DNA on p21 and MDM2 promoter sequences [271,272] as well as NF-κB/DNA binding in a manner that depends on the induced DNA helix distortion [273]. Currently in phase II clinical trials, the polynuclear transplatinum BBR3464 (Figure 6B) forms DNA adducts that are also recognized by P53 [272]. Such adduct fails to be bound by HMG-box containing proteins but traps the human recombinant replication protein A (RPA), the damage recognition sensor protein implicated in nucleotide excision repair, at least as a 1,4-intrastrand crosslink lesion [274].

Nitrogen mustards

As for platinated agents, nitrogen mustards also belong to a family of long time clinically used DNA alkylating agents. Among this family, some also presented transcription factor DNA binding inhibition activities. This was first evidenced in transcription/translation coupled cell-free system [275] and was lately studied more precisely for individual transcription factors.

This is for instance the case of mechlorethamine dihydrochloride (HN2) and quinacrine mustard (QM) (Figure 6C). Both alkylate guanines on the N7 group in the major groove, preferentially on successive guanines. HN2 alkylates guanines in sequences containing three consecutive guanines whereas QM, that contains an intercalating moiety, preferentially alkylates dimer of guanines in GGA sequences and single guanine in GT^(G/A) triplets but no other single guanine in other triplet sequences. This is in agreement with the results of Fabbri et al. [276] that shows that both the GC-rich binding transcription factors NF-κB and SP1 (binding sites being GGGACTTTCC and the GC-box GGGCGG, respectively) but not the less GC-rich transcription factor OTF-1 (ATTTGCAT) which have a DNA binding activity that is inhibited by HN2 as evidenced using EMSA, whereas QM inhibits both NF-κB and OTF-1. It is worth noting that if 10-50 μM of QM is enough to inhibit NF-κB/DNA binding and OTF-1/DNA binding to their cognate sequences on the HIV LTR region and the -147 region of the H2B promoter, respectively, HN2 requires 2mM to inhibit NF-κB/DNA binding to the same HIV LTR target sequence. The same specificity is obtained using around 5 μM and 50-100 μM of QM and HN2, respectively, and evaluated in transfection assays with the same sequences driving the expression of the chloramphenicol acetyl transferase enzyme.

Another study evidenced that nitrogen mustard HN2 inhibited the binding of Sp1 to its cognate sequence on the cytochrome c1 promoter [277,278]. The same group showed that TBP binding to the TATA-box was inhibited by alkylation with nitrogen or sulfur mustard (Figure 6C) on the N3 position of adenines from the AT-rich track, an alkylation site orientated in the minor groove of the DNA helix where the TBP protein stands (Figure 2B). HN2 was as efficient as sulfur mustard in inhibiting the TBP/DNA complex formation, but more than the monofunctional sulphur mustard 2-chloroethyl ethyl sulphide (CEES, Figure 6C) [278]. Tallimustine (FCE 24517, Figure 6C), a nitrogen mustard derivative of the minor groove binder distamycin A (see below) is also a potent inhibitor of TBP binding to DNA [279]. This minor groove alkylating agent presents a strong binding selectivity with some 6bp AT-rich sites as evidenced using DNase I footprinting assays [280].

Ecteinascidin-743 (Trabectedin, Yondelis®)

ET743 is a tetrahydroquinoline alkaloid isolated from the tunicate *Ecteinascidia turbinata* (Figure 6D). ET743 reacts with DNA through a carbinolamine group that bond to the exocyclic amino group of guanine, an alkylation site orientated toward the minor groove [281]. Interestingly, the resulting minor groove bonding increases the size of the major groove on the opposite strand [282] through a bent of the molecule towards the major groove [283].

Two tetrahydroisoquinoline moieties lie in the minor groove with the third ring (top of the molecule in Figure 6D) protrudes perpendicularly which can allow contacts with proteins (such as the mismatch repair protein XPG) or, on the contrary, may interfere with protein/DNA interaction.

Preferred trinucleotide sites were defined as 5'-Py**GG** and 5'-Pu**GC** (bold **G** indicate the alkylated guanines) favored by three hydrogen bonds between A-B tetrahydroisoquinoline moieties with each of the three nucleotides [281,284] whereas other sites such as 5'-CGA are not alkylated [285].

ET743 presents a preferred binding sequence and interferes with protein/DNA binding as observed for TBP and E2F transcription factors at 10^{-5} M and, more importantly, for NF-H complex transcription factor at 10-50 nM range [286,287]. ET743 preferably binds to the CCAAT sequence (CAT-box) in the major groove, so on the opposite side of the DNA helix from comparison to the bonding of ET743 in the minor groove. The NF-H binding blockade was particularly well described on the proximal region of the MDR1 promoter [286]. The subsequent inhibition of this xenobiotic exclusion pump is an asset for combined chemotherapy associating conventional chemotherapy drugs that commonly activates MDR1 resulting in chemoresistance, such as anthracyclines, taxol, etc... Through this NF-H inhibition on MDR1 promoter, ET743 therefore is expected to infer with drug-induced chemoresistance. By contrast, tallimustine, used as another minor groove alkylating agent, failed to inhibit NF-H transcription factor/DNA binding [287].

Interestingly, ET743 blocks SP1 activity in response to trichostatin, as evidenced on the SP1-regulated p21 gene, which suggests an inhibiting effect of ET743 in induced transcriptionally active but not on constitutively expressed genes [288]. Moreover, ET743 action is independent of the SP1 transcription factor since not all SP1 binding sites can be impeded by ET743, as evidenced in type I collagen gene COL1A1 [289]. ET743 does not only act at the enhancer level but also at the nucleosome level where it decreases nucleosome folding at concentrations as low as 100 nM [290].

ET743 also blocks FUS-CHOP transcription factor binding to CHOP, pentraxin 3 (PTX3) and fibronectin 1 (FN1) promoters [291], as part of its action in myxoid liposarcoma to restore adipogenic differentiation [292,293] for which it is evaluated in phase I/II clinical trials. In ET743-resistant myxoid liposarcoma cells, FUS-CHOP failed to bind to PTX3 and FN1 promoters, arguing for the relevance of this transcriptional control in the treatment of myxoid liposarcoma by ET743 [294], and induced expression of miR-130a, miR-21 and miR-7, that contains a CHOP binding site in their promoter. Interestingly, ET743 is also particularly active in a panel of pediatric Ewing sarcomas as compared to osteosarcoma, rhabdomyosarcoma and synovial sarcoma, suggesting a mode of action through the EWS-FLI1 fusion transcription factor. Such EWS-FLI1 dependent inhibition was reported on the NR0B1 promoter at nanomolar concentrations [295].

Recently, D'Angelo et al. established a link between the cytotoxic effects of ET743 on carcinoma cells to HMGA protein displacement from the driven promoters, as shown on the promoter of the radiation DNA repair sensor protein, ATM [296]. Such ET743-induced activated transcriptional control of ATM implies a synergy between ET743 treatment and radiotherapy. It is worth noting that increased expression of HMGA1 and HMGA2 were previously reported in ET743-resistant myxoid liposarcoma cell line [294].

In addition to the inhibition of the DNA repair pathway, ET743 acts on nucleotide excision repair (NER) (reviewed in [297]) by recruiting and sequestering the XPG DNA repair protein to the ET-743-induced bulk DNA damage [298]. This results in a rapid degradation of RNA polymerase II in transcription-coupled NER proficient, but not deficient, cells [299].

CC-1065

The antitumor antibiotic CC-1065 (Figure 6E) produced by *Streptomyces zelensis* is another minor groove alkylating drug evaluated for transcription factor inhibition. CC-1065 covalently binds to DNA in the minor groove on the N-3 position of guanines and inhibits TBP complex formation. It prevents the binding of half the complexes at sub-nanomolar concentration range ($\sim 0.9 \times 10^{-9}$ M) whereas the dissociation of already formed DNA/TBP complexes requires higher drug concentration level ($\sim 10^{-8}$ M). Similarly, upon addition of TFIIA, as a co-factor that increases TBP binding to DNA, the required concentration of CC-1065 is even much greater (10^{-6} M) [255]. Since it also bends the DNA helix, CC-1065 facilitates the binding of SP1 as a multimer on the SV40 early promoter region used as a tool to understand cooperative function of SP1 on basic promoters [250,300]. Using PCR-mediated transcription CC-1065 blocks the transcription of both estrogen receptor and Ha-RAS promoters [301]. However, CC-1065 exhibits high hepatotoxicity leading to delayed mice death compromising its use in therapeutics.

Mitomycin C and derivatives as protein/DNA crosslinkers

A special point has to be addressed regarding protein/DNA crosslinking agents such as mitomycin C (MMC) and its derivatives FR66979 and FR900482 (Figure 6F). MMC is indeed a bi-functional alkylating agent, well known to form both intra- and inter-strand DNA cross-links in the major or minor groove (N7 or N2 positions of guanines, respectively) of the specific 5'-CG dinucleotide. It could also form monoadducts or react with one active group with DNA and with the other one with the thiol group of glutathione or proteins such as NADH, NAPDH, p-450 reductase, NGO1 and GRP58, for instance. MMC derivatives FR66979 and FR900482 present the same reactivity as MMC with DNA crosslinking, mainly in the minor groove on the exocyclic NH₂ group of guanines, and crosslink DNA with proteins. The particularity of FR66979 and FR900482 is that they could also crosslink DNA with the transcription factor HMG-I/H as evidenced using ChIP experiments and mass spectrometry [302,303]. This trapping of HMGI/H is observed on the promoter regions of the IL-2 and IL-2R α genes in vivo where it collaborates with NF- κ B and the Ets-family member Elf-1 to activate gene transcription. At the clinical level, FR900482 induces vascular leak syndrome as a biological side effect. This is a possible consequence of IL-2 activation of neutrophils to endothelial cell adhesion). Its derivative FK317 does not induce vascular leak syndrome [304] but induces apoptosis instead of necrosis with FR900482 and was therefore preferred for cancer treatment and entered phase II clinical trials in Japan. FK317 is a prodrug, converted in the active form FR157471, that presents similar mode of action to FR900482 including protein/DNA crosslinking of HMGI/H but does not activate IL-2 and IL-2R α gene expression [305].

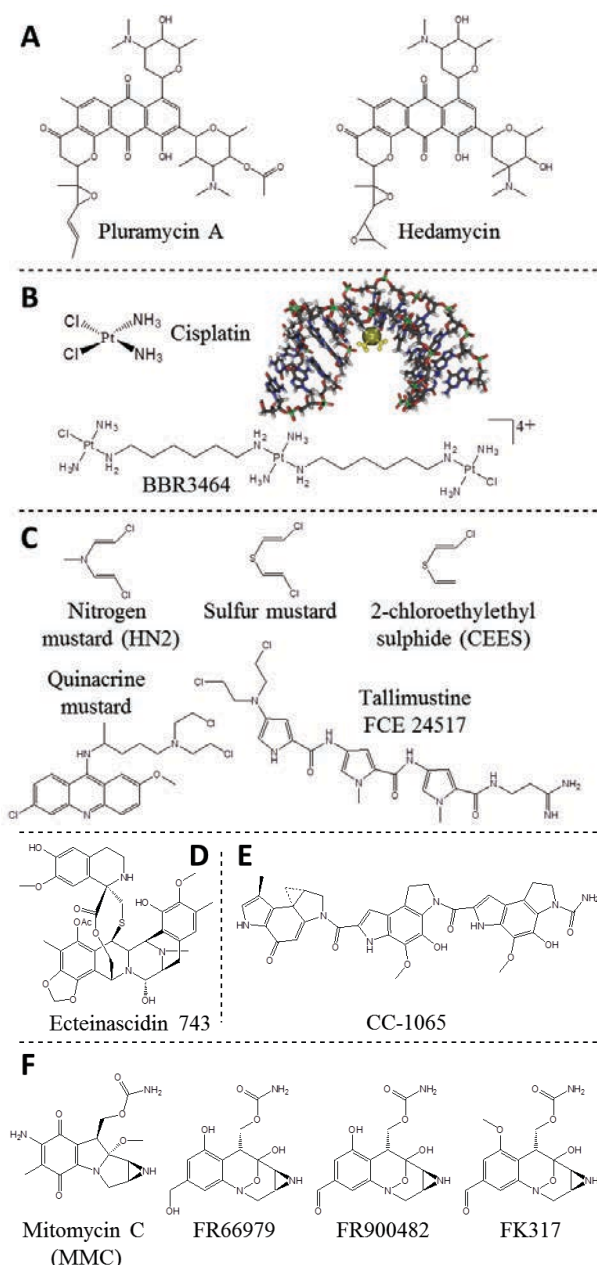


Figure 6. DNA alkylating compounds as transcription factor/DNA binding inhibitors. The solution structure of cisplatin covalently bound to the DNA helix is presented (MMDB ID: 47796) [306] as an example of DNA adduct.

Major groove DNA binding drugs for transcription factor DNA binding

The asymmetry of the DNA helix generates a shallow-wide major groove and a deep-narrow minor groove. Because of the bigger size of the major groove (11.6 Å), most of small molecular weight compounds fit better in the minor groove (6.0 Å). Since most proteins interact with the major groove of DNA, where the number of molecule/DNA contact points is more important than in the minor groove, the major groove of DNA appears as one of the main targets for transcription factor inhibition. Therefore, developing compounds that target the major groove of the DNA in a sequence-selective manner is of major interest to regulate the transcription of aberrantly expressed genes. The size of the major groove is of comparable size to one strand of DNA, therefore it was proposed that a third sequence can be stabilized by Hoogsteen hydrogen bond with the nucleotides of the classic double-strand DNA helix. Such triple-stranded DNA helix (called triplex-forming oligonucleotides, TFOs) can therefore interfere on defined sequences with transcription factor DNA binding such as c-MYC [307], the progesterone or androgen receptors [308], ETS

family members [309,310], SP1 both *in vitro* [311] and in cells as evidenced for the inhibition of ETS-2 expression in a prostate carcinoma cell line [310]. TFOs also directly modulate a specific gene expression such as for HER2/Neu [312], Ki-RAS [313], c-MYC [314] and c-FOS [315] promoters. These DNA targeting approaches are already presented in several reviews and will therefore not be discussed herein [316-320].

Only few compounds bind to the major groove of the DNA and even fewer are studied for transcription factor DNA binding inhibition. These rare compounds are essentially metal-coupled drugs that form complexes with chromium, ruthenium, and platinum ions for instance (Figure 7).

Raja and Nair evaluated three chromium(III) complexes for their specific ability to disrupt the binding of two different transcription factors, namely SP1 and TFIID, to their consensus sequences (EMSA) and measured their interference, at least *in vitro* with the transcription process (*in vitro* transcription from the CMV promoter to provide a 363 base pair transcript) [321]. Among the three complexes, only $[\text{Cr}(\text{salen})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ efficiently inhibited both SP1 and TFIID transcription factors/DNA complex formation *in vitro* and blocked DNA transcription. $[\text{Cr}(\text{salen})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ exhibits a near regular octahedral geometry with two axial water molecules, as points of anchorage in the DNA major groove [322].

The ruthenium complex $[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$ (where phi = 9,10-phenanthrenequinone diimine, phen = 1,10-phenanthroline) also inhibits RNA transcription *in vitro* [323]. Other modified metallointercalators were designed to show selectivity for major groove sites in a comparable manner to transcription factor major groove DNA binders in order to selectively inhibit transcription. This is the case for the metallointercalator lambda-1-Rh(MGP) $_2\text{phi}^{5+}$ (MGP) 4-guanidylmethyl-1,10-phenanthroline) which tightly and specifically bind in the major groove of the 5'-CATATG-3' sequence, the AP-1 recognition element (ARE)1. The additional guanidinium functionalities generate a network of hydrogen and bonds to DNA major groove to induce a 70° unwinding of the DNA helix. Lambda-1-Rh(MGP) $_2\text{phi}^{5+}$ inhibits yeast AP-1 binding at sub-micromolar concentration, as evidenced by EMSA [324].

Among platinum complexes that intercalate into the DNA helix or bind through the minor groove, the square planar pyrene-coupled platinum(II) complex $[\text{Pt}(\text{C}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{C}\equiv\text{N}-\text{L})]^+$ (L = 4-(3,5-di-isopropyl-phenylethynyl)-pyrene) differs by its major groove DNA binding mode. This major groove binding was much more associated with interference with cAMP response element binding protein (CREB) binding to its response element CRE than for NF-κB, AP-1 or SP1 as evidenced using EMSA, in which nuclear extracts were incubated with radiolabeled DNA containing either CREB, NF-κB or AP-1 response elements [325].

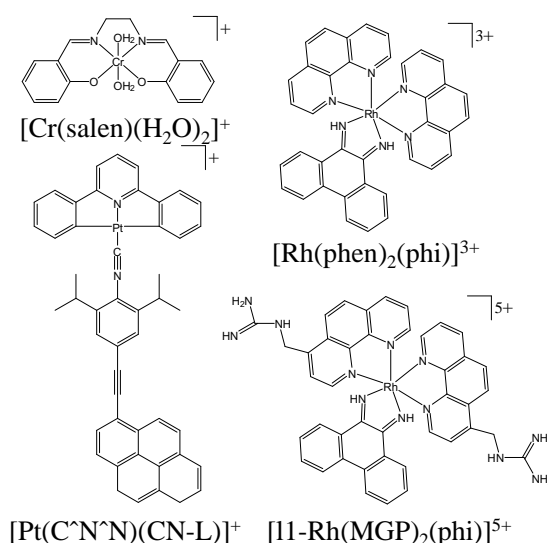


Figure 7. DNA major groove binders as transcription factor/DNA binding inhibitors.

Minor groove DNA binding drugs for transcription factor DNA binding

The vast majority of low molecular weight groove binders have better propensities to fit in the minor groove due to its narrower width that affords more important van der Waals contacts.

The main minor groove DNA binding drug series evaluated for transcription factors/DNA binding inhibition derived from netropsin and distamycin but compounds with other structures were also evidenced as transcription factor/ DNA binding inhibitors through binding in the minor groove of the DNA. Alternative minor groove DNA binders with distinctive structures can also inhibit transcription factor DNA binding.

Netropsin and distamycin as pioneer drugs

The first derivatives contained 3-4 ring units that form a crescent shape to fit intimately to the narrow curvature of the minor groove over 3-4 bp. Positive charges are usually present at the end of the successive rings to make direct or water-mediated hydrogen bonding with the DNA.

The approach started ~40 years ago with netropsin, distamycin and, to a lesser extent, Hoescht33258. Those three compounds recognize DNA at stretches of AT-rich base pairs in the minor groove of DNA [326,327].

Netropsin binds AT-rich sites as a monomer on 3-4 bases within the minor groove. Because of its low sequence selectivity, it has only a poor effect on transcription factor DNA binding. It was indeed reported for transcription factors or protein DNA binders that interact on AT-rich sites such as TBP and its co-factor TFIIA (for which netropsin is however less active than distamycin A and much less efficient than CC-1065) [241] and to HMGAl binding, through its AT-hook site to AT-rich sites on the nitric oxide synthetase promoter, associated to cellular functions [328]. Termination of the transcription activity of netropsin was attributed to its direct binding to the termination sites of both human histone H3.3 and gastrin genes [329].

By contrast, distamycin A can bind to the minor groove of DNA duplexes at stretches of approximately four A-T base pairs, either as a monomer (for instance on ATTA sites) or as a dimer (for instance on AAGTT sites) [330]. The dimer binding mode results from cooperative binding of distamycin on most AT-rich sequence, but not the 5'-ATAT site which is recognized by an anti-cooperative dimer. Subsequently to the dimer binding of distamycin, an increase of the minor groove and a decrease of the size of the major groove on the opposite side are observed. A large bending of the DNA axis toward the major groove upon dimer binding differs from the monomeric binding that induces a bending toward the minor groove [331].

In term of transcription factor inhibition, distamycin showed inhibitory effects on the transcription factor binding as OCT- 1 (octamer 1 nuclear factor) [332], the octamer binding factor OTF-1 and the erythroid-specific GATAAG protein NFE-1 at the human histone H2B promoter [333], TBP [255] or even the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 [334].

A third well studied minor groove binder that originates from development of more selective drugs, as transcription factor inhibitors, is the bisbenzimidazole Hoescht33342. This compound is an AT-rich DNA minor groove binder that acts as monomer, dimer, and probably tetramer, but could also intercalate in GC-rich sequences at higher drug:DNA ratios [335]. Hoescht33342 inhibits DNA interaction of the AT-rich binding transcription factor TBP to the TATA-box, the complex formed by ELK-1 and the serum response factor (SRF) to the serum response element (SRE) from c-FOS promoter [336] and a protein (probably being the transcriptional repressor GFI-1 or associated proteins) bound to a 28 bp AT-rich element on the survivin promoter [337].

Based on the structure of those compounds, two synthesis approaches were developed to enhance the size and/or the selectivity of the binding sites: polyamides and heterocyclic diamidines.

Pyrrole-imidazole polyamides

The first approach led to the development of pyrrole-imidazole polyamides with improved sequence selectivity based on an increased size through an addition of blocs more or less specific for each base pair step. Those compounds were evaluated toward hairpins to maintain a dimer structure.

The second approach led to the development of diamidine compounds that contain similar ends but higher level of blocs' diversity. Such compounds can act either as monomer or dimer without hairpins.

In the case of pyrrole-imidazole polyamides (an example of global structure is given in Figure 8), imidazole-pyrrole successive rings bind G-C while the inverse synthesis pyrrole-imidazole binds C-G. In the same line, pyrrole-hydroxypyrrole and the reverse bind A-T and T-A base pairs, respectively. Successive pyrrole-pyrrole rings are less selective and recognize both A-T and T-A base pairs. Additional modifications, such as γ -aminobutyric acid [338], were added to favor intramolecular flexibility to form a hairpin and mimic the formation of a dimer upon interaction within the minor groove (for reviews [339-342]).

Regarding pyrrole-imidazole polyamides, it has been shown to inhibit minor groove binding transcription factors such as the TATA-box binding protein TBP [343] or the HMG-box protein LEF-1[344].

But some other pyrrole-imidazole polyamides were specifically designed to target major binding transcription factors implicated in cancer. Among them, different families of oncogenic transcription factors were efficiently inhibited by polyamides:

- Polyamides efficiently inhibited the ETS family transcription factor/DNA binding activity both *in vitro* and on the ETS-driven HER2/neu promoter in a cellular model [345], or only on the ETS family member EVI-1 implicated in AML, in which the polyamide was evaluated [24].
- NF- κ B is also a target for some polyamides through their binding to its GC-rich consensus [346] or through IL6 and IL8 promoter control as evidenced by ChIP-seq, RNA-seq and qRT-PCR assays on A549 lung adenocarcinoma cell line [347].
- Hormone/steroid receptors family, such as estrogen-alpha, the androgen or the glucocorticoid receptors, are also targeted by specific polyamides [348-349].
- b-Zip sub-type transcription factors, such as (i) AP-1, as evidenced for its DNA binding inhibition on the TGF- β 1 promoter [351], the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) promoter and (ii) GCN-4 transcription factor inhibited binding to its consensus recognition sequence [352].
- NF-H/DNA binding on the human topoisomerase II promoter [353,354],
- HIF-1 binding on the VEGF promoter [355], evaluated at both the molecular and the cellular level and shows potent activity on A498 human renal cell carcinoma cell line [356].
- More recently, polyamides were selected to target c-MYC binding to the E-box both *in vitro* and *in vivo* in human osteosarcoma MG63 cell model [357].

Polyamides were not only evaluated for antitumor activity but also for anti-viral purpose. This is notably the case for ETS/DNA binding inhibitors on the HIV-1 promoter [358] and TAT on HIV-1 long terminal repeat (LTR) [359]. Similarly to the virus-encoded transcription and replication factor E2 in human papillomavirus [360], the viral TAX transcription factor is another targeted viral protein for its binding on the cyclic-AMP response elements (CRE), necessary for HTLV-1 transcription [361] as is the virus-encoded transcription and replication factor E2 for human papillomavirus [360].

In parallel to transcription factors inhibition, polyamides were also designed and validated to inhibit non-transcription factors DNA binding proteins, such as D1, HP1 and topoisomerase II [336], or as general inhibitors of transcription through the inhibition of the RNA polymerase II large subunit RPB1, resulting in a reduced genome occupancy by RNA polymerase II and presenting potent antitumor activities on LNCaP prostate cancer xenograft model with low toxicities [363].

Based on the same strategy, pyrrolobenzodiazepine-polyamide conjugates were designed to interact with DNA in a sequence-selective fashion and alkylate guanine at its exocyclic NH₂ position. The rational design and transcription factor inhibition activities are well documented in different reviews *as well as in this volume par Dr John A. Hartley and colleagues*.

In parallel, microgonotropens (MGTs) are AT-selective DNA minor groove binding tripyrrole peptide attached to polyamine chains at a central pyrrole that induces additional contact into the DNA major groove [364]. MGTs were designed to bind up to nine AT bp long sequence. Some MGTs (such as MGT-6b or a branched decaaza-decabutylamine derivative) were active inhibitors (50% inhibition at ~10⁻⁹M) of the E2 factor 1 (E2F1) recognition at its DNA binding element 5'-TTTCGCGCCAAA on the dihydrofolate reductase promoter [365]. Some other MTGs were efficient on c-FOS binding to the serum response element (SRE) [366]. However, if MGTs evidenced promising activities *in vitro*, they showed limited activities on gene expression in cellular models.

Heterocyclic diamidines

Deriving from both distamycin and pentamidine (Figure 8), heterocyclic diamidines synthesized by the group of Pr DW Boykin [367,368] were developed against human African trypanosomiasis based on their ability to target AT-rich sequences of the mini-chromosomal DNA fraction of the trypanosoma. Interestingly, some heterocyclic diamidines, sharing or not anti-trypanosoma activities, evidenced potent transcription factor/DNA binding inhibition activities. The reference compound in this series is the diphenyl-furan-diamidine DB75 (Furamidine, Figure 8) that binds to DNA as a monomer in the minor groove at 4 bp stretches of AT base pairs and presented promising activity against a variety of microorganisms, such as *Pneumocystis carinii* and others infectious diseases. Replacement of amidine groups of DB75 by imidazolines shifts the mode of binding to DNA and confers intercalating properties in GC-rich sequences [369], whereas the replacement of one of the two phenyl rings of DB75 by a benzimidazole moiety leads to the additional specific recognition in the minor groove as dimers stacked head-to-tail on 5'-ATGA sequence but retains some binding potency as a monomer on some AT-rich sites [370].

The first selected compound for transcription factor inhibition was DB293 (Figure 8). By using a screening approach deriving from microarrays and based on a mixture of 54 transcription factors evaluated at the same time for DNA binding to their cognate sequences, two transcription factors (PIT-1 and BRN-3) were evidenced to present a strong inhibition of their DNA binding activities in the presence of DB293 [371]. Both PIT-1 and BRN-3 belong to the POU transcription factor family which comprises OCT transcription factors and shares a common DNA binding domain that consists of two domains, the POU-specific (POU-s) and the POU-homeobox (POU-H) (named from its similarity with the homeotic transcription factors of the HOX family), that cooperate to bind to the PIT-1 (5'-ATGAATAA) and BRN-3 (5'-TTAATGAG) consensus sequences. Both POU-s and POU-H DNA binding domains are composed of three alpha helices, the third one being implicated in direct contact in the major groove of the DNA. POU-H makes additional contacts with DNA through its amino-terminal arm that interacts in the minor groove on AT-rich base pairs. EMSA confirms DB293 potency to compete for PIT-1 and BRN-3 DNA interaction on their cognate sequences whereas IRF-1 and HNF-4, which were used as negative controls that binds consensus containing both an ATGA and an AT-rich site (IRF-1) or not (HNF-4), failed to be displaced from their binding sequence by DB293. DNase I footprinting experiments locate the precise binding of DB293 on the ATGA sites of PIT-1 and BRN-3 consensus sites but only on AT-rich sites on the IRF-1 consensus sequence. Such preferential binding, depending on sequence context, was confirmed using SPR and showed strong cooperative dimer binding on BRN-3 and PIT-1 consensus sites (arguing for ATGA recognition as a dimer) but as a non-cooperative monomer binding on IRF-1 (in agreement with AT-rich site but not ATGA recognition).

A second diamidine compound identified as an active inhibitor of ERG transcription factor binding to DNA is the tetracyclic symmetrical diamidinophenyl-dithiophene DB1255 (Figure 8). ERG belongs to the ETS family member, a part of fusion proteins in prostate cancer [372], Ewing sarcoma [373] and different subtypes of leukemia [374-376], is a pertinent target for cancer treatment [377].

DB1255 was identified for ERG/DNA binding inhibition from a series of heterocyclic diamidines of varied structure using an ELISA-derived protein/DNA binding inhibition assay (EPDBi) and was validated using EMSA. The precise binding site of DB1255 toward ERG consensus binding sequence was located using DNase I footprinting as spanning the AA bases at the 3'-end portion of the minimal ERG binding site 5'-GGAA and the 5'-GTT, located 3' downstream. The relevance of this 5'-AAGTT recognition by DB1255 and consequences on ERG/DNA binding inhibition was addressed using base to base mutated oligonucleotides. Circular dichroism and SPR evidenced DB1255 dimer binding to oligonucleotides containing the ERG binding sequence [378]. DB1998, a di-pyridine derivative of DB1255 (Figure 8), also inhibited ERG/DNA binding but to a much lesser extent, associated with faster kinetics of association and dissociation from comparison with a more stable DNA interaction by using DB1255. At the cellular level, ERG-induced transcription control was abolished by cell treatment with DB1255 as shown using luciferase expression under the control of six successive ERG binding sites. Mutation of DB1255 binding position on DNA abolishes the inhibition of ERG transcriptional control. Moreover, DB1255 inhibited ERG-transcriptional control on the minimal osteopontin promoter, a target previously identified as an ERG-controlled promoter in cancer prostate [379]. Further analysis locates the ERG-binding site at position -119 to -115 (5'-GGAAG) to be implicated in ERG controlled transcription and DB1255 inhibitory effect [378].

Also deriving from DB75, both the diamidine-dibenzimidazole-selenophene DB1976 and the diimidazoline-benzimidazole-selenophene DB1977 (Figure 8) were evaluated for PU.1/DNA binding inhibition using and SPR-based screen [380,381]. PU.1 is another ETS family member. However, it differs from many other by the sequences surrounding the minimal ETS binding sequence 5'-GGAA/T following. Indeed the PU.1 binding sequence requires the presence of an AT-rich track in close vicinity. This AT-rich sequence is targeted by both DB1976 and DB1977 as evidenced using hydroxyl radical and DNase I footprintings on the particular λ B motif of the murine immunoglobulin lambda 2-4 enhancer. Changing the central selenophene ring for a furan abolishes PU.1/DNA binding inhibition propensity, probably through a reduction of the angle formed by the molecule that, as a consequence, does no more properly fit in the minor groove and/or induce groove size modifications. PU.1 transcriptional control inhibition was evaluated using a GFP reporter system under the control of five tandem repeats of the λ B motif, showing that DB1977 was more potent than DB1976 but not for DB1281 (that bears a phenyl ring instead of one of the two benzimidazole rings in DB1976) even though this latter compound presented some PU.1/DNA inhibition potency using *in vitro* experiments.

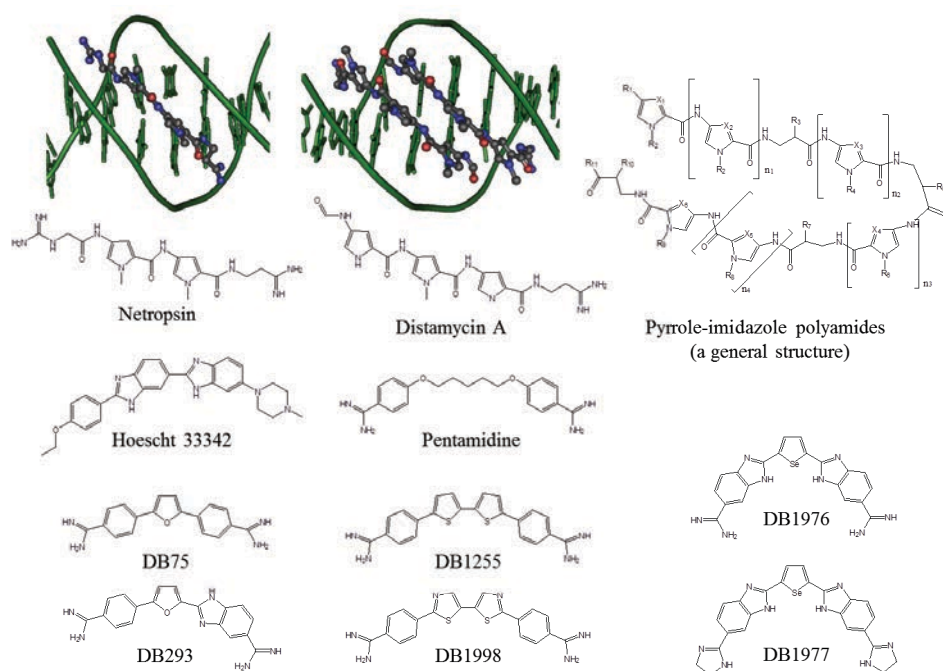


Figure 8. Sequence-specific DNA minor groove ligands as transcription factor/DNA binding inhibitors. The solution structures of netropsin (MMDB ID: 52202) [382] or distamycin (MMDB ID: 54510) [383] bound in the minor groove of the DNA helix are presented as examples of monomer or dimer minor groove binding compounds, respectively.

Mithramycin and derivatives

Mithramycin (MTM) is a family of natural aureolic acid-type polyketide antibiotic isolated from various *Streptomyces species*. It binds in the minor groove of GC-rich region of the DNA [384] after being considered by others as an intercalating drug. By contrast with netropsin and other derivatives that binds A-T rich sites, mithramycin binds as a dimer through Mg^{2+} coordination in the shallower and wider minor groove of a (G-C)₄ site. Mithramycin presents its oligosaccharide chains in the minor groove of GC base pairs [385]. Since its discovery, several natural analogues and synthetic derivatives were studied such as MTM-A (see below) (Figure 9), the aureolic acid analogues MTM-SK and MTM-SDK [386], or demycarosyl-3D- β -d-digitoxosyl-mithramycin SK (DIG-MSK) that is also active on SP3-driven transcription [387].

MTM was first identified as a protein/DNA inhibitor by Bartkowiak et al. who reported the decrease of a band corresponding to 43-45 kDa in the presence of MTM using densitometric tracing of SDS-PAGE of proteins from rat liver nuclear extracts. The same band was also inhibited by doxorubicin whereas ethidium bromide had no significant effect [389].

The first evidence that MTM inhibits SP1 family of transcription factors was presented by Miller's group on the SV40 early promoter, in which all six SP1 binding sites were protected from DNase I digestion by MTM binding [389]. It was then validated on c-MYC gene P1 and P2 promoters [390]. Many SP1 controlling genes were subsequently shown to be down-regulated *in vitro* and *in vivo* by MTM using EMSA, luciferase and ChIP assays. This is the case for several oncogenes such as the dihydrofolate reductase gene [391], the human collagen-alpha 1 gene, the tissue factor gene in human endometrium [392], the human *MUC2* gene [393], the carbonic anhydrase IX as an hypoxia biomarker [394], the P53 pathway gene p21Cip1/Waf1 [395], the androgen receptor gene [396] and the apoptotic gene *XIAP* in a manner associated with sensitization of cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis [397]. This is also the case for the aryl hydrocarbon receptor expression as an antioxidant enzyme [398], p73 through binding on the SP1 response element on its external promoter [399], the oncogenic transcription factor FoxM1 [400],

Ki-67 which plays a crucial role in cancer cell proliferation and regulation of cell division [401], the human TGFBI expression [402], the human xenobiotic pump ABCG2 gene associated with cisplatin-induced chemoresistance [403] or both the multidrug efflux pumps ABCG2 and ABCC1, the stemness regulators Oct-4 and Nanog and the anti-apoptotic/survival factors Bcl-2 and XIAP as evidenced using ChIP experiments, qRT-PCR and western-blotting in doxorubicin-resistant breast cancer stem cells [404]. SP1 inhibition by MTM-A was also evidenced on survivin (BIRC5) expression; a protein that inhibits programmed cell death and regulates cell division in cancer cells. Its CG-rich promoter contains several canonical SP1 binding sites. *In vivo* inhibition was monitored using *Drosophila* survivin promoter controlling the luciferase reporter expression in transfected cells and on the endogenous survivin gene [405]. More recently, MTM-A was used to inhibit *in vitro* the interaction of SP1 from K562 nuclear extracts to six putative target sequences on the raptor gene promoter as evidenced using EMSA but also *in vivo* as demonstrated using ChIP experiments. Such SP1 transcription factor inhibition results in reduces raptor gene expression as evidenced using quantitative RT-PCR and western-blot [406].

Using high throughput expression arrays A2780 human ovarian carcinoma cells treated or not with a novel mithramycin analogue DIG-MSK (demycarosyl-3D-b-D-digitoxosyl-mithramycin SK), Portugal's group recently reported that most of the inhibited genes contain a canonical SP1 response element and validated the inhibitory effect of DIG-MSK on SP1 binding to the chromatin using ChIP analysis on the XIAP, CRABP1, MDK and KCNMA1 promoters [407].

As a consequence of SP1 targeting, MTM induces anti-angiogenic effects [408,409]. Since the expression of SP1 directly correlates with the microvessel density status and the VEGF expression, treatment with MTM reduced tumor microvessel density, consistently with the down-regulation of VEGF on human pancreatic cancer, suggesting its potent activity as an antiangiogenic compound [408]. Others suggested that the anti-angiogenic activity from MTM-A treatment in myeloma results from c-MYC inhibition and P53 activation rather than direct SP1 inhibition [410]. A role of MTM in cancer stem cell targeting activity was also recently shown. Indeed, MTM-A also reduced the side population fraction and sphere forming capacities of A549 lung adenocarcinoma cell line, suggesting a role of MTM-A in targeting cancer stem cells through the regulation of the over-expressed ABCG2 in cancer stem cells [403]. Effect of MTM-A on cancer stemness was also suggested using xenografts of human colon cancer in nude mice models showing reduced cancer stem cells and induced apoptosis [411]. The use of MTM and its derivatives to kill cancer cells was evaluated in different models in link with SP1 and/or SP3 as a potent target gene, such as metastatic human gastric cancer [409], ovarian cancer for which MTM-SDK was particularly effective against orthotopic ovarian tumors by inducing a significant increase of survival and delay of tumor progression [412], glioblastoma [413], pancreatic cancer [414], metastatic prostate cancer [386], myeloma [410] and nasopharyngeal carcinoma [387]. MTM-A was also studied as a protective drug against neurodegenerative disorders [415] and recently in neuronal development [416]. Mithramycin was also evidenced as an inhibitor of the EWS-FLI1 fusion transcription factor activity but it still remains unclear whether this function results from direct inhibition of EWS-FLI1/DNA binding, SP1/DNA binding, or from both transcription factors inhibition [417]. Finally, recent findings support the binding of mithramycin to histones in the chromatin resulting in an inhibition of histone H3 acetylation at lysine 18. Since this H3K18Ac is an important signature of active chromatin, mithramycin treatment result in the modification of gene expression as evaluated using gene expression arrays in TC32 and TC71 osteosarcoma cell lines, a cancer model against which mithramycin is currently evaluated in phase II clinical trial at NIH [418].

The G/C-specific minor groove binding drug chromomycin A3 (Figure 9) is a potent DNA binding competitor for both EGR1, AP1 and TBP binding at micromolar range [218] with more potent inhibition for the GC-rich binding transcription factor EGR1 than the AT-rich binder TBP [255]. Chromomycin A3 also inhibits the complex formed by the ETS-family transcription factor ELK-1 on ETS-binding site (EBS) on the c-FOS promoter or the reference E74 promoter for ETS transcription factor DNA binding [336].

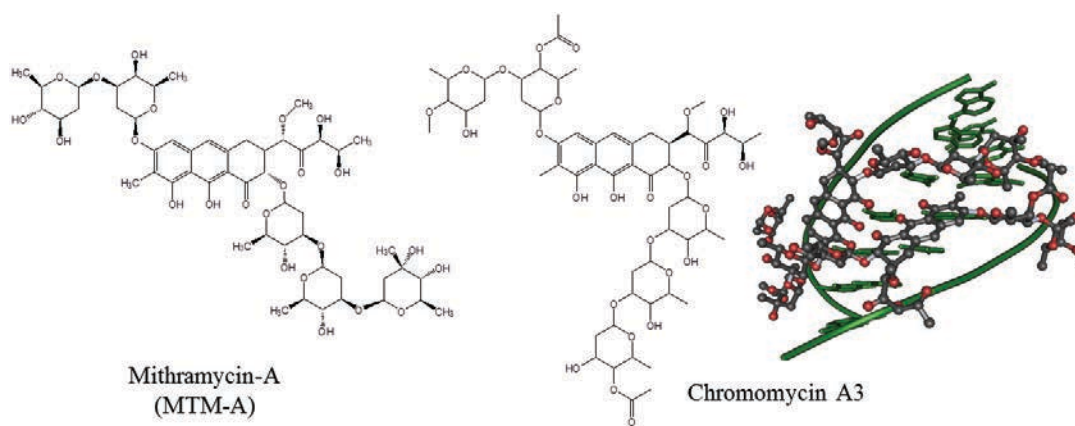


Figure 9. Mithramycins and derivatives as transcription factor/DNA binding inhibitors. The solution structure of chromomycin A3 (MMDB ID: 51773) bound in the minor groove of the DNA helix is presented on the right panel [419].

Others minor groove DNA binders

A lactam carboxamide compound, selected out of 400 molecules, was able to inhibit *in vitro* the homeobox protein HOXA13/DNA interaction (Figure 10) with an IC_{50} of 6.5 μ M. Luciferase assays showed that 40 μ M of the selected compound abolishes half of the HoxA13 potency to repress transcription [420].

Among the metal-containing DNA binders, some platinum-acridine conjugates are potent minor groove binding agent that also alkylates the DNA (through bonding to the N3 reactive position of adenines) [421]. Among them, PT-ACRAMTU [PtCl(en)(ACRAMTU)](NO₃)(2), en = ethane-1,2-diamine, where ACRAMTU = 1-[2-(acridin-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethylthiourea (Figure 10) shows strong inhibition of TBP binding to DNA [422]. This compound intercalates its acridine moiety between DNA bases, while the platinum group forms mono-adducts with DNA bases with the linking structure standing in the minor groove. Such binding induces a strong lengthening of the DNA helix (0.6 nm per intercalated molecule, probably associated with perturbation of the stacking at adjacent base pairs), as well as a DNA looping and aggregation as evidenced using atomic force microscopy [423].

The phytoestrogen tanshinone IIA (Figure 10), isolated from the root of *Salvia miltiorrhiza Bunge*, is a DNA minor groove binding on AT-rich tracks [424] and inhibits AP-1 DNA binding *in vitro* [425] and in cellular model on the AP-1-driven COX2 expression in Hs68 fibroblasts after lipopolysaccharide stimulation [426]. Tanshinone IIA also inhibits RNA polymerase II functions and triggers P53 response and apoptosis [427].

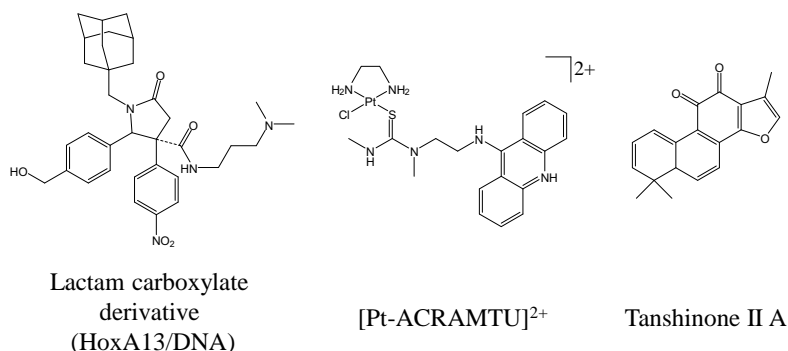


Figure 10. Other DNA minor groove ligands as transcription factor/DNA binding inhibitors.

CONCLUSION

During the last two decades, many efforts were undertaken toward the targeting of transcription factors for “gene controlled” therapies. The main therapeutic purpose for transcription factor targeting was cancer since approximately 20% of them are believed to be associated with transcription factors as key targets [23,25,26]. For a long time, transcription factors were nearly forgotten as potential clinical targets for cancer treatment: tyrosine kinases and signal transducing factors were preferred due to their direct implication in cell proliferation. Since they shared homologous DNA binding domain, and sometimes protein/protein interacting domains, transcription factors seemed to be hardly targeted independently of the other members of the same family, either at the DNA interacting surface and at the protein/protein contacts.

Although DNA itself is considered as an anti-cancer target since the beginning of cancer chemotherapies more than 60 years ago (with the use of DNA alkylating agents, anti-metabolites and then topoisomerase I/II inhibitors), this “target” is ubiquitously present in all cells (cancerous and sane) and its global targeting resulted in the well-known toxicities of those conventional chemotherapies. As a consequence of such unspecific presence, one could of course not consider targeting DNA as a “targeted chemotherapy”. However, targeting a specific function implicating the DNA could become considered as a targeted therapy if this specific function is directly associated to the tumorigenic process, such as transcription factors regulating genes for proliferation or differentiation processes. This is the case for approximately 60% of the transcription factors [23-24]. Such identification helps to define a precise transcription factor as a target for an identified pathology.

The three targeting modes presented here (direct protein binding, protein/protein and protein/DNA interface inhibition) are the main strategies for efficient and direct transcription factor inhibition. Direct protein inhibition is limited due to the limited ligand-binding surfaces or the lack of precise knowledge of the allosteric changes of a transcription factor on the DNA helix. Protein/protein interface inhibition also requires precise knowledge of the interaction domains surfaces and could particularly be offered to multimeric transcription factors, even if single transcription factor/co-factor or transcription mediator interface may also be targeted by the same approach. By contrast, DNA targeting can virtually be achieved for all types of transcription factor and mainly requires knowledge on the DNA sequence to be targeted and the structural consequences in term of protein/DNA interaction and ligand/DNA interaction. DNA targeting takes also advantage of the “jagged structure” of the DNA helix with accessibility to the major and minor grooves and inter nucleotides spaces, in opposition to the frequent amorphous nature of the protein-DNA binding domains for protein/protein interactions.

For some transcription factors, all three approaches were already evaluated. This is for instance the case for STAT3 (as specified in each section below) that is targeted using inS3-54 or C48 as allosteric inhibitors [129,130], using the peptidomimetic S3I-M2001, static, ML116 or LLL32 as PPIs [181-188] or using flavoripidol as a DNA binding drug [244].

PPIs and DNA ligands also offer opportunities for a higher level of precision in the targeting of a defined transcription factor, as illustrated in Figure 11:

PPIs can act on the interaction of a transcription factor with a specific co-factor or partner, leaving some dimers active whereas the targeted dimer interaction will be abolished (Figure 11, point 1).

DNA interacting compounds can inhibit a transcription factor :

independently on the promoter context (Figure 11, point 2),

or in a specific promoter context: compounds could target a larger DNA sequence, in the close vicinity of a transcription factor binding site, thus interfering with the transcription factor in a site-dependent manner to alter transcription on specific promoters (Figure 11, point 3).

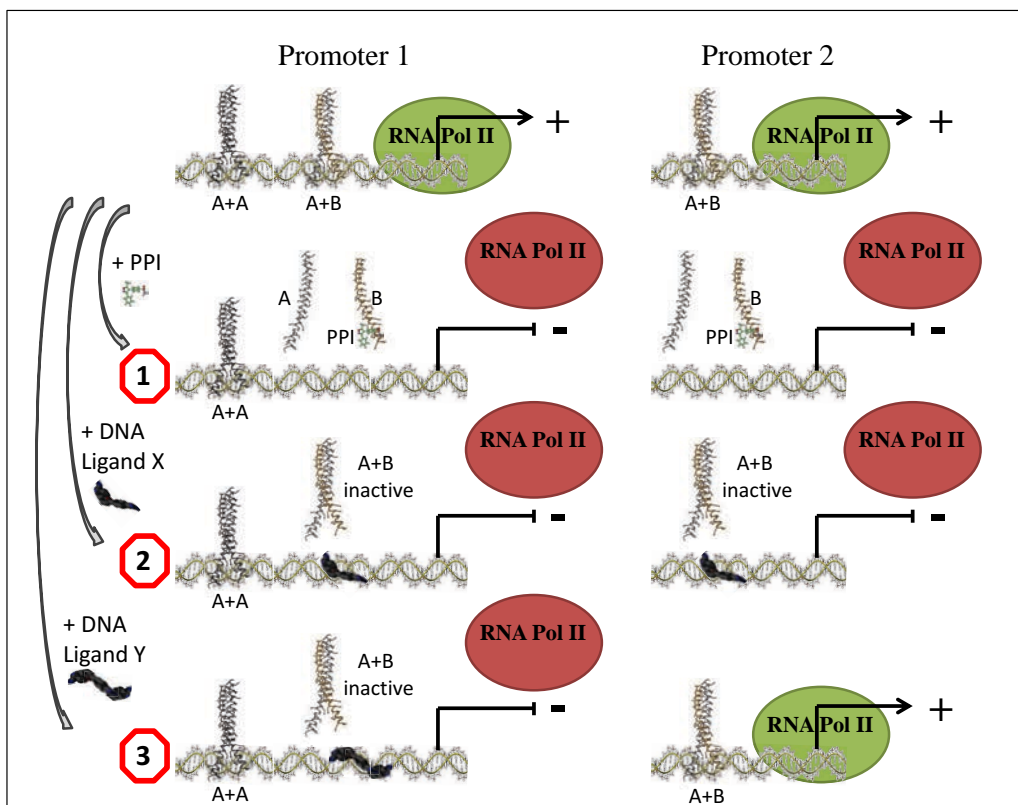


Figure 11. Protein/protein interface inhibitors versus protein/DNA binding inhibitors. Leucine zippers are used as an illustrative model using homodimers A+A or heterodimers A+B, the PPI interacting only with B. The two promoters (1 and 2) illustrate the diversity for binding sequences surrounding a common consensus site. Ligand X binds to all transcription factor consensus binding sites. Ligand H binds to a proximal longer sequence on surrounding base pairs in order to inhibit some, but not all, of the defined transcription factor binding sites.

At the chemical level, longer DNA binding ligands need to be developed in the future in order to gain in DNA sequence selectivity and target specificity. Similarly, more specific PPIs are required to block only one protein/protein interface and not the similar interfaces between proteins from the same transcription factor or co-factor families.

Many other options for therapeutic opportunities are offered to directly or indirectly target the transcription activity with more indirect approaches such as compounds that induce degradation of an identified transcription factor or its activators/inhibitors. This is the case for deazaflavins that target MDM2 E3 ubiquitin ligase activity resulting in P53 degradation [144], SP141 which also binds to MDM2 but favor auto-ubiquitinylation and proteasome degradation [145] and BRD32048 that binds to ETV1 to block its acetylation, thus leading to its degradation [134]. By contrast, another indirect access to transcription changes can be obtained by stabilizing the binding of transcription factors, as presented for NSC13728 that specifically stabilizes MAX homodimers though binding to bHLH/leucine zipper junction thus reducing the formation of MYC/MAX heterodimers [162] and for the compounds that induce JUNK phosphorylation, resulting in JUN-D transcription factor inactivity [194].

Another major way to interfere with transcription is to act at the epigenetic level [10,11]. This is exemplified here by the triazolobenzo-1,4-diazepines (+)-JQ1, I-BET-762 and I-BET-151 that inhibits BRD4/PTEF-b interaction to maintain the chromatin in its closed form [163]. This regulation could also be achieved by DNA methyl transferases (DNMT), histone acetyl transferase (HAT) or histone deacetyl transferase (HDAC) inhibitors (recently reviewed in [428-433]). Similarly, nucleic acids-based drugs like

decoy DNAs, aptamers and DNA mimic peptides represent interesting alternatives in order to selectively block transcription factor activities [132, 434-437].

Finally, the future of transcription factor targeting will surely take advantage of an increased knowledge of the precise modalities of transcription factor complex formation and/or DNA binding and of global analysis of transcription factors and co-factors using high throughput analysis and next-generation sequencing (ChIP-seq, DNase-Seq, RNase-seq, SELEX-seq, ChIA-Pet, methylome, transcriptome and exosome analyses...).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), the SIRIC ONCOLille and the Fondation de France for a post-doctoral fellowship to Dr M.A. Bouhrel and the University of Lille for a PhD fellowship to M. Lambert. The work is supported by grants from the Ligue contre le Cancer, Comité du Nord and IRCL.

References

- [1] Travers, A.; Drew H. DNA recognition and nucleosome[14] Vallaster, M.; Vallaster, C.D.; Wu, S.M. Epigenetic organization. *Biopolymers*, 1997, 44(4), 423-433. mechanisms in cardiac development and disease. *Acta.*
- [2] Stros, M. HMGB proteins: interactions with DNA andBiochim. Biophys. Sin., 2012, 44(1), 92-102. chromatin. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1799(1-2), 101-[15] Kim, M.H.; Bae, J.S.; Kim, T.H.; Park, J.M.; Ahn, H.H. 113. Role of transcription factor modifications in the pathogenesis
- [3] de Graaf, C.A.; van Steensel, B. Chromatin organization:of insulin resistance. *Exp. Diabetes. Res.*, 2012, 2012, 716425. form to function. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2013, 23(2), 185-[16] Jiang, H.; Zhang, H.; Meng, F.; Lian, B.; Chen, X.; Yu, 190. X.; Dai, E.; Wang, S.; Liu, X.; Li, X.; Wang, L.; Li, X.
- [4] Matzat, L.H.; Lei, E.P. Surviving an identity crisis: aldentification of active transcription factor and miRNA revised view of chromatin insulators in the genomics era.regulatory pathways in Alzheimer's disease. *Bioinformatics*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2014, 1839(3), 203-214. 2013, 29(20), 2596-2602.
- [5] Biterge, B.; Schneider, R. Histone variants: key players of[17] Schwenk, R.H.; Vogel, H.; Schürmann, A. Genetic and chromatin. *Cell. Tissue Res.*, 2014, 356(3), 457-466. epigenetic control of metabolic health. *Mol. Metab.*, 2013,
- [6] Jolma, A.; Yan, J.; Whittington, T.; Toivonen, J.; Nitta,2(4), 337-347. K.R.; Rastas, P.; Morgunova, E.; Enge, M.; Taipale, M.; Wei,[18] Haria, D.; Naora, H. Homeobox Gene Deregluation: G.; Palin, K.; Vaquerizas, J.M.; Vincentelli, R.; Luscombe,Impact on the hallmarks of cancer. *Cancer. Hallm.*, 2013, 1(2-N.M.; Hughes, T.R.; Lemaire, P.; Ukkonen, E.; Kivioja, T.;3), 67-76. Taipale, J. DNA-binding specificities of human transcription[19] Kar, A.; Gutierrez-Hartmann, A. Molecular mechanisms factors. *Cell*, 2013, 152(1-2), 327-339. of ETS transcription factor-mediated tumorigenesis. *Crit. Rev.*
- [7] Schleif, R.F. Modulation of DNA binding by gene-specificBiochem. Mol. Biol., 2013, 48(6), 522-543. transcription factors. *Biochemistry*, 2013, 52(39), 6755-6765. [20] Yaniv, M. Chromatin remodeling: from transcription to
- [8] Müller, F.; Tora, L. Chromatin and DNA sequences incancer. *Cancer Genet.*, 2014, 207(9), 352-357. defining promoters for transcription initiation. *Biochim.[21] Valor, L.M. Transcription, epigenetics and ameliorative Biophys. Acta*, 2014, 1839(3), 118-128. strategies in Huntington's disease: a genome-wide perspective.
- [9] Weingarten-Gabbay S.; Segal, E. The grammar ofMol. Neurobiol., 2015, 51(1), 406-423. transcriptional regulation. *Hum. Genet.*, 2014, 133(6), 701-[22] Sarris, M.; Nikolaou, K.; Talianidis, I. Context-specific 711. regulation of cancer epigenomes by histone and transcription
- [10] Spitz, F.; Furlong, E.E. Transcription factors: fromfactor methylation. *Oncogene*, 2014, 33(10), 1207-1217. enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.*,[23] Vaquerizas, J.M.; Kummerfeld, S.K.; Teichmann, S.A.; 2012, 13(9), 613-626. Luscombe, N.M. A census of human transcription factors:
- [11] Woringer, M.; Darzacq, X.; Izeddin I. Geometry of thefunction, expression and evolution. *Nat. Rev. Genet.*, 2009, nucleus: a perspective on gene expression regulation. *Curr.10(4), 252-263. Opin. Chem. Biol.*, 2014, 20C, 112-119. [24] Zhang, H.M.; Chen, H.; Liu, H.; Liu, H.; Gong, J.; Wang,
- [12] Haberle, V.; Li, N.; Hadzhiev, H.; Plessy, C.; Previti, C.;H.; Guo, A.H. Animal TFDB: a comprehensive animal Nepal, C.; Gehrig, J.; Dong, X.; Akalin, A.; Suzuki, A.M.; vantranscription factor database. *Nucleic Acids Res.*, 2012, 40, IJcken, H.F.; Armant, O.; Ferg, M.; Strähle, U.; Carninci, P.;D144-149. Müller, F.; Lenhard, B. Two independent transcription[25] Furney, S.J.; Higgins, D.G.; Ouzounis, C.A.; López- initiation codes overlap on vertebrate core promoters. *Nature*,Bigas, N. Structural and functional properties of genes 2014, 507(7492), 381-385. involved in human cancer. *BMC Genomics*, 2006, 7-3.
- [13] Kholodenko, B.N.; Hancock, J.F.; Kolch, H. Signalling [26] Farnham, P.J. Insights from genomic profiling of ballet in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2010,transcription factors. *Nat. Rev. Genet.*, 2009, 10(9), 605-616. 11(6), 414-426. [27] Badis, G.; Berger, M.F.; Philippakis, A.A.; Talukder, S.; Gehrke, A.R.; Jaeger, S.A.; Chan, E.T.; Metzler, G.; Vedenko,

A.; Chen, X.; Kuznetsov, H.; Wang C.F.; Coburn, D.;[44] Stott, K.; Tang, G.S.; Lee, K.B.; Thomas, J.O. Structure of a complex of tandem HMG boxes and DNA. *J. Mol. Biol.*, 2006, 360(1), 90-104.

Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science*, 2009, 324(5935), 1720-1723.

[45] Huth, J.R.; Bewley, C.A.; Nissen, M.S.; Evans, J.N.; [28] Bernstein, B.E.; Birney, E.; Dunham, I.; Green, E.D.; Reeves, R.; Gronenborn, A.M.; Clore, G.M. The solution structure of an HMG-I(H)-DNA complex defines a new integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012, 489(7414), 57-74.

[29] Privalov, P.L.; Dragan, A.I.; Crane-Robinson, C.;[46] Rice, P.A.; Yang, S.; Mizuuchi, K.; Nash, H.A. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-proteins into the major or minor grooves of DNA? *J. Mol. Biol.*, 1996, 266(1), 1-9.

[47] Dickerson, R.E. DNA bending: the prevalence of [30] Glover, J.N.; Harrison, S.C. Crystal structure of the heterodimeric bzip transcription factor c-fos-c-jun bound to DNA. *Nature*, 1995, 373(6511), 257-261.

[31] Nair, S.K.; Burley, S.K. X-ray structures of Myc-Max structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA and Mad-Max recognizing DNA. *Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors*. *Cell*, 1996, 87(7), 1295-1306.

[48] Kim, J.L.; Nikolov, D.B.; Burley, S.K. Crystal structure of a human [32] Zheng, N.; Fraenkel, E.; Pabo, C.O.; Pavletich, N.P. TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1996, 93(10), 4862-4867.

[50] Pontiggia, A.; Rimini, R.; Harley, V.R.; Goodfellow, P.N.; Lovell-Badge, R.; Bianchi, M.E. Sex-reversing cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev.*, 1999, 13(6), 666-674.

[33] Garvie, C.H.; Hagman, J.; Wolberger, C. Structural studies of Ets-1/Pax5 complex formation on DNA. *Mol. Cell*, 1994, 13(24), 6115-6124.

[51] Lorenz, M.; Hillisch, A.; Payet, D.; Buttinelli, M.; [34] Chen, X.; Vinkemeier, U.; Zhao, H.; Jeruzalmi, D.; Travers, A.; Diekmann, S. DNA bending induced by high phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*, 1998, 93(5), 827-839.

[52] McCauley, M.J.; Zimmerman, J.; Maher, L.J.; Williams, [35] Muller, C.H.; Rey, F.A.; Sodeoka, M.; Verdine, G.L.; Harrison, S.C. Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature*, 1995, 373(6512), 311-317.

[53] King, C.H.; Weiss, M.A. The SRY high-mobility-group [36] Emamzadah, S.; Tropicia, L.; Halazonetis, T.D. Crystal structure of a multidomain human P53 tetramer bound to the groove: a topological mechanism of sequence specificity. *Mol. Cell*, 2011, 9(11), 1493-1499.

[54] Suzuki, M. The heptad repeat in the largest subunit of [37] Ades, S.E.; Sauer, R.T. Specificity of minor-groove and major-groove interactions in a homeodomain-DNA complex. *Biochemistry*, 1995, 34(44), 14601-14608.

[55] Jothi, R.; Cuddapah, S.; Barski, A.; Cui, K.; Zhao, K. [38] Dragan, A.I.; Li, Z.; Makeyeva, E.N.; Milgotina, E.L.; Liu, H.; Crane-Robinson, C.; Privalov, P.L. Forces driving the binding of homeodomains to DNA. *Biochemistry*, 2006, 45(1), 141-151.

[56] Geertz, M.; Maerkl, S.J. Experimental strategies for [39] Laronde-Leblanc, N.A.; Wolberger, C. Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev.*, 2003, 17(16), 2060-2072.

[57] MacQuarrie, K.L.; Fong, A.P.; Morse, R.H.; Tapscott, S.J. Genome-wide transcription factor binding: beyond direct [40] Chen, H.; Bates, D.L.; Dey, R.; Chen, P.H.; Machado, A.C.; Laird-Offringa, I.A.; Rohs, R.; Chen, L. DNA binding by GATA transcription factor suggests mechanisms of looping and long-range gene regulation. *Cell Rep.*, 2012, 2(5), 1197-1206.

[59] Shu, H.; Chen, H.; Bo, X.; Wang, S. Genome-wide [41] Nardini, M.; Gnesutta, N.; Donati, G.; Gatta, R.; Forni, C.; Fossati, A.; Vornrhein, C.; Moras, D.; Romier, C.; Bolognesi, M.; Mantovani, R. Sequence-specific transcription factor NF-H displays histone-like DNA binding and ubiquitination. *Cell*, 2013, 152(1-2), 132-143.

[60] Neph, S.; Vierstra, J.; Stergachis, A.B.; Reynolds, A.P.; [42] Remenyi, A.; Tomilin, A.; Pohl, E.; Lins, K.; Philippsen, A.; Reinbold, R.; Scholer, H.R.; Wilmanns, M. Differential dimer activities of the transcription factor Oct-1 by DNA-induced interface swapping. *Mol. Cell*, 2001, 8(3), 569-580.

V.; Dunn, D.; Neri, J.; Schafer, A.; Hansen, R.S.; Kutayavin, [43] Juo, Z.S.; Chiu, T.K.; Leiberman, P.M.; Baikalov, I.; Giste, E.; Weaver, M.; Canfield, T.; Sabo, P.; Zhang, M.; Berk, A.J.; Dickerson, R.E. How proteins recognize the TATA box. *J. Mol. Biol.*, 1996, 261(2), 239-254.

Bender, M.A.; Groudine, M.; Kaul, R.; Stamatoyannopoulos J.A. An expansive human regulatory lexicon encoded in

transcription factor footprints. *Nature*, 2012, 489(7414), 83-90.

[60] Mechta-Grigoriou, F.; Gerald, D.; Yaniv, M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene*, 2001, 20(19), 2378-2389.

[61] Chumsakul, O.; Nakamura, K.; Kurata, T.; Sakamoto, T.; Hobman, J.L.; Ogasawara, N.; Oshima, T.; Ishikawa, S.; High-Xu, X.; Bieda, M.; Jin, V.X.; Rabinovich, A.; Oberley, resolution mapping of in vivo genomic transcription factor binding sites using in situ DNase I footprinting and ChIP-seq. *Analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells DNA Res.*, 2013, 20(4), 325-338.

[62] Inoue, K.; Imai, H. Identification of novel transcription factors in osteoclast differentiation using genome-wide analysis of open chromatin determined by DNase-seq. *J. Bone Miner. Res.* 2014, (8), 1823-1832.

[63] Jolma, A.; Kivioja, T.; Toivonen, J.; Cheng, L.; Wei, G.; Enge, M.; Taipale, M.; Vaquerizas, J.M.; Yan, J.; Sillanpää, M.J.; Bonke, M.; Palin, K.; Talukder, S.; Hughes, T.R.; Luscombe, N.M.; Ukkonen, E.; Taipale, J. Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities. *Genome Res.*, 2010, 20(6), 861-873.

[64] Jolma, A.; Yan, J.; Whittington, T.; Toivonen, J.; Nitta, K.R.; Rastas, P.; Morgunova, E.; Enge, M.; Taipale, M.; Wei, G.; Palin, K.; Vaquerizas, J.M.; Vincentelli, R.; Luscombe, Simon, M.C. PU.1 exhibits partial functional redundancy with N.M.; Hughes, T.R.; Lemaire, P.; Ukkonen, E.; Kivioja, T.; Spi-B, but not with Ets-1 or Elf-1. *Blood*, 2001, 97(9), 2908-2912.

[65] Gu, G.; Wang, T.; Yang, H.; Xu, X.; Wang, J. An improved SELEX-Seq strategy for characterizing transcription factor binding specificity: NF- κ B as an example. *PLoS One*, 2013, 8(10), e76109.

[66] Schröder, A.; Eichner, J.; Supper, J.; Eichner, J.; Wanke, D.; Henneges, C. Predicting DNA-binding specificities of eukaryotic transcription factors. *PLoS One*, 2010, 5(11), e13876.

[67] Lee, C.; Huang, C.H. LASAGNA-Search: an integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization. *Biotechniques*, 2013, 54(3), 141-153.

[68] Sebastian, A.; Contreras-Moreira, B. footprintDB: a database of transcription factors with annotated cis elements and binding interfaces. *Bioinformatics*, 2014, 30(2), 258-265.

[69] Yang, L.; Zhou, T.; Dror, I.; Mathelier, A.; Wasserman, H.H.; Gordân, R.; Rohs, R. TFBSshape: a motif database of DNA shape features of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42, D148-155.

[70] Liu, F.; Miranda-Saavedra, D. rTRM-web: a web tool for predicting transcriptional regulatory modules for ChIP-seq-ed transcription factors. *Gene*, 2014, 546(2), 417-420.

[71] Worsley Hunt, R.; Mathelier, A.; Del Peso, L.; Wasserman H.H. Improving analysis of transcription factor binding sites within ChIP-Seq data based on topological motif enrichment. *BMC Genomics*, 2014, 15, 472.

[72] May, G.; Soneji, S.; Tipping, A.J.; Teles, J.; McGowan, S.J.; Wu, M.; Guo, H.; Fugazza, C.; Brown, J.; Karlsson, G.; Pina, C.; Olariu, V.; Taylor, S.; Tenen, D.G.; Peterson, C.; Enver, T. Dynamic analysis of gene expression and genome-wide transcription factor binding during lineage specification of multipotent progenitors. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6), 754-768.

[73] Ombrello, M.J.; Sikora, K.A.; Kastner, D.L. Genetics, genomics, and their relevance to pathology and therapy. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2014, 28(2), 175-189.

[74] Karczewski, K.J.; Snyder, M.; Altman, R.B.; Tatonetti, N.P. Coherent functional modules improve transcription factor target identification, cooperativity prediction, and disease association. *PLoS Genet.*, 2014, 10(2), e1004122.

[75] Barrilleaux, B.L.; Burow, D.; Lockwood, S.H.; Yu, A.; Segal, D.J.; Knoepfler, P.S. Miz-1 Activates Gene Expression via a Novel Consensus DNA Binding Motif. *PLoS One*, 2014, 9(7), e101151.

[76] Bei, L.; Lu, H.; Eklund, E.A. HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91Phox during myeloid differentiation. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280(13), 12359-12370.

[77] Boucherat, O.; Montaron, S.; Bérubé-Simard, F.A.; Aubin, J.; Philippidou, P.; Wellik, D.M.; Dasen, J.S.; Jeannotte, L. Partial functional redundancy between Hoxa5 and Hoxb5 paralog genes during lung morphogenesis. *Am. J. Physiol.*, 1997, 173(2), 168-177.

[78] Magli, M.C.; Largman, C.; Lawrence, H.J. Effects of HOXA9 homeobox genes in blood cell differentiation. *J. Cell Physiol.*, 1997, 173(2), 168-177.

[79] Garrett-Sinha, L.A.; Dahl, R.; Rao, S.; Barton, K.P.; Simon, M.C. PU.1 exhibits partial functional redundancy with Spi-B, but not with Ets-1 or Elf-1. *Blood*, 2001, 97(9), 2908-2912.

[80] Boros, J.; O'Donnell, A.; Donaldson, I.J.; Kasza, A.; Sharrocks, A.D. Overlapping promoter targeting by DNA-Elk-1 and other divergent ETS-domain transcription factor members. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37(22), 7368-7380.

[81] Wei, G.H.; Badis, G.; Berger, M.F.; Kivioja, T.; Palin, D.; Henneges, C. Zell A. Predicting DNA-binding specificities of eukaryotic transcription factors. *PLoS One*, 2010, 5(11), AR. Yan, J.; Talukder, S.; Turunen, M.; Taipale, M.; Stunnenberg, H.G.; Ukkonen, E.; Hughes, T.R.; Bulyk, M.L.; Taipale, J.; Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. *EMBO J.*, 2010, 29(13), 2147-2160.

[82] Goi, C.; Little, P.; Xie, C. Cell-type and transcription factor specific enrichment of transcriptional cofactor motifs in ENCODE ChIP-seq data. *BMC Genomics*, 2013, 14(Suppl 5):S2.

[83] Liu, P.H.; Hsieh, T.H.; Liu, S.T.; Chang, H.L.; Lin, H.S.; Wang, H.M.; Huang, S.M. Zac1, an Sp1-like protein, regulates human p21(WAF1/Cip1) gene expression in HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, 2011, 317(20), 2925-2937.

[84] Erdel, F.; Krug, J.; Langst, G.; Rippe, K. Targeting chromatin remodelers: signals and search mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011, 1809(9), 497-508.

[85] Magnani, L.; Eeckhoutte, J.; Lupien, M. Pioneer factors: directing transcriptional regulators within the chromatin environment. *Trends Genet.*, 2011, 27(11), 465-474.

[86] Zaret, K.S.; Carroll, J.S. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev.*, 2011, 25(21), 2227-2241.

[87] Cirillo, L.A.; Zaret, K.S. Specific interactions of the wingless transcription factor with DNA. *J. Mol. Biol.*, 2007, 366(3), 720-724.

[88] Guemes, M.; Bailey, S.; Anaya, M.; Peault, B.; Krum, S.A. GATA4 regulates estrogen receptor-alpha-mediated osteoblast transcription. *Mol. Endocrinol.*, 2011, 25(7), 1126-1136.

[89] Carroll, J.S. Pioneer factors in hormone-dependent cancers. *Nature Rev. Cancer*, 2012, 12(6), 381-385.

[90] Wu, D.; Sunkel, B.; Chen, Z.; Liu, X.; Ye, Z.; Li, Q.; Grenade, C.; Ke, J.; Zhang, C.; Chen, H.; Nephew, K.P.; Huang, T.H.; Liu, Z.; Jin, V.X.; Wang, Q. Three-tiered role of the pioneer factor GATA2 in promoting androgen-dependent gene expression in prostate cancer. *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42(6), 3607-3622.

[93] Chiang, H.T.; Wang, K.; Fazli, L.; Qi, R.Z.; Gleave, [109] Schlereth, K.; Heyl, C.; Krampitz, A.M.; Mernberger, M.E.; Collins, C.C.; Gout, P.H.; Wang, H. GATA2 as aM.; Finkernagel, F.; Scharfe M, Jarek M, Leich E, Rosenwald potential metastasis-driving gene in prostate cancer.A, Stiewe T. Characterization of the P53 cistrome-DNA Oncotarget, 2014, 5(2), 451-461. binding cooperativity dissects P53's tumor suppressor

[94] Buecker, C.; Srinivasan, R.; Wu, Z.; Calo, E.; Acampora, functions. PLoS Genet., 2013, 9(8), e1003726.

D.; Faial, T.; Simeone, A.; Tan, M.; Swigut, T.; Wysocka, J.[110] Welman, A.; Barraclough, J.; Dive, C. Tetracycline Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to regulated systems in functional oncogenomics. Transl primed pluripotency. Cell Stem Cell, 2014, 14(6), 838-853. Oncogenomics, 2007, 2, 17-33.

[95] Jerabek, S.; Merino, F.; Schöler, H.R.; Cojocaru, V.[111] Grimwade, D.; Mistry, A.R.; Solomon, E.; Guidez, F. OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for differentiation pluripotency. Biochim. Biophys. Acta., 2014, 1839(3), 138-therapy. Cancer Treat. Res., 2010, 145, 219-235.

154. [112] Mukhopadhyay, J.; Das, K.; Ismail, S.; Koppstein, D.;

[96] Reiprich, S.; Wegner, M. From CNS stem cells to Jang, M.; Hudson, B.; Sarafianos, S.; Tuske, S.; Patel, J.; neurons and glia: Sox for everyone. Cell Tissue Res., 2014. Jansen, R.; Irschik, H.; Arnold, E.; Ebright, R.H. The RNA 359(1):111-24. polymerase "switch region" is a target for inhibitors. Cell,

[97] Huang, H.; Sitwala, K.; Bronstein, J.; Sanders, D.; 2008, 135(2), 295-307.

Dandekar, M.; Collins, C.; Robertson, G.; MacDonald, J.; [113] Tupin, A.; Gualtieri, M.; Brodolin, K.; Leonetti, J.P. Cezard, T.; Bilenky, M.; Thiessen, N.; Zhao, H.; Zeng, T.; Myxopyronin: a punch in the jaws of bacterial RNA Hirst, M.; Hero, A.; Jones, S.; Hess, J.L. Identification and polymerase. Future Microbiol., 2009, 4(2), 145-149.

characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. [114] Sahner, J.H.; Groh, M.; Negri, M.; Hauptenthal, J.; Blood, 2012, 119(2), 388-398. Hartmann, R.H. Novel small molecule inhibitors targeting the

[98] Roe, J.S.; Vakoc, C.R. C/EBP α : critical at the origin of "switch region" of bacterial RNAP: structure-based leukemic transformation. J. Exp. Med., 2014, 211(1), 1-4. optimization of a virtual screening hit. Eur. J. Med. Chem.,

[99] Barozzi, I.; Simonatto, M.; Bonifacio, S.; Yang, L.; Rohs, 2013, 65, 223-231.

R.; Ghisletti, S.; Natoli, G. Coregulation of Transcription [115] Fruth, M.; Plaza, A.; Hinsberger, S.; Sahner, J.H.; Factor Binding and Nucleosome Occupancy through DNA Hauptenthal, J.; Bischoff, M.; Jansen, R.; Müller, R.; Features of Mammalian Enhancers. Mol. Cell., 2014, 54(5), Hartmann, R.H. Binding mode characterization of novel RNA 844-857. polymerase inhibitors using a combined biochemical and

[100] Wang, S.; Linde, M.H.; Munde, M.; Carvalho, V.D.; NMR approach. ACS Chem Biol., 2014, 9(11), 2656-2663.

Wilson, H.D.; Poon, G.M. Mechanistic Heterogeneity in Site [116] Yakushiji, F.; Miyamoto, H.; Kunoh, H.; Okamoto, R.; Recognition by the Structurally Homologous DNA-Binding Nakaminami, H.; Yamazaki, H.; Noguchi, N.; Hayashi, H. Domains of the ETS-Family Transcription Factors Ets-1 and Novel hybrid-type antimicrobial agents targeting the switch PU.1. J Biol. Chem., 2014, 289(31), 21605-21616. region of bacterial RNA polymerase. ACS. Med. Chem. Lett.,

[101] Wang, G.G.; Pasillas, M.P.; Kamps, M.P. Persistent 2013, 4(2), 220-224.

transactivation by meis1 replaces hox function in myeloid [117] Tang, H.; Liu, S.; Degen, D.; Ebright R.H.; Prusovn leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of meis1-E.V. Synthesis and evaluation of novel analogues of pbx and hox-pbx complexes on promoters of leukemia-ripostatins. Chemistry, 2014, 20(38), 12310-12319.

associated genes. Mol. Cell. Biol., 2006, 26(10), 3902-3916. [118] Srivastava, A.; Talaue, M.; Liu, S.; Degen, D.; Ebright,

[102] Longobardi, E.; Penkov, D.; Mateos, D.; De Florian, G.; R.H.; Sineva, E.; Chakraborty, A.; Druzhinin, S.H.; Torres, M.; Blasi, F. Biochemistry of the tale transcription Chatterjee, S.; Mukhopadhyay, J.; Ebright, H.H.; Zozula, A.; factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. Dev. Dyn., Shen, J.; Sengupta, S.; Niedfeldt, R.R.; Xin, C.; Kaneko, T.; 2014, 243(1), 59-75. Irschik, H.; Jansen, R.; Donadio, S.; Connell, N.; Ebright,

[103] Choe, S.K.; Ladam, F.; Sagerström, C.G. TALE factors R.H. New target for inhibition of bacterial RNA polymerase: poised promoters for activation by Hox proteins. Dev. Cell., 'switch region'. Curr. Opin. Microbiol., 2011, 14(5), 532-543. 2014, 28(2), 203-211. [119] Schäberle, T.F.; Mir Mohseni, M.; Lohr, F.; Schmitz,

[104] Heinz, S.; Benner, C.; Spann, N.; Bertolino, E.; Lin, A.; König, G.M. Function of the loading module in CorI and H.C.; Laslo, P.; Cheng, J.X.; Murre, C.; Singh, H.; Glass, C.K. of the O-methyltransferase CorH in vinyl carbamate Simple combinations of lineage-determining transcription biosynthesis of the antibiotic coralopyronin A. Antimicrob. factors prime cis-regulatory elements required for macrophage Agents Chemother., 2014, 58(2), 950-956.

and B cell identities. Mol. Cell. 2010, 38(4), 576-589. [120] Agyeman, A.; Jha, B.K.; Mazumdar, T.; Houghton, J.A.

[105] Choukallah, M.A.; Matthias, P. The interplay between Mode and specificity of binding of the small molecule chromatin and transcription factor networks during B cell GANT61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding. development: Who pulls the trigger first? Front. Immunol., Oncotarget, 2014, 5(12), 4492-4503. 2014, 5, 156. [121] Shahi, M.H.; Holt, R.; Rebhun, R.B. Blocking signaling

[106] Bailey, T.L.; Machanick, P. Inferring direct DNA at the level of GLI regulates downstream gene expression and binding from ChIP-seq. Nucleic Acids Res., 2012, 40(17), inhibits proliferation of canine osteosarcoma cells. PLoS One, e128. 2014, 9(5), e96593.

[107] Lesiak, A.; Pelz, C.; Ando, H.; Zhu, M.; Davare, M.; [122] Ghezali, L.; Liagre, B.; Limami, H.; Beneytout, J.L.; Lambert, T.J.; Hansen, K.F.; Obrietan, K.; Appleyard, S.M.; Leger, D.H. Sonic Hedgehog activation is implicated in Impey, S.; Wayman, G.A. A genome-wide screen of CREB diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of human occupancy identifies the RhoA inhibitors Par6C and Rnd3 in erythroleukemia cells. PLoS One, 2014, 9(4), e95016.

regulators of BDNF-induced synaptogenesis. PLoS One, 2013, [123] Yan, R.; Peng, X.; Yuan, X.; Huang, D.; Chen, J.; Lu, 8(6), e64658. Q.; Lv, N.; Luo, S. Suppression of growth and migration by

[108] Xing, H.; Zhou, F.; Wang, J. Subset of genes targeted by blocking the Hedgehog signaling pathway in gastric cancer transcription factor NF- κ B in TNF α -stimulated human HeLa cells. Cell Oncol., 2013, 36(5), 421-435. cells. Funct. Integr. Genomics, 2013, 13(1), 143-154.

[124] Matsumoto, T.; Tabata, K.; Suzuki, T. The GANT61, a [138] Zache, N.; Lambert, J.M.; Rökaeus, N.; Shen, J.; GLI inhibitor, induces caspase-independent apoptosis of SK-Hainaut, P.; Bergman, J.; Wiman, K.G.; Bykov, V.J.; Mutant N-LO cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2014, 37(4), 633-641. P53 targeting by the low molecular weight compound [125] Huang, L.; Walter, V.; Hayes, D.N.; Onaitis, M.STIMA-1. *Mol. Oncol.*, 2008, 2(1), 70-80. Hedgehog-GLI signaling inhibition suppresses tumor growth [139] Lambert, J.M.; Gorzov, P.; Vepintsev D.B.; Söderqvist, in squamous lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2014, 20(6), M.; Segerbäck, D.; Bergman, J.; Fersht A.R.; Hainaut, P.; 1566-1575. Wiman, K.G.; Bykov, V.J. PRIMA-1 reactivates mutant P53 [126] Moshai, E.F.; Wémeau-Stervinou, L.; Cigna, N.; Brayer, by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell*, 2009, S.; Sommé, J.M.; Crestani, B.; Mailleux, A.A. Targeting the 15(5), 376-388. hedgehog-glioma-associated oncogene homolog pathway [140] Fiorini, C.; Cordani, M.; Padroni, C.; Blandino, G.; Di inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Am. J. Agostino, S.; Donadelli, M. Mutant P53 stimulates Respir. Cell Mol. Biol.*, 2014, 51(1), 11-25. chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma cells to [127] Chen, Q.; Xu, R.; Zeng, C.; Lu, Q.; Huang, D.; Shi, C.; gemcitabine. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2015, 1853(1), 89-100. Zhang, H.; Deng, L.; Yan, R.; Rao, H.; Gao, G.; Luo, S. [141] Chuang, H.C.; Yang, L.P.; Fitzgerald, A.L.; Osman, A.; Down-regulation of Gli transcription factor leads to the Woo, S.H.; Myers, J.N.; Skinner, H.D. The P53-reactivating inhibition of migration and invasion of ovarian cancer cells via small molecule RITA induces senescence in head and neck integrin β 4-mediated FAK signaling. *PLoS One*, 2014, 9(2), cancer cells. *PLoS One*, 2014, 9(8), e104821. e88386. [142] Izetti, P.; Hautefeuille, A.; Abujamra, A.L.; de Farias, [128] Wang, J.; Gu, S.; Huang, J.; Chen, S.; Zhang, Z.; Xu, M.C.B.; Giacomazzi, J.; Alemar, B.; Lenz, G.; Roesler, R.; Inhibition of autophagy potentiates the efficacy of GliSchwartzmann, G.; Osvaldt, A.B.; Hainaut, P.; Ashton-Prolla, inhibitor GANT-61 in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *P. PRIMA-1, a mutant P53 reactivator, induces apoptosis and BMC Cancer*, 2014, 14, 768. enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer [129] Huang, H.; Dong, Z.; Wang, F.; Peng, H.; Liu, J.H.; cell lines. *Invest. New Drugs*, 2014, 32(5), 783-794. Zhang, J.T. A small molecule compound targeting STAT3 [143] Zandi, R.; Selivanova, G.; Christensen, C.L.; Gerds, DNA-binding domain inhibits cancer cell proliferation, T.A.; Willumsen, B.M.; Poulsen, H.S. PRIMA-1Met/APR-246 migration, and invasion. *ACS. Chem. Biol.*, 2014, 9(5), 1188-induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung 1196. cancer expressing mutant P53. *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17(9), [130] Buettner, R.; Corzano, R.; Rashid, R.; Lin, J.; Senthil, 2830-2841. M.; Hedvat, M.; Schroeder, A.; Mao, A.; Herrmann, A.; Yim, [144] Yang, H.; Ludwig, R.L.; Jensen, J.P.; Pierre, S.A.; J.; Li, H.; Yuan, H. C.; Yakushijin, K.; Yakushijin, F.; Medaglia, M.V.; Davydov, I.V.; Safiran, H.J.; Oberoi, P.; Vaidehi, N.; Moore, R.; Gugiu, G.; Lee, T. D.; Yip, R.; Chen, Kenten, J.H.; Phillips, A.C.; Weissman, A.M.; Vousden, K.H. H.; Jove, R.; Horne, D.; Williams, J. C. Alkylation of cysteine small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity 468 in Stat3 defines a novel site for therapeutic development. *Stabilize and activate P53 in cells. Cancer Cell*, 2005, 7(6), *ACS Chem. Biol.*, 2011, 6(5), 432-443. 547-559. [131] Don-Doncow, N.; Escobar, Z.; Johansson, M.; [145] Wang, H.; Qin, J.J.; Voruganti, S.; Wang, M.H.; Kjellström, S.; Garcia, V.; Munoz, E.; Sterner, O.; Bjartell, A.; Sharma, H.; Patil, S.; Zhou, J.; Wang, H.; Mukhopadhyay, D.; Hellsten, R. Galiellalactone is a direct inhibitor of the Buolamwini, J.K.; Zhang, R. Identification of a new class of transcription factor STAT3 in prostate cancer cells. *J. Biol. MDM2 inhibitor that inhibits growth of orthotopic pancreatic Chem.*, 2014, 289(23), 15969-15978. tumors in mice. *Gastroenterology*, 2014, 147(4), 893-902. [132] Weber, A.; Borghouts, C.; Brendel, C.; Moriggl, R.; [146] Khoury, K.; Dömling, A. P53 mdm2 inhibitors. *Curr. Delis, N.; Brill, B.; Vafaizadeh, V.; Groner, B. The inhibition Pharm. Des.*, 2012, 18(30), 4668-4678. of stat5 by a Peptide aptamer ligand specific for the DNA [147] Selivanova, G. Wild type P53 reactivation: From lab binding domain prevents target gene transactivation and the bench to clinic. *FEBS Lett.*, 2014, 588(16), 2628-2638. growth of breast and prostate tumor cells. *Pharmaceuticals*, [148] Ding, Q.; Zhang, Z.; Liu, J.J.; Jiang, N.; Zhang, J.; Ross, 2013, 6(8), 960-987. T.M.; Chu, X.J.; Bartkovitz, D.; Podlaski, F.; Janson, C.; [133] Dalal, K.; Roshan-Moniri, M.; Sharma, A.; Li, H.; Ban, Tovar, C.; Filipovic, Z.M.; Higgins, B.; Glenn, K.; Packman, F.; Hessein, M.; Hsing, M.; Singh, K.; LeBlanc, E.; Dehm, S.; K.; Vassilev, L.T.; Graves, B. Discovery of RG7388, a potent Guns, E.S.; Cherkasov, A.; Rennie, P.S. Selectively targeting and selective P53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J. the DNA-binding domain of the androgen receptor as a Med. Chem.*, 2013, 56(14), 5979-5983. prospective therapy for prostate cancer. *J. Biol. Chem.*, 2014, [149] Higgins, B.; Glenn, K.; Walz, A.; Tovar, C.; Filipovic, 289(38), 26417-26429. Z.; Hussain, S.; Lee, E.; Kolinsky, K.; Tannu, S.; Adames, V.; [134] Pop, M.S.; Stransky, N.; Garvie, C.H.; Theurillat, J.P.; Garrido, R.; Linn, M.; Meille, C.; Heimbrook, D.; Vassilev, Hartman, E.C.; Lewis, T.A.; Zhong, C.; Culyba, E.K.; Lin, F.; L.; Packman, K. Preclinical optimization of MDM2 antagonist Daniels, D.S.; Pagliarini, R.; Ronco, L.; Koehler, A.N.; scheduling for cancer treatment by using a model-based Garraway, L.A. A small molecule that binds and inhibits the approach. *Clin. Cancer Res.*, 2014, 20(14), 3742-3752. ETV1 transcription factor oncoprotein. *Mol. Cancer Ther.*, [150] Rew, H.; Sun, D. Discovery of a small molecule MDM2 2014, 13(6), 1492-1502. inhibitor (AMG 232) for treating cancer. *J. Med. Chem.*, 2014, [135] Xu, G.H.; Mawji, I.A.; Macrae, C.J.; Koch, C.A. Datti, 57(15), 6332-6341. A.; Wrana, J.L.; Dennis, J.H.; Schimmer, A.D. A high- [151] Sun, D.; Li, Z.; Rew, H.; Gribble, M.; Bartberger, M.D.; content chemical screen identifies ellipticine as a modulator of Beck, H.P.; Canon, J.; Chen, A.; Chen, X.; Chow, D.; P53 nuclear localization. *Apoptosis*, 2008, 13(3), 413-422. Deignan, J.; Duquette, J.; Eksterowicz, J.; Fisher, B.; Fox, [136] Savorani, C.; Manfè, V.; Biskup, E.; Gniadecki, R.B.M.; Fu, J.; Gonzalez, A.Z.; Gonzalez-Lopez De Turiso, F.; Ellipticine induces apoptosis in T-cell lymphoma via oxidative Houze, J.B.; Huang, X.; Jiang, M.; Jin, L.; Kayser, F.; Liu, DNA damage. *Leuk. Lymphoma*, 2015, 56(3):739-47. J.J.; Lo, M.C.; Long, A.M.; Lucas, B.; McGee, L.R.; [137] Stiborová, M.; Frei, E. Ellipticines as DNA-targeted McIntosh, J.; Mihalic, J.; Oliner, J.D.; Osgood, T.; Peterson, chemotherapeutics. *Curr. Med. Chem.*, 2014, 21(5), 575-591. M.L.; Roveto, P.; Saiki, A.H.; Shaffer, P.; Toteva, M.; Wang, H.; Wang, H.C.; Wortman, S.; Yakowec, P.; Yan, X.; Ye, Q.;

Yu, D.; Yu, M.; Zhao, X.; Zhou, J.; Zhu, J.; Olson, S.H.; inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Medina, J.C. Discovery of AMG 232, a potent, selective, and Nat. Chem. Biol.*, 2013, 9(4), 271-276.

orally bioavailable MDM2-P53 inhibitor in clinical [166] Rogers, J.L.; Bayeh, L.; Scheuermann, T.H.; Longgood, development. *J. Med. Chem.*, 2014, 57(4), 1454-1472.

[152] Gonzalez, A.Z.; Eksterowicz, J.; Bartberger, M.D.; Bruick, R.K.; Gardner, K.H.; MacMillan, J.B.; Tambar, U.K. Beck, H.P.; Canon, J.; Chen, A.; Chow, D.; Duquette, J.; Fox, Development of inhibitors of the PAS-B domain of the HIF-B.M.; Fu, J.; Huang, X.; Houze, J.B.; Jin, L.; Li, H.; Li, Z.; α transcription factor. *J. Med. Chem.*, 2013, 56(4), 1739-1747.

McMinn, D.L.; Oliner, J.D.; Osgood, T.; Rew, H.; Saiki, A.H.; [167] Park, E.J.; Kong, D.; Fisher, R.; Cardellina, J. Shaffer, P.; Wortman, S.; Yakowec, P.; Yan, X.; Ye, Q.; Yu, Shoemaker, R.H.; Melillo, G. Targeting the PAS-A domain of D.; Zhao, X.; Zhou, J.; Olson, S.H.; Medina, J.C.; Sun, D. HIF-1 α for development of small molecule inhibitors of Selective and potent morpholinone inhibitors of the MDM2-HIF-1. *Cell Cycle*, 2006, 5(16), 1847-1853.

P53 protein-protein interaction. *J. Med. Chem.*, 2014, 57(6), [168] Miranda, E.; Nordgren, I.K.; Male, A.L.; Lawrence, 2472-2488.

[153] Dos-Santos O., Lagarde, P.; Pérot, G.; Chibon, F.; Ratet, P.A.; Packham, G.K.; Eccles, S.A.; Tavassoli, A. A cyclic N.; Flamand, O.; Debussche, L. Human dedifferentiated peptide inhibitor of HIF-1 heterodimerization that inhibits liposarcomas growth inhibition by SAR299155, a potent and hypoxia signaling in cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, selective disruptor of the MDM2-P53 interaction. *Eur. J. Biochem.*, 2012, 376(10), 10418-10425.

Cancer, 2012, 48(5), S245-S246. [169] Lee, K.; Zhang, H.; Qian, D.Z.; Rey, S.; Liu, J.O.;

[154] Pazgier, M.; Liu, M.; Zou, G.; Yuan, H.; Li, C.; Li, C.; Semenza, G.L. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor Li, J.; Monbo, J.; Zella, D.; Tarasov, S.G.; Lu, H. Structural growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, basis for high-affinity peptide inhibition of P53 interactions 2009, 106(42), 17910-17915.

with MDM2 and MDMX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2009; [170] Cook, K.M.; Hilton, S.T.; Mecinovic, J.; Motherwell, 106, 4665-4670.

[155] Lao, B.B.; Drew, K.; Guarracino, D.A.; Brewer, T.F.; block the interaction between hypoxia-inducible factor-1 α Heindel, D.H.; Bonneau, R.; Arora, P.S. Rational design of (HIF-1 α) and p300 by a zinc ejection mechanism. *J. Biol. topographical helix mimics as potent inhibitors of protein-Chem.*, 2009, 284(39), 26831-26838.

protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136(22), 7877- [171] Dubey, R.; Levin, M.D.; Szabo, L.Z.; Laszlo, C.F.; 7888.

[156] Atzori, A.; Baker, A.E.; Chiu, M.; Bryce, R.A.; Bonnet, Suppression of tumor growth by designed dimeric P. Effect of sequence and stereochemistry reversal on P53 epidithiodiketopiperazine targeting hypoxia-inducible peptide mimicry. *PLoS One*, 2013, 8(7), e68723.

[157] Xu, H.; Shi, J.; Yamamoto, N.; Moss, J.A.; Vogt, P.K.; [135(11), 4537-4549.

Janda, K.D. A credit-card library approach for disrupting [172] Reece, K.M.; Richardson, E.D.; Cook, K.M.; Campbell, protein-protein interactions. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14(8), T.J.; Pisle, S.T.; Holly, A.J.; Venzon, D.J.; Liewehr, D.J.; 2660-2673.

[158] Kiessling, A.; Sperl, B.; Hollis, A.; Eick, D.; Berg, T. Epidithiodiketopiperazines (ETPs) exhibit in vitro Selective inhibition of c-Myc/Max dimerization and DNA antiangiogenic and in vivo antitumor activity by disrupting the binding by small molecules. *Chem. Biol.*, 2006, 13(7), 745-751.

[159] Fletcher, S.; Prochownik, E.V. Small-molecule [173] Kwon, H.S.; Park, J.; Park, H.K.; Ahn, D.R. A inhibitors of the Myc oncoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* multivalent peptide as an activator of hypoxia inducible factor-1 α . *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, 23(6), 1716-1719.

[160] Pan, X.N.; Chen, J.J.; Wang, L.X.; Xiao, R.Z.; Liu, L.L.; [174] Erkizan, H.V.; Kong, H.; Merchant, M.; Schlottmann, Fang, Z.G.; Liu, Q.; Long, Z.J.; Lin, D.J. Inhibition of c-Myc S.; Barber-Rotenberg, J.S.; Yuan, L.; Abaan, O.D.; Chou, overcomes cytotoxic drug resistance in acute myeloid T.H.; Dakshanamurthy, S.; Brown, M.L.; Uren, A.; Toretsky, leukemia cells by promoting differentiation. *PLoS One*, 2014, J.A. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 9(8), e105381.

[161] Xia, B.; Tian, C.; Guo, S.; Zhang, L.; Zhao, D.; Qu, F.; sarcoma. *Nat. Med.*, 2009, 15(7), 750-756.

Zhao, H.; Wang, H.; Wu, X.; Da, H.; Wei, S.; Zhang, H. c- [175] Hong, S.H.; Youbi, S.E.; Hong, S.P.; Kallakury, B.; Myc plays part in drug resistance mediated by bone marrow Monroe, P.; Erkizan, H.V.; Barber-Rotenberg, J.S.; Houghton, stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, 2015, P.; Üren, A.; Toretsky, J.A. Pharmacokinetic modeling 39(1), 92-99.

[162] Jiang, H.; Bower, K.E.; Beuscher, A.E.; Zhou, B.; transcription factor in Ewing Sarcoma. *Oncotarget*, 2014, 5(2), Bobkov, A.A.; Olson, A.J.; Vogt, P.K. Stabilizers of the Max338-350.

homodimer identified in virtual ligand screening inhibit Myc [176] Barber-Rotenberg, J.S.; Selvanathan, S.P.; Kong, H.; function. *Mol. Pharmacol.*, 2009, 76(3), 491-502.

[163] Filippakopoulos, P.; Knapp, S. Targeting N.L.; Summer, S.; Monroe, P.J.; Chruszcz, M.; Dobrev, V.; bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat. T. Tosso, P.N.; Scher, L.J.; Minor, H.; Brown, M.L.; Metallo, Rev. Drug. Discov.*, 2014, 13(5), 337-356.

[164] Scheuermann, T.H.; Tomchick, D.R.; Machius, M.; demonstrates specificity in targeting the oncogene EWS-FLI1. Guo, H.; Bruick, R.K.; Gardner, K.H. Artificial ligand binding *Oncotarget*, 2012, 3(2), 172-182.

within the HIF2 α PAS-B domain of the HIF2 transcription [177] Rahim, S.; Beauchamp, E.M.; Kong, H.; Brown, M.L.; factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2009, 106(2), 450-455.

[165] Scheuermann, T.H.; Li, Q.; Ma, H.H.; Key, J.; Zhang, mediated prostate cancer cell invasion. *PLoS One*, 2011, 6(4), L.; Chen, R.; Garcia, J.A.; Naidoo, J.; Longgood, J.; Frantz, e19343.

D.E.; Tambar, U.K.; Gardner, K.H.; Bruick, R.K. Allosteric

[178] Rahim, S.; Minas, T.; Hong, S.H.; Justvig, S.; Celik, H.;[190] Nafisi, S.; Adelzadeh, M.; Norouzi, Z.; Sarbolouki, Kont, H.S.; Han, J.; Kallaral, A.T.; Kong, H.; Rudek, M.A.;M.N. Curcumin binding to DNA and RNA. *DNA Cell Biol.*, Brown, M.L.; Kallakury, B.; Toretzky, J.A.; Uren, A. A small2009, 28(4), 201-208.

molecule inhibitor of ETV1, YK-4-279, prevents prostate[191] Cui, J.; Meng, X.; Gao, X.; Tan, G. Curcumin decreases cancer growth and metastasis in a mouse xenograft model.the expression of Pokemon by suppressing the binding activity *PLoS One*, 2014, 9(12), e114260.

of the Sp1 protein in human lung cancer cells. *Mol. Biol. Rep.*, [179] Gorczynski, M.J.; Grembecka, J.; Zhou, H.; Kong, H.;2010, 37(3), 1627–1632.

Roudaia, L.; Douvas, M.G.; Newman, M. Bielnicka, I.; Baber,[192] Chen, C.C.; Sureshbabul, M.; Chen, H.H.; Lin, H.S.; G.; Corpora, T.; Shi, J.; Sridharan, M.; Lilien, R.; Donald, Lee, J.H.; Hong, Q.S.; Yang, H.C.; Yu, S.L. Curcumin B.R.; Speck, N.A.; Brown, M.L.; Bushweller, J.H. Allostericsuppresses metastasis via Sp-1, FAK inhibition, and E-inhibition of the protein-protein interaction between theCadherin upregulation in colorectal cancer. *Evid. Based leukemia-associated proteins Runx1 and CBFbeta. Chem.Complement. Alternat. Med.*, 2013, 541695.

Biol., 2007, 14(10), 1186-1197. [193] Ghosh, M.; Ryan, R.O. Curcumin homing to the [180] Cunningham, L.; Finckbeiner, S.; Hyde, R.K.; Southall,nucleolus: mechanism for initiation of an apoptotic program. N.; Marugan, J.; Yedavalli, V.R.; Dehdashti, S.J.; Reinhold,J. *Nutr. Biochem.*, 2014, 25(11), 1117-1123.

H.C.; Alemu, L.; Zhao, L.; Yeh, J.R.; Sood, R.; Pommier, H.;[194] Chen, H.H.; Lee, J.H.; Huang, J.H.; Wang, C.C.; Chen, Austin, C.P.; Jeang, K.T.; Zheng, H.; Liu, P. Identification ofH.J.; Su, S.F.; Huang, C.H.; Ho, C.C.; Chen, J.J.; Tsai, M.F.; benzodiazepine Ro5-3335 as an inhibitor of CBF leukemiaYu, S.L.; Yang, P.C. Curcumin inhibits lung cancer cell through quantitative high throughput screen against RUNX1-invasion and metastasis through the tumor suppressor HLJ1. CBFβ interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2012, *Cancer Res.*, 2008, 68(18), 7428–7438.

109(36), 14592-14597. [195] Klug, A.; Jack, A.; Viswamitra, M. A.; Kennard, O.; [181] Siddiquee, K.A.; Gunning, P.T.; Glenn, M.; Katt, H.P.;Shakked, Z.; Steitz, T. A. A hypothesis on a specific Zhang, S.; Schrock, C.; Sebt, S.M.; Jove, R.; Hamilton, A.D.;sequence-dependent conformation of DNA and its relation to Turkson, J. An oxazole-based small-molecule Stat3 inhibitorthe binding of the lac repressor protein. *J. Mol. Biol.*, 1979, modulates Stat3 stability and processing and induces131(4), 669-680.

antitumor cell effects. *ACS Chem. Biol.*, 2007, 2(12), 787-[196] Nelson, H.C.; Finch, J.T.; Luisi, B.F.; Klug, A. The 798.

structure of an oligo(dA).oligo(dT) tract and its biological [182] Schust, J.; Sperl, B.; Hollis, A.; Mayer, T.U.; Berg, T.implications. *Nature*, 1978, 330(6145), 221-226.

Static: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and[197] El Hassan, M. A.; Calladine, C. R. Propeller-twisting of dimerization. *Chem. Biol.*, 2006, 13(11), 1235-1242.

base-pairs and the conformational mobility of dinucleotide [183] Katz, E.; Sims, A.H.; Sproul, D.; Caldwell, H.; Dixon,steps in DNA. *J. Mol. Biol.*, 1996, 259(1), 95-103.

M.J.; Meehan, R.R.; Harrison, D.J. Targeting of Rac GTPases[198] Zuccheri, G.; Scipioni, A.; Cavaliere, V.; Gargiulo, G.; blocks the spread of intact human breast cancer. *Oncotarget*,De Santis, P.; and Samori, B. Mapping the intrinsic curvature 2012, 3(6), 608-619.

and the flexibility along the DNA chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [184] Spitzner, M.; Roesler, B.; Bielfeld, C.; Emons, G.;U S A., 2001, 98(6), 3074–3079.

Gaedcke, J.; Wolff, H.A.; Rave-Fränk, M.; Kramer, F.;[199] Holman, G.G.; Zewail-Foote, M.; Smith, A.R.; Johnson, Beissbarth, T.; Kitz, J.; Wienands, J.; Ghadimi, B.M.; Ebner,K.A.; Iverson, B.L. A sequence-specific threading tetra-R.; Ried, T.; Grade, M. STAT3 inhibition sensitizes colorectalintercalator with an extremely slow dissociation rate constant. cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo. *Int. J.Nat Chem.*, 2011, 3(11), 875-881.

Cancer, 2014, 134(4), 997-1007. [200] Rhoden Smith, A.; Iverson, B.L. Threading [185] Pan, H.; Zhou, F.; Zhang, R.; Claret, F.X. Stat3 inhibitorpolyintercalators with extremely slow dissociation rates and Static exhibits potent antitumor activity and induces chemo-extended DNA binding sites. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, and radio-sensitivity in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*,135(34), 12783-12789.

2013, 8(1), e54565. [201] Olajide, O.A.; Heiss, E.H.; Schachner, D.; Wright, C.H.; [186] Madoux, F.; Koenig, M.; Sessions, H.; Nelson, E.;Vollmar, A.M.; Dirsch, V.M. Synthetic cryptolepine inhibits Mercer, B.A.; Cameron, M.; Roush, H.; Frank, D. and Hodder,DNA binding of NF-kappaB. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, P. Modulators of STAT Transcription Factors for the Targeted15(1), 43-49.

Therapy of Cancer (STAT3 inhibitors). *NIH Molecular[202] Waring, M.J., Wakelin, L.P. Echinomycin: a Libraries Program*, 2010-2009 Aug 28.

bifunctional intercalating antibiotic. *Nature*, 1974, 252(5485), [187] Assi, H.H.; Paran, C.; VanderVeen, N.; Savakus, J.;653-657.

Doherty, R.; Petruzzella, E.; Hoeschele, J.D.; Appelman, H.;[203] Drew, H.R.; Travers, A.A. Structural junctions in DNA: Raptis, L.; Mikkelsen, T.; Lowenstein, P.R.; Castro, M.G.the influence of flanking sequence on nuclease digestion Preclinical characterization of signal transducer and activatorspecificities. *Nucleic Acids Res.*, 1985, 13(12), 4445-4467.

of transcription 3 small molecule inhibitors for primary and[204] Costantino, P.; De Santis, P.; Ughetto, G. Circular metastatic brain cancer therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,dichroism studies on the echinomycin--DNA complex. *FEBS 2014, 349(3), 458-469.*

Lett., 1978, 88(2), 349-352. [188] Fossey, S.L.; Bear, M.D.; Lin, J.; Li, C.; Schwartz, E.B.;[205] Low, C.M.; Drew, H.R.; Waring; M.J. Echinomycin and Li, P.K.; Fuchs, J.R.; Fenger, J.; Kisseberth, H.C.; London,distamycin induce rotation of nucleosome core DNA. *Nucleic C.A. The novel curcumin analog FLLL32 decreases STAT3Acids Res.*; 1986; 14(17), 6785-6801.

DNA binding activity and expression, and induces apoptosis[206] Jeppesen, C.; Nielsen, P.E. Detection of intercalation-in osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer*, 2011, 11, 112.

induced changes in DNA structure by reaction with diethyl [189] Zsila, F.; Bikadi, Z.; Simonyi, M. Circular dichroismpyrocyanate or potassium permanganate. Evidence against spectroscopic studies reveal pH dependent binding ofthe induction of Hoogsteen base pairing by echinomycin. curcumin in the minor groove of natural and synthetic nucleicFEBS *Lett.*, 1988, 231(1), 172-176.

acids. *Org. Biomol. Chem.*, 2004, 2(20), 2902-2910. [207] McLean, M.J.; Seela, F.; Waring, M.J. Echinomycin-induced hypersensitivity to osmium tetroxide of DNA

fragments incapable of forming Hoogsteen base pairs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1989, 86(24), 9687-9691.

[208] Portugal, J.; Waring, M.J. Interaction of nucleosomes with topoisomerase II: insights into DNA core particles with distamycin and etoposide. *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42(9), 6012-6024.

[209] Ward, D.C.; Reich, E.; Goldberg, I.H. Base specificity of topoisomerase II in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs. *Science*, 1965, 149(3689), 1259-1263.

[210] Phillips, D.R.; White, R.J.; Trist, H.; Cullinane, C.; Dean, D.; Crothers, D.M. New insight into drug-DNA interactions at individual drug binding sites probed by RNA polymerase during active transcription of the DNA. *Anticancer Drug Des.*, 1990, 5(1), 21-29.

[211] May, L.G.; Madine, M.A.; Waring, M.J. Echinomycin inhibits chromosomal DNA replication and embryonic development in vertebrates. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(1), 65-72.

[212] Kong, D.; Park, E.J.; Stephen, A.G.; Calvani, M.; Cardellina, J.H.; Monks, A.; Fisher, R.J.; Shoemaker, R.H.; Melillo, G. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res.*, 2005, 65(19), 9047-9055.

[213] Regazzetti, C.; Bost, F.; Le Marchand-Brustel, H.; J.F.; Giorgetti-Peraldi, S. Insulin induces REDD1 expression through hypoxia-inducible factor 1 activation in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285(8), 5157-5164.

[214] Yu, J.; Li, J.; Zhang, S.; Xu, X.; Zheng, M.; Li, F. IGF-1 induces hypoxia-inducible factor 1 α -mediated GLUT3 expression through PI3K/Akt/mTOR dependent pathways in PC12 cells. *Brain Res.*, 2012, 1430, 18-24.

[215] Vakili, H.; Jin, H.; Cattini, P.A. Negative regulation of human growth hormone gene expression by insulin is dependent on hypoxia-inducible factor binding in non-tumor pituitary cells. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(40), 33282-33292.

[216] Wang, H.; Liu, H.; Tang, F.; Bernot, K.M.; Schore, R.; Marcucci, G.; Caligiuri, M.A.; Zheng, P.; Liu, H.C.B.; Yang, D. Intercalation of Echinomycin protects mice against relapsed acute myeloid leukemia without adverse effect on hematopoietic stem cells. *Blood*, 2014, 124(7), 1127-1135.

[217] Singh, V.; Nand, A.; Chen, C.; Li, Z.; Li, S.J.; Wang, S.; Yang, M.; Merino, A.; Zhang, L.; Zhu, J. Echinomycin, a potential binder of FKBP12, shows minor effect on calcineurin activity. *J. Biomol. Screen*, 2014, 19(9), 1275-1281.

[218] Welch, J.J.; Rauscher, F.J.; Beeraman, T.A. Targeting DNA-binding drugs to sequence-specific transcription factor DNA complexes. Differential effects of intercalating and minor groove binding drugs. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269(49), 31051-31058.

[219] Vlamincck, B.; Toffoli, S.; Ghislain, B.; Demazy, C.; Raes, M.; Michiels, C. Dual effect of echinomycin on hypoxia-inducible factor-1 activity under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS J.*, 2007, 274(21), 5533-5542.

[220] Wang, H.; Liu, H.; Malek, S.N.; Zheng, P.; Liu, H.; Steiner, J.; Cooper, M.; Rankin, E.M. Targeting HIF1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(4), 399-411.

[221] Yonekura, S.; Itoh, M.; Okuhashi, H.; Ono, A.; Nara, N.; Tohda, S. Effects of the HIF1 inhibitor, echinomycin, on growth and NOTCH signalling in leukaemia cells. *Anticancer Res.*, 2013, 33(8), 3099-3103.

[222] Wang, H.; Liu, H.; Tang, F.; Bernot, K.M.; Schore, R.; Marcucci, G.; Caligiuri, M.A.; Zheng, P.; Liu, H. Echinomycin protects mice against relapsed acute myeloid leukemia without adverse effect on hematopoietic stem cells. *Blood*, 2014, 124(7), 1127-1135.

[223] Lin, C.; Mathad, R.I.; Zhang, Z.; Sidell, N.; Yang, D. Solution structure of a 2:1 complex of anticancer drug XR5944 with the estrogen response element: insights into DNA recognition by a bis-intercalator. *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42(9), 6012-6024.

[224] Stewart, A.J.; Mistry, P.; Dangerfield, H.; Bootle, D.; Baker, M.; Kofler, B.; Okiji, S.; Baguley, B.C.; Denny, H.A.; Charlton, P.A. Antitumor activity of XR5944, a novel and potent topoisomerase II inhibitor. *Anticancer Drugs*, 2001, 12(4), 359-367.

[225] Sappal, D.S.; McClendon, A.K.; Fleming, J.A.; Thoroddsen, V.; Connolly, K.; Reimer, C.; Blackman, R.K.; Bulawa, C.E.; Osheroff, N.; Charlton, P.; Rudolph-Owen, L.A. Biological characterization of MLN944: a potent DNA topoisomerase II inhibitor. *Mol. Cancer Ther.*, 2004, 3(1), 47-58.

[226] Di Nicolantonio, F.; Knight, L.A.; Whitehouse, P.A.; Mercer, S.J.; Sharma, S.; Charlton, P.A.; Norris, D.; Cree, I.A. The ex vivo characterization of XR5944 (MLN944) against a panel of human clinical tumor samples. *Mol. Cancer Ther.*, 2004, 3(12), 1631-1637.

[227] Jobson, A.G.; Willmore, E.; Tilby, M.J.; Mistry, P.; Charlton, P.; Austin, C.A. Effect of phenazine compounds XR11576 and XR5944 on DNA topoisomerases. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2009, 63(5), 889-901.

[228] Dai, J.; PUNCHIHewa, C.; Mistry, P.; Ooi, A.T.; Yang, D. Novel DNA bis-intercalation by MLN944, a potent clinical bisphenazine anticancer drug. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(44), 46096-46103.

[229] Serobian, A.; Thomas, D.S.; Ball, G.E.; Denny, H.A.; Wakelin, L.P. The solution structure of bis(phenazine-1-carboxamide)-DNA complexes: MLN 944 binding corrected and extended. *Biopolymers*, 2014, 101(11), 1099-1113.

[230] Byers, S.A.; Schafer, B.; Sappal, D.S.; Brown, J.; Price, D.H. The antiproliferative agent MLN944 preferentially inhibits transcription. *Mol. Cancer Ther.*, 2005, 4(8), 1260-1267.

[231] Sidell, N.; Mathad, R.I.; Shu, F.J.; Zhang, Z.; Kallen, M.; Wang, H.; Liu, H.; Tang, F.; Bernot, K.M.; Schore, R.; Harris, S.M.; Mistry, P.; Freathy, C.; Brown, J.L. Antitumor activity of XR5944 in vitro and in vivo in combination with 5-fluorouracil and irinotecan in colon cancer cell lines. *Br. J. Cancer.*, 2005, 92(4), 722-728.

[232] Wolf, S.J.; Wakelin, L.P.; He, Z.; Stewart, B.H.; Catchpole, D.R. In vitro assessment of novel transcription inhibitors and topoisomerase poisons in rhabdomyosarcoma cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2009, 64(6), 1059-1069.

[233] Harris, S.M.; Scott, J.A.; Brown, J.L.; Charlton, P.A. Antitumor activity of XR5944 in combination with carboplatin or doxorubicin in non-small-cell lung cancer. *Anticancer Drugs*, 2005, 16(9), 945-951.

[234] Harris, S.M.; Scott, J.A.; Brown, J.L.; Charlton, P.A.; Verborg, H.; Thomas, H.; Bissett, D.; Waterfall, J.; Steiner, J.; Cooper, M.; Rankin, E.M. First-in-man phase I study of XR5944, a novel agent with a unique mechanism of action. *Br. J. Cancer.*, 2007, 97(7), 844-850.

[235] Liaw, H.; Gao, H.; Robinson, H.; Van der Marel, G.; Wang, A. Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both grooves simultaneously: molecular structure of the nogalamycin-DNA complex. *Biochemistry*, 1989, 28(26), 9913-9918.

Structure and Function ISBN0-940030-36-5, Vol1 Nucleic[251] Han, F.X.; Hurley, L.H. A model for the T-antigen-Acids, 1992, ISBN0-940030-37-3, 107-125. induced structural alteration of the SV40 replication origin

[238] Karp, J.E.; Passaniti, A.; Gojo, I.; Kaufmann, S.; Bible, based upon experiments with specific probes for bent, straight, K.; Garimella, T.S.; Greer, J.; Briel, J.; Smith, B.D.; Gore, and unwound DNA. *Biochemistry*, 1996, 35(24), 7993-8001.

S.D.; Tidwell, M.L.; Ross, D.D.; Wright, J.J.; Colevas, A.D.; [252] Sun, D.; Hurley, L.H.; Harshey, R.M. Structural Bauer, K.S. Phase I and pharmacokinetic study of flavopiridol distortions induced by integration host factor (IHF) at the H followed by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and site of phage lambda probed by (+)-CC-1065, pluramycin, and mitoxantrone in relapsed and refractory adult acute leukemias. *Chem. Biol.*, 1995, 2(4), 229-240.

KMnO₄ and by DNA cyclization studies. *Biochemistry*, 1996, Clin. Cancer Res., 2005, 11(23), 8403-8412. 35(33), 10815-10827.

[239] Karp, J.E.; Garrett-Mayer, E.; Estey, E.H.; Rudek, M.A.; Smith, B.D.; Greer, J.M.; Drye, D.M.; Mackey, K.; Dorcy, [253] Hansen, M.; Yun, S.; Hurley, L. Hedamycin intercalates K.S.; Gore, S.D.; Levis, M.J.; McDevitt, M.A.; Carraway, the DNA helix and, through carbohydrate-mediated H.E.; Pratz, K.H.; Gladstone, D.E.; Showel; M.M.; Othay, M.; recognition in the minor groove, directs N7-alkylation of Doyle, L.A.; Wright, J.J.; Pagel, J.M. Randomized phase II guanine in the major groove in a sequence-specific manner. study of two schedules of flavopiridol given as timed Chem. Biol., 1995, 2(4), 229-240.

sequential therapy with cytosine arabinoside and mitoxantrone [254] Bennett, G.N. Formation of alkali labile linkages in for adults with newly diagnosed, poor-risk acute myelogenous DNA by hedamycin and use of hedamycin as a probe of leukemia. *Haematologica*, 2012, 97(11), 1736-1742. protein-DNA complexes. *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10(15), [240] Bible, K.C.; Peethambaram, P.P.; Oberg, A.L.; Maples, 4581-4594.

H.; Groteluschen, D.L.; Boente, M.; Burton, J.K.; Gomez [255] Chiang, S.H.; Welch, J.; Rauscher, F.J.; Beerman, T.A. Dahl, L.C.; Tibodeau, J.D.; Isham, C.R.; Maguire, J.L.; Effects of minor groove binding drugs on the interaction of Shridhar, V.; Kukla, A.K.; Voll, K.J.; Mauer, M.J.; Colevas, TATA box binding protein and TFIIA with DNA. A.D.; Wright, J.; Doyle, L.A. Erlichman, C. A phase 2 trial of Biochemistry, 1994, 33(23), 7033-7040.

flavopiridol (Alvocidib) and cisplatin in platin-resistant [256] Cairns, M.J.; Murray, V. Detection of protein-DNA ovarian and primary peritoneal carcinoma: MC0261. *Gynecol. interactions at beta-globin gene cluster in intact human cells Oncol.*, 2012, 127(1), 55-62. utilizing hedamycin as DNA-damaging agent. *DNA Cell [241] Jones, J.A.; Rupert, A.S.; Poi, M.; Phelps, M.A.; Biol.*, 1998, 17(4), 325-333.

Andritsos, L.; Baiocchi, R.; Benson, D.M.; Blum, K.A.; [257] Bellon, S.F.; Coleman, J.H.; Lippard, S.J. DNA Christian, B.; Flynn, J.; Penza, S.; Porcu, P.; Grever, M.R.; unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of Byrd, J.C. Flavopiridol can be safely administered using the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). pharmacologically derived schedule and demonstrates activity Biochemistry, 1991, 30(32), 8026-8035.

in relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Am. J.* [258] Malinge, J.M.; Pérez, C.; Leng, M. Base sequence-independent distortions induced by interstrand cross-links in [242] Hofmeister, C.C.; Poi, M.; Bowers, M.A.; Zhao, H.; cis-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA. *Nucleic Phelps, M.A.; Benson, D.M.; Kraut, E.H.; Farag, S.; Efebera, Acids Res.*, 1994, 22(19), 3834-3839.

H.A.; Sexton, J.; Lin, T.S.; Grever, M.; Byrd, J.C. A phase II [259] Coste, F.; Malinge, J.M.; Serre L.; Shepard, H.; Roth, trial of flavopiridol in relapsed multiple myeloma. *Cancer M., Leng, M., Zelwer C. Crystal structure of a double-stranded Chemother. Pharmacol.*, 2014, 73(2), 249-257. DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å [243] Bible, K.C.; Bible, R.H. Jr.; Kottke, T.J.; Svingen, P.A.; resolution: hydration at the platinated site. *Nucleic Acids Res.*, Xu, K.; Pang, H.P.; Hajdu, E.; Kaufmann, S.H. Flavopiridol 1999, 27(8), 1837-1846.

binds to duplex DNA. *Cancer Res.*, 2000, 60(9), 2419-2428. [260] Kasparkova, J.; Marini, V.; Bursova, V.; Brabec, V. [244] Lee, H.K.; Isham, C.R.; Kaufman, S.H.; Bible, K.C. Biophysical studies on the stability of DNA intrastrand cross- Flavopiridol disrupts STAT3/DNA interactions, attenuates links of transplatin. *Biophys. J.*, 2008, 95(9), 4361-4371.

STAT3-directed transcription, and combines with the Jak [261] Todd, R.C.; Lippard, S.J. Consequences of cisplatin kinase inhibitor AG490 to achieve cytotoxic synergy. *Mol. binding on nucleosome structure and dynamics. Chem. Biol., Cancer Ther.*, 2006, 5(1), 138-148. 2010, 17(12), 1334-1343.

[245] Fathi, A.T.; Karp, J.E. New agents in acute myeloid [262] Sharma, A.; Ramanjaneyulu, A.; Ray, R.; Rajeswari, leukemia: beyond cytarabine and anthracyclines. *Curr. Oncol. M.R. Involvement of high mobility group B proteins in Rep.*, 2009, 11(5), 346-352. cisplatin-induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of [246] Talib, J.; Beck, J.L.; Urathamakul, T.; Nguyen, C.D.; skin. *DNA Cell Biol.*, 2009, 28(7), 311-318.

Aldrich-Wright, J.R.; Mackay, J.P.; Ralph, S.F. A mass [263] Park, S.; Lippard, S.J. Binding interaction of HMGB4 spectrometric investigation of the ability of metal complexes with cisplatin-modified DNA. *Biochemistry*, 2012, 51(34), to modulate transcription factor activity. *Chem. Commun.*, 6728-6737.

2009, 37, 5546-5548. [264] Yoshida, H.; Izumi, H.; Torigoe, T.; Ishiguchi, H.; Itoh, [247] Tanaka, N.; Nagai, K.; Yamaguchi, H.; Umezawa, H.H.; Kang, D.; Kohno, K. P53 physically interacts with Inhibition of RNA and DNA polymerase reactions by mitochondrial transcription factor A and differentially pluramycin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965, regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res.*, 2003, 21(4), 328-332. 63(13), 3729-3734.

[248] Tanaka, N. Inhibition of transcription by pluramycin and [265] Yarnell, A.T.; Oh, S.; Reinberg, D.; Lippard, S.J. bleomycin. *J. Antibiot.*, 1970, 23(11), 523-530. Interaction of FACT, SSRP1, and the high mobility group [249] Sun, D.; Hurley, L.H. TBP binding to the TATA box (HMG) domain of SSRP1 with DNA damaged by the induces a specific downstream unwinding site that is targeted anticancer drug cisplatin. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(28), by pluramycin. *Chem Biol.*, 1995, 2(7), 457-469. 25736-25741.

[250] Henderson, D.; Hurley, L.H. Specific targeting of [266] Chow, C.S.; Whitehead, J.P.; Lippard, S.J. HMG protein-DNA complexes by DNA-reactive drugs (+)-CC-1065 domain proteins induce sharp bends in cisplatin-modified and pluramycins. *J. Mol. Recognit.*, 1996, 9(2), 75-87. DNA. *Biochemistry*, 1994, 33(50), 15124-15130.

[267] Treiber, D.K.; Zhai, X.; Jantzen, H.M.; Essigmann, J.M.[282] Zewail-Foote, M.; Hurley, L.H. Ecteinascidin 743: a Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the minor groove alkylator that bends DNA toward the major ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream groove). *J. Med. Chem.*, 1999, 42(14), 2493-2497.

[268] Trimmer, E.E.; Zamble, D.B.; Lippard, S.J.; Essigmann, M. DNA and RNA Binders, Volume 2, M. J.M. Human testis-determining factor SRY binds to the major groove of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1994, 91(12), 2833-2837.

[269] Chvalova, K.; Sari, M.A.; Bombard, S.; Kozelka, J. Ecteinascidin 743: characterization of its covalent DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. *Biochemistry*, 1998, 37(1), 352-362.

[270] Cohen, S.M.; Jamieson, E.R.; Lippard, S.J. Enhanced binding of the TATA-binding protein to TATA boxes containing flanking cisplatin 1,2-cross-links. *Biochemistry*, 2000, 39(28), 8259-8265.

[271] Wetzell, C.C.; Berberich, S.J. P53 binds to cisplatin-damaged DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1517(3), 392-397.

[272] Kasparkova, J.; Fojta, M.; Farrell, N.; Brabec, V. Differential recognition by the tumor suppressor protein P53 of DNA modified by the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464 and cisplatin. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(18), 5546-5552.

[273] Kasparkova, J.; Thibault, T.; Kostrhunova, H.; Stepankova, J.; Vojtkova, M.; Muchova, T.; Midoux, P.; Malinge, J.M.; Brabec, V. Different affinity of nuclear factor-kappa B proteins to DNA modified by antitumor cisplatin and its clinically ineffective trans isomer. *FEBS J.*, 2014, 281(5), 1393-1408.

[274] Kasparkova, J.; Zehulova, J.; Farrell, N.; Brabec, V. DNA interstrand cross-links of the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(41), 40400-40407.

[275] Masta, A.; Gray, P.J.; Phillips, D.R. Nitrogen mustard inhibits transcription and translation in a cell free system. *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23(17), 3508-3515.

[276] Fabbri, S.; Prontera, C.; Brogini, M.; D'Incalci, M. Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding factors NF kappa B and OTF-1 by nitrogen mustard. *Carcinogenesis*, 1993, 14(9), 1963-1967.

[277] Chen, X.M.; Gray, P.J.; Cullinane, C.; Phillips, D.R. Differential sensitivity of transcription factors to mustard-damaged DNA. *Chem Biol Interact.*, 1999, 118(1), 51-67.

[278] Chen, X.; Cullinane, C.; Gray, P.J.; Phillips, D.R. Nitrogen mustard inhibits transcription and translation in a cell free system. *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23(10), 3508-3515.

[279] Bellorini, M.; Moncollin, V.; D'Incalci, M.; Bellorini, M.; Mongelli, N.; Mantovani, R. Distamycin A and tallimustine inhibit transcription. *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23, 1657-1663.

[280] Brogini, M.; Coley, H.M.; Mongelli, N.; Pesenti, E.; Wyatt, M.D.; Hartley, J.A.; D'Incalci, M. DNA sequence-specific adenine alkylation by the novel antitumor drug tallimustine (FCE 24517), a benzoyl nitrogen mustard derivative of distamycin. *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23(11), 81-87.

[281] Pommier, H.; Kohlhagen, G.; Baily, C.; Waring, M.; Mazumder, A.; Kohn, K.H. DNA sequence- and structure-selective alkylation by the novel antitumor drug ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry*, 1996, 35(41), 13303-13309.

[282] Zewail-Foote, M.; Hurley, L.H. Devising a structural basis for the potent cytotoxic effects of ecteinascidin 743. In *Small Molecule DNA and RNA Binders, Volume 2*, M. J.M. Human testis-determining factor SRY binds to the major groove of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1994, 91(12), 2833-2837.

[283] Gago, F.; Hurley, L.H. Ecteinascidin 743: characterization of its covalent DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. *Biochemistry*, 1998, 37(1), 352-362.

[284] Hurley, L.H.; Zewail-Foote, M. The antitumor agent ecteinascidin 743: characterization of its covalent DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. *Biochemistry*, 1998, 37(1), 352-362.

[285] David-Cordonnier, M.H.; Gajate, C.; Olmea, O.; Laine, H.; de la Iglesia-Vicente, J.; Perez, C.; Cuevas, C.; Otero, G.; Manzanares, I.; Baily, C.; Mollinedo, F. DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin. *Chem. Biol.*, 2005, 12(11), 1201-1210.

[286] Jin, S.; Gorfajn, B.; Faircloth, G.; Scotto, K.H. Ecteinascidin-743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2000, 97(12), 6775-6779.

[287] Minuzzo, M.; Marchini, S.; Brogini, M.; Faircloth, G.; D'Incalci, M.; Mantovani, R. Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2000, 97(12), 6780-6784.

[288] Friedman, D.; Hu, Z.; Kolb, E.A.; Gorfajn, B.; Scotto, K.H. Ecteinascidin-743 inhibits activated but not constitutive transcription. *Cancer Res.*, 2002, 62(12), 3377-3381.

[289] Louneva, N.; Saitta, B.; Herrick, D.J.; Jimenez, S.A. Transcriptional inhibition of type I collagen gene expression in scleroderma fibroblasts by the antineoplastic drug ecteinascidin 743. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(41), 40400-40407.

[290] Bonfanti, M.; La Valle, E.; Fernandez Sousa Faro, J.M.; Faircloth, G.; Caretti, G.; Mantovani, R.; D'Incalci, M. Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(50), 48076-48086.

[291] Forni, C.; Minuzzo, M.; Viridis, E.; Tamborini, E.; Simone, M.; Tavecchio, M.; Erba, E.; Grosso, F.; Gronchi, A. Ecteinascidin (ET-743) promotes differentiation in myxoid liposarcoma tumors. *Mol. Cancer Ther.*, 2009, 8(2), 449-457.

[292] Germano, G.; Frapolli, R.; Simone, M.; Tavecchio, M.; Erba, E.; Pesce, S.; Pasqualini, F.; Grosso, F.; Sanfilippo, R.; Tarantino, E.; Pilotti, S.; Mantovani, R. Ecteinascidin (ET-743) promotes differentiation in myxoid liposarcoma tumors. *Mol. Cancer Ther.*, 2009, 8(2), 449-457.

[293] Di Giandomenico, S.; Frapolli, R.; Bello, E.; Uboldi, S.; Marchini, S.; Beltrame, L.; Brich, S.; Mauro, V.; Tamborini, E.; Pilotti, S.; Casali, P.G.; Grosso, F.; Sanfilippo, R.; Gronchi, A.; Mantovani, R.; Gatta, R. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer Res.*, 2010, 70(6), 2235-2244.

[294] Uboldi, S.; Calura, E.; Beltrame, L.; Fuso Nerini, I.; Marchini, S.; Cavalieri, D.; Erba, E.; Chiorino, G.; Ostano, P.; D'Angelo, D.; D'Incalci, M.; Romualdi, C. A systems biology approach to characterize the regulatory networks leading to resistance in an in vitro model of myxoid liposarcoma. *PLoS One*, 2012, 7(4), e35423.

[295] Grohar, P.J.; Woldemichael, G.M.; Griffin, L.B.; Mendoza, A.; Chen, Q.R.; Yeung, C.; Currier, D.G.; Davis, S.; Khanna, C.; Khan, J.; McMahon, J.B.; Helman, L.J. Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic

transcription factor by high-throughput screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2011, 103(12), 962-978.

[296] D'Angelo, D.; Borbone, E.; Palmieri, D.; Ubaldi, S.; prostate cancer cells by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31(3), 833-843.

Esposito, F.; Frapolli, R.; Pacelli, R.; D'Incalci, M.; Fusco, A. The impairment of the High Mobility Group A (HMGA) protein function contributes to the anticancer activity of expression in vivo by triple helix-forming oligonucleotides as trabectedin. *Eur. J. Cancer*, 2013, 49(5), 1142-1151.

[297] Lenglet, G.; Depauw, S.; Mendy-Belaiche, D.; David, D. detected by a reporter enzyme. *Antisense Res. Dev.*, 1994, 4(1), 1-8.

Cordonnier, M.H. DNA helix destabilization by alkylating agents: from covalent bonding to DNA repair. *Selected Topics in DNA Repair*, DNA repair/Book 2, 2011, ISBN 978-953-2-neu transcription in vitro. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92(5), 2433-307-1334-2, 97-124.

[298] Herrero, A.B.; Martín-Castellanos, C.; Marco, E.; Gago, F.; Moreno, S. Cross-talk between nucleotide excision and nuclear protein binding to the human Ki-ras promoter by homologous recombination DNA repair pathways in the triplex-forming oligonucleotides. *Biochemistry*, 1994, 33(11), mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Research*, 2006, 66(16), 8155-8162.

[314] Kim, H.G.; Miller, D.M. Inhibition of in vitro transcription by a triplex-forming oligonucleotide targeted to the human c-myc P2 promoter. *Biochemistry*, 1995, 34(25), 8165-8171.

[315] Lavrovsky, H.; Mastuyugin, V.; Stoltz, R.A.; Abraham, N.G. Specific inhibition of c-fos proto-oncogene expression by triple-helix-forming oligonucleotides. *J. Cell Biochem.*, 2008, 14(20), 6449-6455.

[300] Sun, D.; Hurley, L.H. Cooperative bending of the SV40 viral early promoter by human Sp1. *Biochemistry*, 1994, 33(32), 9578-9587.

[301] Passadore, M.; Bianchi, N.; Ferioto, G.; Mischiati, C.; Drug Des., 1991, 6(6), 569-584.

Rutigliano, C.; Gambari, R. In vitro and in vivo binding of a CC-1065 analogue to human gene sequences: a polymerase-chain reaction study. *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 319(2-3), 317-325.

[317] Giovannangeli, C.; Héline, C. Triplex-forming oligonucleotides for modulation of DNA information processing. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2000, 2(3), 288-296.

[318] Kuan, J.H.; Glazer, P.M. Targeted gene modification using triplex-forming oligonucleotides. *Methods Mol. Biol.*, 2004, 262, 173-194.

[319] Duca, M.; Vekhoff, P.; Oussedik, K.; Halby, L.; Bioorg. Med. Chem., 2000, 8, 1331-1342.

[303] Beckerbauer, L.; Tepe, J.J.; Cullison, J.; Reeves, R.; Williams, R.M. FR900482 class of anti-tumor drugs cross-links HMG I/H to DNA in vivo. *Chem. Biol.*, 2000, 7, 805-812.

[304] Naoe, H.; Inami, M.; Matsumoto, S.; Nishigaki, F.; Tsujimoto, S.; Kawamura, I.; Miyayasu, K.; Manda, T.; Shimomura, K. FK317: a novel substituted dihydrobenzoxazine with potent antitumor activity which does not induce vascular leak syndrome. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1998, 42(1), 31-36.

[321] Raja, N.S.; Nair, B.U. Chromium(III) complexes inhibit transcription factors binding to DNA and associated gene expression. *Toxicology*, 2008, 251(1-3), 61-65.

[322] Vijayalakshmi, R.; Kanthimathi, M.; Subramanian, V.; Nair, B.U. Interaction of DNA with [Cr(Schiff base)(H₂O)₂]ClO₄. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000, 1475(2), 157-162.

[305] Beckerbauer, L.; Tepe, J.J.; Eastman, R.A.; Williams, R.M.; Reeves, R. Differential effects of FR900482 and FK317 on apoptosis, IL-2 gene expression, and induction of vascular leak syndrome. *Chem. Commun.*, 2001, 279-280.

[324] Odom, D.T.; Parker, C.S.; Barton, J.K. Site-specific inhibition of transcription factor binding to DNA by a dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(Gpg) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry*, 1999, 38(16), 5155-5163.

[325] Wang, P.; Leung, C.H.; Ma, D.L.; Sun, R.H.; Yan, S.C.; Chen, Q.S.; Che, C.M. Specific blocking of CREB/DNA binding by cyclometalated platinum(II) complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, 50(11), 2554-2558.

[307] Postel, E.H. Modulation of c-myc transcription by triple helix formation. *Ann. N.H. Acad. Sci.*, 1992, 660, 57-63.

[308] Ing, N.H.; Beekman, J.M.; Kessler, D.J.; Murphy, M.; Jayaraman, K.; Zendegui, J.G.; Hogan, M.E.; O'Malley, B.H. Interaction of antibiotics netropsin and distamycin A with nucleic acids. *Mol. Biol.*, 1971, 58(1), 329-348.

[327] Melnikova, A.F.; Zasedatelev, A.S.; Kolchinsky, A.M.; Gursky, G.V.; Zhuze, A.L.; Grochovsky, S.L.; Mirzabekov, A.S. Accessibility of the minor groove of DNA in chromatin to the binding of antibiotics netropsin and distamycin A. *Mol. Biol. Rep.*, 1975, 2(2), 135-142.

[328] Grant, M.A.; Baron, R.M.; Macias, A.A.; Layne, M.D.; Perrella, M.A.; Rigby, A.C. Netropsin improves survival from

endotoxaemia by disrupting HMGA1 binding to the NOS2[345] Chiang, S. H.; Bürli, R. H.; Benz, C. C.; Gawron, L.; promoter. *Biochem. J.*, 2009, 418(1), 103-112.

[329] Ueno, A.; Baek, K.; Jeon, C.; Agarwal, K. Netropsin-binding site of the HER2/neu promoter with pyrrole-imidazole specifically enhances RNA polymerase II termination at polyamides. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(32), 24246-24254.

terminator sites in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1992,[346] Wurtz, N. R.; Pomernatz, J. L.; Baltimore, D.; Dervan, 89(9), 3676-3680.

[330] Baliga, R.; Crothers, D.M. On the kinetics of distamycin-imidazole polyamides. *Biochemistry*, 2002, 41(24), 7604-7609.

Sci. U S A., 2000, 97(14), 7814-7818.

[347] Raskatov, J.A.; Meier, J.L.; Puckett, J.H.; Yang, F.; [331] Wang, S.; Munde, M.; Wang, S.; Wilson, H.D. Minor groove binding of NF- κ B to major groove, an unusual DNA sequence-dependent gene transcription using programmable DNA minor change in bend directionality by a distamycin dimer-groove binders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2012, 109(4), *Biochemistry*, 2011, 50(35), 7674-7683.

[332] Ciucci, A.; Feriotto, G.; Mischiati, C.; Gambari, R.; [348] Gearhart, M.D.; Dickinson, L.; Ehley, J.; Melander, C.; Animati, F.; Lombardi, P.; Natali, P.G.; Arcamone, F.; Dervan, P.B.; Wright, P.E.; Gottesfeld, J.M. Inhibition of Giacomini, P. Distamycin analogues with improved sequence-DNA binding by human estrogen-related receptor 2 and specific DNA binding activities. *Biochem Pharmacol.*, 1994, estrogen receptor alpha with minor groove binding polyamides. *Biochemistry*, 2005, 44(11), 4196-4203.

[333] Broggin, M.; Ponti, M.; Ottolenghi, S.; D'Incalci, M.; [349] Nickols, N.G.; Dervan, P.B. Suppression of androgen Mongelli, N.; Mantovani, R. Distamycins inhibit the binding-receptor-mediated gene expression by a sequence-specific of OTF-1 and NFE-1 transactors to their conserved DNA-binding polyamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2007, 104(25), 10418-10423.

[334] Feriotto, G.; Ciucci, A.; Mischiati, C.; Animati, F.; [350] Chenoweth, D.M.; Dervan, P.B. Structural basis for Lombardi, P.; Giacomini, P.; Arcamone, F.; Gambari, R. cyclic Py-Im polyamide allosteric inhibition of nuclear Binding of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 to DNA: receptor binding. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132(41), 14521-14529.

Eur. J. Pharmacol., 1994, 267(2), 143-149.

[351] Matsuda, H.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Tahira, H.; Ayame, [335] Bazhulina, N.P.; Nikitin, A.M.; Rodin, S.A.; Surovaya, H.; Zhang, H.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Saito, S.; A.N.; Kravatsky, H.V.; Pismensky, V.F.; Archipova, V.S.; Matsumoto, K.; Mugishima, H.; Serie, K. Development of Martin, R.; Gursky, G.V. Binding of Hoechst 33258 and its gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting the derivatives to DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2009, 26(6), 701-718.

J. Am. Soc. Nephrol., 2006, 17(2), 422-432.

[336] White, C.M.; Heidenreich, O.; Nordheim, A.; Beerman, A.; Baird, E.E.; Dervan, P.B. Inhibition of T.A. Evaluation of the effectiveness of DNA-binding drugs to major-groove binding proteins by pyrrole-imidazole inhibit transcription using the c-fos serum response element as polyamides with an Arg-Pro-Arg positive patch. *Chem. Biol.*, a target. *Biochemistry*, 2000, 39(40), 12262-12273.

1998, 5(3), 119-133.

[337] Wu, J.; Apontes, P.; Song, L.; Liang, P.; Yang, L.; Li, F. [353] Henry, J.A.; Le, N.M.; Nguyen, B.; Howard, C.M.; Molecular mechanism of upregulation of survivin. *Bailey, S.L.; Horick, S.M.; Buchmueller, K.L.; Kotecha, M.; transcription by the AT-rich DNA-binding ligand, Hochhauser, D.; Hartley, J.A.; Wilson, H.D.; Lee, M. Hoechst 33342: evidence for survivin involvement in drug targeting the inverted CCAAT box 2 in the topoisomerase resistance. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35(7), 2390-2402.*

Imidazole-pyrrole polyamide [338] Mrksich, M.; Wade, H.S.; Dwyer, T.J.; Geierstanger, B. Hairpin: design, synthesis, molecular biology, and biophysical B.H.; Wemmer, D.E.; Dervan, P.B. Antiparallel side-by-side studies. *Biochemistry*, 2004, 43(38), 12249-12257.

dimeric motif for sequence-specific recognition in the minor [354] Hochhauser, D.; Kotecha, M.; O'hare, C.; Morris, P.J.; groove of DNA by the designed peptide 1-methylimidazole-2-ylidene. *Hartley, J.M.; Taherbhai, Z.; Harris, D.; Forni, C.; Mantovani, carboxamide netropsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1992, R.; Lee, M.; Hartley, J.A. Modulation of topoisomerase 89(16), 7586-7590.

Imidazole-pyrrole polyamide [339] Dervan, P.B. Design of sequence-specific DNA-binding molecules. *Cancer Ther.*, 2007, 6(1), 346-354.

Science, 1986, 232(4749), 464-471.

[355] Olenyuk, B.Z.; Zhang, G.J.; Klco, J.M.; Nickols, N.G.; [340] Dervan, P.B.; Doss, R.M.; Marques, M.A. Kaelin, H.G. Jr.; Dervan, P.B. Inhibition of vascular Programmable DNA binding oligomers for control of endothelial growth factor with a sequence-specific hypoxia transcription. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents*, 2005, response element antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 5(4), 373-387.

2004, 101(48), 16768-16773.

[341] Arndt, H.D.; Schoof, S. Polyamide- and RNA-based [356] Kageyama, H.; Sugiyama, H.; Ayame, H.; Iwai, A.; activators in living cells: a major step towards controlling gene expression. *Fujii, H.; Huang, L.E.; Kizaka-Kondoh, S.; Hiraoka, M.; expression. *Chembiochem.*, 2007, 8(10), 1095-1098.*

Kihara, K. Suppression of VEGF transcription in renal cell [342] Nelson, S.M.; Ferguson, L.R.; Denny, H.A. Non-carcinoma cells by pyrrole-imidazole hairpin polyamides covalent ligand/DNA interactions: minor groove binding targeting the hypoxia responsive element. *Acta. Oncol.*, 2006, agents. *Mutat Res.*, 2007, 623(1-2), 24-40.

45(3), 317-324.

[343] Ehley, J.A.; Melander, C.; Herman, D.; Baird, E.E.; [357] Taniguchi, M.; Fujiwara, K.; Nakai, H.; Ozaki, T.; Ferguson, H.A.; Goodrich, J.A.; Dervan, P.B.; Gottesfeld, J.M. Koshikawa, N.; Toshio, K.; Kataba, M.; Oguni, A.; Matsuda, J.M. Promoter scanning for transcription inhibition with DNA-H.; Yoshida, H.; Tokuhashi, H.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Soma, binding polyamides. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22(6), 1723-1733.

M.; Nagase, H. Inhibition of malignant phenotypes of human [344] Supekova, L.; Pezacki, J.P.; Su, A.I.; Loweth, C.J. Osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole Riedl, R.; Geierstanger, B.; Schultz, P.G.; Wemmer, D.E. polyamide, which targets an E-box motif. *FEBS Open. Bio.*, Genomic effects of polyamide/DNA interactions on mRNA expression. *Chem. Biol.*, 2002, 9(7), 821-827.

[358] Dickinson, L.A.; Trauger, J.H.; Baird, E.E.; Dervan,[372] Tomlins, S.A.; Rhodes, D.R.; Perner, S.; Dhanasekaran, P.B.; Graves, B.J.; Gottesfeld, J.M. Inhibition of Ets-1 DNAs.M.; Mehra, R.; Sun, X.H.; Varambally, S.; Cao, X.; binding and ternary complex formation between Ets-1, NF-Tchinda, J.; Kuefer, R.; Lee, C.; Montie, J.E.; Shah, R.B.; kappaB, and DNA by a designed DNA-binding ligand. *J. Biol. Pienta, K.J.; Rubin, M.A; Chinnaiyan, A.M. Recurrent fusion Chem., 1999, 274(18), 12765-12773.*

[359] Mayhood, T.; Kaushik, N.; Pandey, P.K.; Kashanchi, F.;cancer. *Science, 2005, 310 (5748), 644-648.*

Deng, L.; Pandey, V.N. Inhibition of Tat-mediated[373] Sorensen, P.H.; Lessnick, S.L.; Lopez-Terrada, D.; Liu, transactivation of HIV-1 LTR transcription by polyamideX.F.; Triche, T.J.; Denny, C.T. A second Ewing's sarcoma nucleic acid targeted to TAR hairpin element. *Biochemistry,translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-2000, 39(38), 11532-11539.*

[360] Livengood, J.A.; Fechter, E.J.; Dervan, P.B.; Nyborg,151. family transcription factor, ERG. *Nat. Genet., 1994, 6(2), 146-*

J.K. Paradoxical effects of DNA binding polyamides on[374] Marcucci, G.; Baldus, C.D.; Ruppert, A.S.; Radmacher, HTLV-1 transcription. *Front. Biosci., 2004, 9, 3058-3067.*

[361] Schaal, T.D.; Mallet, H.G.; McMinn, D.L.; Nguyen,C.G.; Vardiman, J.H.; Powell, B.L.; Baer, M.R.; Moore, J.O.; N.V.; Sopko, M.M.; John, S.; Parekh, B.S. Inhibition ofPerrotti, D.; Caligiuri, M.A.; Carroll, A.J.; Larson, R.A.; de la human papilloma virus E2 DNA binding protein by covalentlyChapelle, A.; Bloomfield, C.D. Overexpression of the ETS-linked polyamides. *Nucleic Acids Res., 2003, 31(4), 1282-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid 1291.*

[362] Blattes, R.; Monod, C.; Susbielle, G.; Cuvier, O.; Wu,Group B study. *J. Clin. Oncol., 2005, 23(36), 9234-9342.*

J.H.; Hsieh, T.S.; Laemmli, U.K.; Käs, E. Displacement of[375] Shimizu, K.; Ichikawa, H.; Tojo, A.; Kaneko, H.; D1, HP1 and topoisomerase II from satellite heterochromatinMaseki, N.; Hayashi, H.; Ohira, M.; Asano, S.; Ohki, M. An by a specific polyamide. *EMBO J., 2006, 25(11), 2397-2408.* ets-related gene, ERG, is rearranged in human myeloid

[363] Yang, F.; Nickols, N.G.; Li, B.C.; Marinov, G.K.; Said,leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Proc. Natl. J.H.; Dervan, P.B. Antitumor activity of a pyrrole-imidazoleAcad. Sci. U S A., 1993, 90(21), 10280-10284.*

polyamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 2013, 110(5), 1863-376] Moore, S.D.; Offor, O.; Ferry, J.A.; Amrein, P.C.; 1868.*

[364] Blaskó, A.; Bruce, T.C. Stoichiometry and structure ofafacue myeloid leukemia with a t(X;21)(q25-26;q22). *Leuk. complexes of DNA oligomers with microgonotropens andRes., 2006, 30(8),1037-1042.*

distamycin by 1H NMR spectroscopy and molecular[377] Rahim, S.; Uren, A. Emergence of ETS transcription modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1993, 90(21), 10018-factors as diagnostic tools and therapeutic targets in prostate 10022.*

[365] Bruce, T.C.; Sengupta, D.; Blaskó, A.; Chiang, S.H.;[378] Nhili, R.; Peixoto, P.; Depauw, S.; Flajollet, S.; Dezitter, Beerman, T.A. A microgonotropen branched decaazaX.; Munde, M.M.; Ismail, M.A.; Kumar, A.; Farahat, A.A.; decabutylamine and its DNA and DNA/transcription factorStephens, C.E.; Duterque-Coquillaud, M.; David Wilson, H.; interactions. *Bioorg. Med. Chem., 1997, 5(4), 685-692.*

Boykin, D.H.; David-Cordonnier, M.H. Targeting the DNA-[366] White, C.M.; Satz, A.L.; Bruce, T.C.; Beerman, T.A.binding activity of the human ERG transcription factor using Inhibition of transcription factor-DNA complexes and genenew heterocyclic dithiophene diamidines. *Nucleic Acids Res., expression by a microgonotropen. Proc. Natl. Acad. Sci. U S2013, 41(1), 125-38.*

A., 2001, 98(19), 10590-10595. [379] Flajollet, S.; Tian, T.V.; Flourens, A.; Tomavo, N.;

[367] Paine, M.F.; Wang, M.Z.; Generaux, C.N.; Boykin, Vickers, A.; Bonnelye, E.; Aubert, S.; Leroy, X.; Duterque-D.H.; Wilson, H.D.; De Koning, H.P.; Olson, C.A.; Pohlig,Coquillaud, M. Abnormal expression of the ERG transcription G.; Burri, C.; Brun, R.; Murilla, G.A.; Thuita, J.K.; Barrett,factor in prostate cancer cells activates osteopontin. *Mol. M.P.; Tidwell, R.R. Diamidines for human AfricanCancer Res., 2011, 9(7), 914-924.*

trypanosomiasis. *Curr. Opin. Investig. Drugs, 2010, 11(8),[380] Munde, M.; Poon, G.M.K.; Wilson, H.D. Probing the 876-883.*

electrostatics and pharmacological modulation of sequence-[368] Wilson, H.D.; Nguyen, B.; Tanius, F.A.; Mathis, A.;specific binding by the DNA-binding domain of the ETS Hall, J.E.; Stephens, C.E.; Boykin, D.H. Dications that targetfamily transcription factor PU.1: a binding affinity and the DNA minor groove: compound design and preparation,kinetics investigation. *J. Mol. Biol., 2013, 425(10), 1655-DNA interactions, cellular distribution and biological activity.1669.*

Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents, 2005, 5(4), 389-408. [381] Munde, M.; Wang, S.; Kumar, A.; Stephens, C.E.;

[369] Wilson, H.D.; Tanius, F.; Ding, D.; Kumar, A.;Farahat, A.A.; Boykin, D.H.; Wilson, H.D.; Poon, G.M. Boykin, D.H.; Colson, P.; Houssier, C.; Bailly, C. NucleicStructure-dependent inhibition of the ETS-family transcription acid interactions of unfused aromatic cations: evaluation offactor PU.1 by novel heterocyclic diamidines. *Nucleic Acids proposed minor-groove, major-groove, and intercalationRes., 2014, 42(2), 1379-1390.*

binding modes. *J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 10310-10321.* [382] Van Hecke, K.; Nam, P.C.; Nguyen, M.T.; Van [370] Bailly, C.; Tardy, C.; Wang, L.; Armitage, B.; Hopkins,Meervelt, L. Netropsin interactions in the minor groove of K.; Kumar, A.; Schuster, G.B.; Boykin, D.H.; Wilson, H.D.d(Ggccaattgg) studied by a combination of resolution Recognition of ATGA sequences by the unfused aromaticenhancement and ab initio calculations. *Febs J., 2005, dication DB293 forming stacked dimers in the DNA minor272(14), 3531-41.*

groove. *Biochemistry, 2001, 40(33), 9770-9779.* [383] Mitra, S.N.; Wahl, M.C.; Sundaralingam, M. Structure [371] Peixoto, P.; Liu, H.; Depauw, S.; Hildebrand, M.P.;of the side-by-side binding of distamycin to d(Gtatatac)2. *Acta Boykin, D.H.; Bailly, C.; Wilson, H.D.; David-Cordonnier, Crystallogr., 1999, 55(Pt 3):602-609.*

M.H. Direct inhibition of the DNA-binding activity of POU[384] Bailly, C.; Payet, D.; Travers, A.A.; Waring, M.J. PCR-transcription factors Pit-1 and Brn-3 by selective binding of abased development of DNA substrates containing modified phenyl-furan-benzimidazole dication. *Nucleic Acids Res.,bases: an efficient system for investigating the role of the 2008, 36(10), 3341-3353.*

exocyclic groups in chemical and structural recognition by

minor groove binding drugs and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1996, 93(24), 13623-13628.

[385] Sastry, M.; Patel, D.J. Solution structure of the factor FoxM1 by thiazolidinediones and mithramycin. *Cancer mithramycin dimer-DNA complex. Biochemistry*, 1993, 32(26), 6588-6604.

[386] Malek, A.; Núñez, L.E.; Magistri, M.; Brambilla, L.; Zhang, B.F.; Pei, D.S.; Ma, P.; Zheng, J.N. A critical role of Jovic, S.; Carbone, G.M.; Morís, F.; Catapano, C.V. Sp1 transcription factor in regulating the human Ki-67 gene. *Modulation of the activity of Sp transcription factors by expression. Tumour Biol.*, 2011, 32(2), 273-283.

[402] Lee, J.J.; Park, K.; Shin, M.H.; Yang, H.J.; Song, M.J.; metastatic prostate cancer. *PLoS One*, 2012, 7(4), e35130.

[387] Zhang, J.P.; Zhang, H.; Wang, H.B.; Li, H.X.; Liu, G.H.; Xing, S.; Li, M.Z.; Zeng, M.S.; Down-regulation of Sp1 human TGFBI gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, 409(2), 222-228.

[403] Yang, H.J.; Song, M.J.; Park, E.H.; Lee, J.J.; Park, J.H.; carcinoma. *J. Transl. Med.*, 2014, 12(1), 222.

[388] Bartkowiak, J.; Kapuscinski, J.; Melamed, M.R.; Darzynkiewicz, Z. Selective displacement of nuclear proteins by antitumor drugs having affinity for nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1989, 86(13), 5151-5154.

[389] Ray, R.; Snyder, R.C.; Thomas, S.; Koller, C.A.; Miller, D.M. Mithramycin blocks protein binding and function of the SV40 early promoter. *J. Clin. Invest.*, 1989, 83(6), 2003-2007.

[390] Snyder, R.C.; Ray, R.; Blume, S.; Miller, D.M. Mithramycin blocks transcriptional initiation of the c-myc P1 and P2 promoters. *Biochemistry*, 1991, 30(17), 4290-4297.

[391] Blume, S.H.; Snyder, R.C.; Ray, R.; Thomas, S.; Miller, D.M. Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.*, 1991, 88(5), 1613-1621.

[392] Krikun, G.; Schatz, F.; Mackman, N.; Guller, S.; Demopoulos, R.; Lockwood, C.J. Regulation of tissue factor gene expression in human endometrium by transcription factors Sp1 and Sp3. *Mol. Endocrinol.*, 2000, 14(3), 393-400.

[393] Aslam, F.; Palumbo, L.; Augenlicht, L.H.; Velcich, A. Genome-wide modulation of gene transcription in ovarian carcinoma cells by a new mithramycin analogue. *PLoS One*, 2014, 9(8), e104687.

[394] Kaluz, S.; Kaluzová, M.; Stanbridge, E.J. Expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX is critically dependent on SP1 activity. Identification of a novel type of hypoxia-responsive enhancer. *Cancer Res.*, 2003, 63(5), 917-922.

[395] Koutsodontis, G.; Kardassis, D. Inhibition of P53-mediated transcriptional responses by mithramycin A. *Oncogene*, 2004, 23(57), 9190-9200.

[396] Wang, L.G.; Ferrari, A.C. Mithramycin targets Sp1 and the androgen receptor transcription level-potential therapeutic role in advanced prostate cancer. *Transl. Oncogenomics*, 2006, 1, 19-31.

[397] Lee, H.K.; Isham, C.R.; Kaufman, S.H.; Bible, K.C. Flavopiridol disrupts STAT3/DNA interactions, attenuates transcription, and combines with the kinase inhibitor AG490 to achieve cytotoxic synergy. *Cancer Ther.*, 2006, 5(1), 138-148.

[398] Tang, T.; Lin, X.; Yang, H.; Zhou, L.; Wang, Z.; Guo, Z. Overexpression of antioxidant enzymes and upregulates aryl hydrocarbon receptor expression via increased Sp1 DNA-binding activity. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, 49(3), 487-492.

[399] Logotheti, S.; Michalopoulos, I.; Sideridou, M.; Daskalos, A.; Kossida, S.; Spandidos, D.A.; Field, J.K.; Vojtesek, B.; Liloglou, T.; Gorgoulis, V.; Zoumpourlis, V. Sp1 binds to the external promoter of the p73 gene and induces the expression of TAP73 in lung cancer. *FEBS J.*, 2010, 277(14), 3014-3027.

[400] Petrovic, V.; Costa, R.H.; Lau, L.F.; Raychaudhuri, P.; Tyner, A.L. Negative regulation of the oncogenic transcription factor FoxM1 by thiazolidinediones and mithramycin. *Cancer mithramycin dimer-DNA complex. Biochemistry*, 1993, 32(26), 6588-6604.

[401] Tian, H.; Qian, G.H.; Li, H.; Chen, F.F.; Di, J.H.; Zhang, B.F.; Pei, D.S.; Ma, P.; Zheng, J.N. A critical role of Sp1 transcription factor in regulating the human Ki-67 gene. *Modulation of the activity of Sp transcription factors by expression. Tumour Biol.*, 2011, 32(2), 273-283.

[402] Lee, J.J.; Park, K.; Shin, M.H.; Yang, H.J.; Song, M.J.; metastatic prostate cancer. *PLoS One*, 2012, 7(4), e35130.

[403] Yang, H.J.; Song, M.J.; Park, E.H.; Lee, J.J.; Park, J.H.; carcinoma. *J. Transl. Med.*, 2014, 12(1), 222.

[404] Saha, S.; Mukherjee, S.; Mazumdar, M.; Manna, A.; Khan, P.; Adhikary, A.; Kajal, K.; Jana, D.; Sa, G.; Mukherjee, S.; Sarkar, D.K.; Das, T. Mithramycin A sensitizes therapy-resistant breast cancer stem cells toward genotoxic drug doxorubicin. *Transl. Res.*, 2014, 154(14), 384-393.

[405] Estève, P.O.; Chin, H.G.; Pradhan, S. Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282(4), 2615-2625.

[406] Finotti, A.; Bianchi, N.; Fabbri, E.; Borgatti, M.; Breveglieri, G.; Gasparello, J.; Gambari, R. Erythroid induction of K562 cells treated with mithramycin is associated with inhibition of raptor gene transcription and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) functions. *Pharmacol. Res.*, 2014, 91C, 57-68.

[407] Vizcaíno, C.; Núñez, L.E.; Morís, F.; Portugal, J. Genome-wide modulation of gene transcription in ovarian carcinoma cells by a new mithramycin analogue. *PLoS One*, 2014, 9(8), e104687.

[408] Yuan, P.; Wang, L.; Wei, D.; Zhang, J.; Jia, Z.; Li, Q.; Wang, H.; Yao, J.; Xie, K. Therapeutic inhibition of Sp1 expression in growing tumors by mithramycin correlates with potent antiangiogenic effects on human pancreatic cancer. *Cancer*, 2007, 110(12), 2682-2690.

[409] Wang, L.; Guan, X.; Zhang, J.; Jia, Z.; Wei, D.; Li, Q.; Yao, J.; Xie, K. Targeted inhibition of Sp1-mediated transcriptional responses by mithramycin A. *Int. J. Oncol.*, 2004, 23(57), 9190-9200.

[410] Otjacques, E.; Binsfeld, M.; Rocks, N.; Blacher, S.; Vanderkerken, K.; Noel, A.; Beguin, H.; Cataldo, D.; Caers, J. Mithramycin exerts an anti-myeloma effect and displays antiangiogenic effects through up-regulation of anti-angiogenic factors. *PLoS One*, 2013, 8(5), e62818.

[411] Zhao, H.; Zhang, H.; Guo, Z.; Ma, F.; Wu, H.; Bai, H.; Gong, H.; Chen, H.; Cheng, T.; Zhi, F.; Zhang, H.; Wang, J.; Jiang, B. Inhibition of the transcription factor Sp1 suppresses colon cancer stem cell growth and induces apoptosis in vitro and in nude mouse xenografts. *Oncol. Rep.*, 2013, 30(4), 1782-1792.

[412] Previdi, S.; Malek, A.; Albertini, V.; Riva, C.; Capella, C.; Broggin, M.; Carbone, G.M.; Rohr, J.; Catapano, C.V. Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin A and its derivatives. *Gynecol. Oncol.*, 2010, 118(2), 182-188.

[413] Seznec, J.; Silkenstedt, B.; Naumann, U. Therapeutic effects of the Sp1 inhibitor mithramycin A in glioblastoma. *J. Neurooncol.*, 2011, 101(3), 365-377.

[414] Sankpal, U.T.; Maliakal, P.; Bose, D.; Kayaleh, O.; [425] Park S.; Song J. S.; Lee D. K.; Yang C. H. Suppression of AP-1 activity by tanshinone and cancer cell growth transcription factors in pancreatic cancer and their association. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 1999, 20, 925–928.

[415] Sleiman, S.F.; Langley, B.C.; Basso, M.; Berlin, J.; Xia, C.H. Eupafolin inhibits PGE2 production and COX2 expression in LPS-stimulated human dermal fibroblasts by blocking JNK/AP-1 and Nox2/p47(phox) pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2014, 279(2), 240-251.

[416] Zavala, K.; Lee, J.; Chong, J.; Sharma, M.; Eilers, H.; [428] Gnyoszka, A.; Jastrzebski, Z.; Flis S. DNA Schumacher, M.A. The anticancer antibiotic mithramycin-Amethyltransferase inhibitors and their emerging role in inhibits TRPV1 expression in dorsal root ganglion neurons. *Anticancer Res.*, 2013, 33(8), 2989-2996.

[417] Grohar, P.J.; Griffin, L.B.; Yeung, C.; Chen, Q.R.; [429] Carlson, S.; Glass K.C. The MOZ histone Pommier, H.; Khanna, C.; Khan, J.; Helman, L.J. acetyltransferase in epigenetic signaling and disease. *J. Cell. Ectinascidin 743 interferes with the activity of EWS-FLI1 in Physiol.*, 2014, 229(11), 1571-1574.

[418] Banerjee, A.; Sanyal, S.; Kulkarni K.K.; Jana, K.; Roy, S.; Das, C.; Dasgupta, D. Anticancer drug mithramycin interacts with core histones: An additional mode of action of the DNA groove binder. *FEBS Open Bio.*, 2014, 4, 987-995. inhibitors for cancer treatment. *J. Clin. Invest.*, 2014, 124(1), 30-39.

[419] Hou, M.H.; Robinson, H.; Gao, H.G.; Wang, A.H. Crystal structure of the [mg2+-(Chromomycin a3)2]-[432] Chen, Q.H.; Zhu, X.H.; Li, H.H.; Meng, Z.Q. Epigenetic d(Tggccaa)2 complex reveals gcc binding specificity of the regulation and cancer (review). *Oncol. Rep.*, 2014, 31(2), 523-532.

[420] Ng, P.H.; Tang, H.; Knosp, H.M.; Stadler, H.S.; Shaw, E.; Eckschlager, T. Histone deacetylase inhibitors in cancer J.T. Synthesis of diverse lactam carboxamides leading to the therapy. *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc* Chem. Int. Ed. Engl., 2007, 46(28), 5352-5355.

[421] Baruah, H.; Bierbach, U. Unusual intercalation of Morishita, R. Development of nucleic acid drugs for acridin-9-ylthiourea into the 5'-GA/TC DNA base step from neurological disorders. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2012, 12(15), 1621-1629.

[422] Budiman, M.E.; Bierbach, U.; Alexander, R.H. DNA Zanonati, F.; Abrami, M.; Grassi, M. Therapeutic potential of minor groove adducts formed by a platinum-acridin nucleic acid-based drugs in coronary hyper-proliferative conjugate inhibit association of tata-binding protein with its vascular diseases. *Curr. Med. Chem.*, 2013, 20(28), 3515-3538.

[423] Dutta, S.; Snyder, M.J.; Rosile, D.; Binz, K.L.; Roll, C.H.; Ren, J.; Liu, C.H.; Ren, J.; Liu, C.M.; Liu, P.K. Intracellular E.H.; Suryadi, J.; Bierbach, U.; Guthold, M. PT-ACRAMTU, gene transcription factor protein-guided MRI by DNA a platinum-acridine anticancer agent, lengthens and adaptamers in vivo. *FASEB J.*, 2014, 28(1), 464-473.

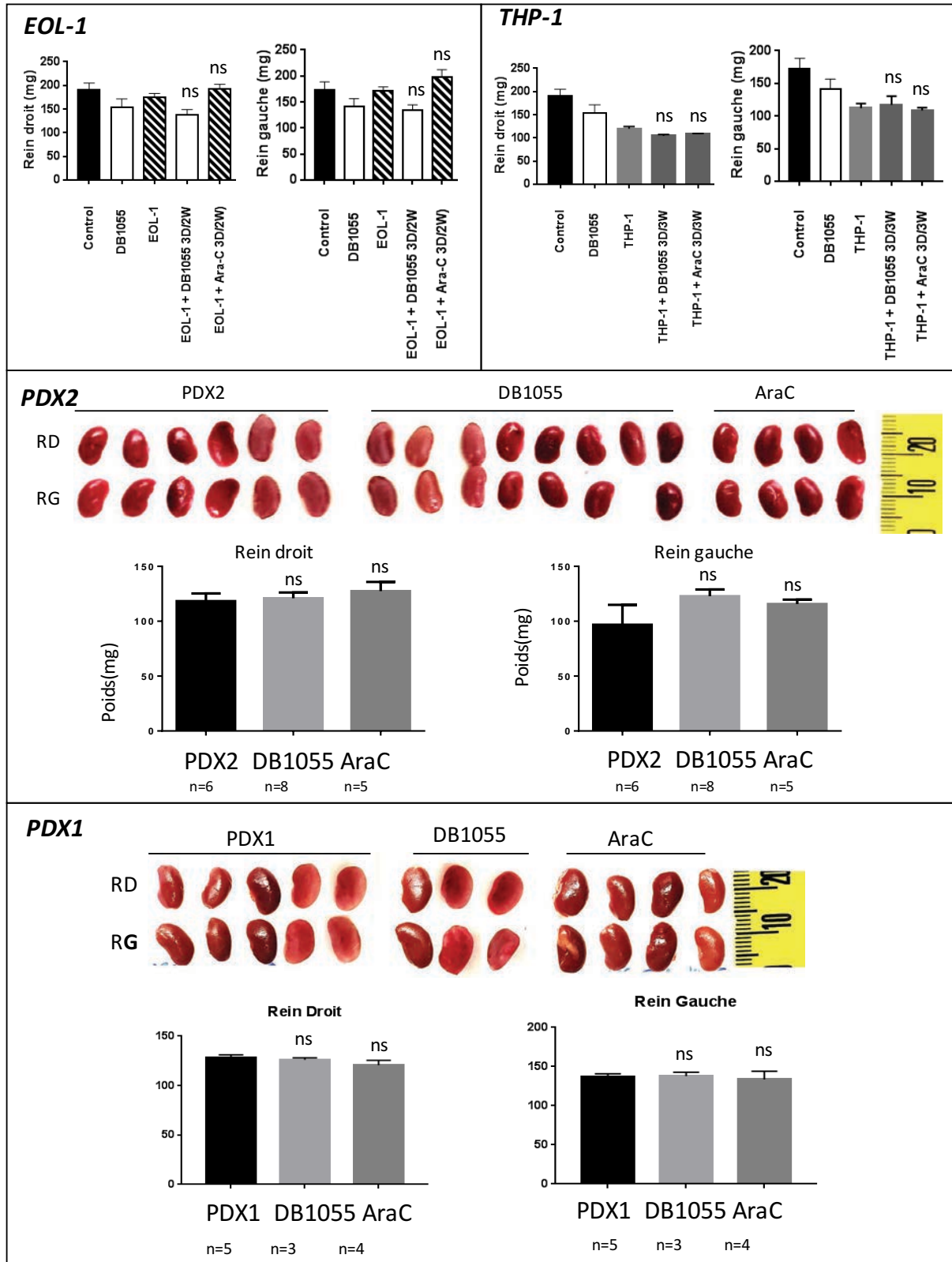
[424] Zhang, Z.; Zhang, J.; Jin, L.; Song, T.; Wu, G.; Gao, J. Bioinformatic analysis. *Biochemistry*. 2014, 53(18), 865-874.

[433] Hrabeta, J.; Stiborova, M.; Adam, V.; Kizek, R.; F.; Lamberti, G.; Barba, A.; Fiorentino, S.; Fiotti, N.; Tanshinone IIA interacts with DNA by minor groove-binding. *Biol. Pharm. Bull.*, 2008, 31(12), 2342-2345.

Annexe 2

Poids des reins des souris des expérimentations de traitement au DB1055, dans les modèles EOL-1, THP-1, PDX1 et PDX2. Les poids des reins des souris traitées au DB1055 ou à l'AraC ont été comparés aux poids des souris non traitées (EOL-1, THP-1, PDX1 et PDX2).

Les souris ne présentent pas de différence significative de poids des reins au sacrifice entre les souris leucémiques traitées et non traitées. Unpaired t-test ns= non significatif.



Annexe 3

Suivi de poids des souris des expérimentations de traitement au DB1055, dans les modèles EOL-1, THP-1, PDX1 et PDX2.

Le traitement au DB1055 n'impacte pas le poids des souris au cours de l'expérience.

