



HAL
open science

La phosphatase CDC25A et le micro-ARN-16 au coeur de la biologie des leucémies aiguës myéloïdes portant une mutation FLT3-ITD

Gabrielle Sueur

► **To cite this version:**

Gabrielle Sueur. La phosphatase CDC25A et le micro-ARN-16 au coeur de la biologie des leucémies aiguës myéloïdes portant une mutation FLT3-ITD. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30156 . tel-02879095

HAL Id: tel-02879095

<https://theses.hal.science/tel-02879095>

Submitted on 23 Jun 2020

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Gabrielle SUEUR

Le 12 septembre 2019

La phosphatase CDC25A et le micro-ARN-16 au cœur de la biologie des leucémies aiguës myéloïdes portant une mutation FLT3-ITD.

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Stéphane MANENTI

Jury

M. Olivier COQUERET, Rapporteur

M. Didier BOUSCARY, Rapporteur

M. Stéphan VAGNER, Rapporteur

Mme Anastassia HATZOGLOU, Examinatrice

M. Stéphane MANENTI, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : mes rapporteurs, les Pr. Bouscary et Coqueret et le Dr. Vagner, pour leurs retours et la discussion lors de la soutenance, et le Pr. Anastassia Hatzoglou d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie également vivement les Dr. Stéphane Manenti et Sarah Bertoli d'avoir encadré mon travail de thèse pendant ces quatre ans, et tout ce que j'ai pu apprendre en travaillant avec vous.

C'est long une thèse, on en croise des gens ! Un énorme merci donc à tous ceux que j'ai pu côtoyer dans la joyeuse équipe 8 - dont je maintiens que la devise officielle devrait être "on est les plus sympas"- qu'ils aient été titulaires, stagiaires, ou autres contrats précaires ! Merci d'abord pour tous les échanges et l'entraide autour de la science, puisqu'il nous arrive parfois d'en faire. Mais surtout merci pour les pots, les gateaux, la randos, les ragots, le non-travail au bureau, les discussions couture/cinéma/politique/etc, les pauses repas qui trainent, les antithèses, les Friday drinks, la peinture, les retraites, les paillettes, les cinés, les 14 juillet, les soirées, le karaoké, les marchés, le ski, les barbeuc', ... Chacun se reconnaîtra où il veut, mais à tous merci pour les souvenirs !

Et comme contrairement à ce qu'on voudrait nous faire croire on ne passe pas toute sa thèse au labo, merci aux amis et à la famille (et à Christophe, ni tout à fait l'un ni tout à fait l'autre et du coup un peu les deux ?) d'avoir suivi cette aventure, rendez-vous à la prochaine !

TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES	5
INDEX DES TABLEAUX	8
GLOSSAIRE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES	9
INTRODUCTION	11
I. LES LEUCEMIES AIGÜES MYELOÏDES	12
A. L'HEMATOPOÏESE	12
a) Généralités sur l'hématopoïèse	12
b) La cellule souche hématopoïétique	12
c) La niche hématopoïétique	13
d) Déroulement de l'hématopoïèse	14
e) Facteurs régulant l'hématopoïèse	15
B. GROS PLAN SUR LA DIFFERENCIATION GRANULO-MONOCYTAIRE	17
C. HEMOPATHIES MALIGNES	19
D. LES LEUCEMIES AIGÜES MYELOÏDES (LAM)	19
a) Généralités	19
b) Hématopoïèse leucémique	19
c) Symptômes et diagnostic	20
d) Classification et pronostic	21
e) Mutations et leucémogenèse	25
f) Thérapie historique : le 3+7	27
g) Nouvelles stratégies thérapeutiques	28
II. LE RECEPTEUR FLT3 ET SA MUTATION ITD	30
A. RECEPTEUR SAUVAGE	30
a) Structure du récepteur	30
b) Expression et fonctions de FLT3	31
a) Signalisation en aval de FLT3	33
b) Le FLT3 ligand	34
c) FLT3 et son ligand dans l'hématopoïèse leucémique	34
B. LE RECEPTEUR MUTE FLT3-ITD	35
a) Description de la mutation ITD	35
b) Signalisation en aval du récepteur muté	35

c)	Impact de la localisation cellulaire de FLT3-ITD sur sa signalisation oncogénique	36
d)	Le rôle inattendu de FLT3-ITD dans le blocage de différenciation	38
e)	Impact pronostique de la mutation FLT3-ITD	38
f)	Mécanismes de résistance à la chimiothérapie	39
C.	DEVELOPPEMENT D'INHIBITEURS DE FLT3	40
a)	Mécanisme(s) et spécificité de l'inhibition de FLT3	40
b)	État de l'art des inhibiteurs de FLT3 utilisés ou testés en clinique	40
c)	Comment contourner le problème des résistances aux inhibiteurs de FLT3 ?	42
III.	LE REGULATEUR DU CYCLE CELLULAIRE CDC25A	44
A.	LE CYCLE CELLULAIRE	44
a)	Les phases du cycle cellulaire	44
b)	Contrôle du déroulement du cycle cellulaire	45
B.	LA FAMILLE DES PHOSPHATASES CDC25	46
a)	Fonction	46
b)	Structure et régulation	47
C.	FONCTIONS NON CANONIQUES DE CDC25A	48
D.	MODES DE REGULATION DE CDC25A	48
a)	Régulation transcriptionnelle de CDC25A	49
b)	Post transcriptionnelle et traductionnelle	51
c)	Stabilité	53
d)	Activité	55
e)	Localisation de CDC25A	56
E.	CDC25A ET CANCER	57
a)	Expression de CDC25A dans les cancers	57
b)	Rôle de CDC25A dans l'oncogenèse	57
c)	Inhibition pharmacologique de CDC25A en cancérologie	58
F.	CDC25A DANS L'HEMATOPOÏÈSE NORMALE ET LEUCEMIQUE	60
IV.	LE MICRO-ARN 16	63
A.	LES MICRO-ARN	63
a)	Transcription des micro-ARN	63
b)	La voie canonique de maturation des micro-ARN	64
c)	Mécanismes de la régulation de l'expression protéique par les micro-ARN	65
B.	MICRO-ARN ET CANCER	66
a)	Dérégulation de l'expression des micro-ARN dans les cancers	66
b)	Rôle des micro-ARN dans la tumorigenèse	67

c) Les micro-ARN en clinique	68
d) Micro-ARN et LAM	69
C. LE MICRO-ARN 16 (miR-16)	71
a) Les clusters miR-15/16	71
b) Cibles et fonctions biologiques principales	72
c) Fonctions du micro-ARN 16 dans les cancers	73
d) Dérégulations de l'expression du micro-ARN 16 dans les cancers	74
e) Micro-ARN-16 et hémopathies malignes	76

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE **78**

RESULTATS **79**

I. RESUME DES METHODES UTILISEES	80
A. MODELES D'ETUDE	80
B. MODULATION ET QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES MICRO-ARN	80
C. ETUDE DE LA DIFFERENCIATION	81
II. RESULTATS PRINCIPAUX	82
A. REGULATION DE CDC25A EN AVAL DE FLT3-ITD	82
a) FLT3-ITD régule le niveau d'ARNm de CDC25A via STAT5	82
b) STAT5 est un régulateur transcriptionnel direct de CDC25A	83
c) FLT3-ITD réprime l'expression du micro-ARN-16 via STAT5	84
d) Le micro-ARN 16 : régulateur clé de CDC25A en aval de FLT3-ITD	86
B. IMPORTANCE FONCTIONNELLE DU MICRO-ARN-16 DANS LES LAM FLT3-ITD	89
a) La réexpression du micro-ARN-16 dans les cellules FLT3-ITD affecte leur prolifération	89
b) La surexpression du micro-ARN-16 induit la différenciation des cellules FLT3-ITD	91
III. MANUSCRIT	93
IV. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	94
A. IMPORTANCE DE BCL2 DANS LE MODELE FLT3-ITD	94
a) Régulation de l'expression de Bcl2 par FLT3-ITD	94
b) Impact de l'inhibition de Bcl2 dans les cellules leucémiques FLT3-ITD	94
B. IMPACT DE L'ADHESION CELLULAIRE SUR LES CELLULES FLT3-ITD	95
V. CONCLUSION DES RESULTATS	97

DISCUSSION GENERALE	98
BIBLIOGRAPHIE	105
ANNEXES	140
VI. MANUSCRIT	141

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Représentation de la niche hématopoïétique.....	13
Figure 2. Déroulement de l'hématopoïèse	15
Figure 3 Principaux facteurs régulant l'hématopoïèse	16
Figure 4. Déroulement de la granulo-monopoïèse	17
Figure 5. Acteurs de la régulation de la granulo-monopoïèse	18
Figure 6. Comparaison de l'hématopoïèse normale et leucémique.....	20
Figure 7. Modèle du « double hit » d'après Gilliland et Griffin.....	25
Figure 8. Evolution clonale des cellules leucémiques	27
Figure 9. Structure générale du récepteur FLT3.....	30
Figure 10. Structure du récepteur FLT3	31
Figure 11. Expression de FLT3 dans l'hématopoïèse normale	32
Figure 12. Principales voies activées en aval du complexe FL/FLT3.....	33
Figure 13. Activation constitutive du récepteur FLT3 par la mutation ITD	35
Figure 14. Signalisation oncogénique de FLT3-ITD en fonction de sa localisation cellulaire.	37
Figure 15. Enchaînement des phases du cycle cellulaire	44
Figure 16. Principaux points de contrôle du cycle cellulaire.....	45
Figure 17. Fonction des phosphatases CDC25 dans la régulation des CDK au cours du cycle cellulaire	46
Figure 18. Structure commune aux trois phosphatases CDC25.....	47
Figure 19. Variants d'épissage des CDC25.....	51
Figure 20. Dégradation de CDC25A au cours du cycle cellulaire.....	53

Figure 21. Résumé des acteurs connus régulant la stabilité et l'activité de CDC25A	56
Figure 22. Structure des inhibiteurs de CDC25 de type quinone les plus puissants.	59
Figure 23. CDC25A contrôle la prolifération et la différenciation des cellules leucémiques en aval de FLT3-ITD.....	61
Figure 24. Survie globale en fonction de l'expression de CDC25A (S. Bertoli).....	62
Figure 25. Etapes du processus de maturation d'un micro-ARN.	64
Figure 26. Représentation schématique de l'unité transcriptionnelle monocistronique de micro-ARN	64
Figure 27. Inhibition de l'expression des ARNm cibles par le micro-ARN	65
Figure 28. Séquences des miR matures membres de la famille miR-15.	72
Figure 29. STAT5 régule le niveau d'ARNm de CDC25A en aval de FLT3-ITD.....	82
Figure 30. STAT5 est un régulateur transcriptionnel direct de <i>CDC25A</i> en aval de FLT3-ITD.....	83
Figure 31. FLT3-ITD réprime l'expression du micro-ARN-16 via STAT5.....	85
Figure 32. Le micro-ARN-16 est un régulateur du niveau protéique de CDC25A en aval de FLT3-ITD. 87	
Figure 33. L'axe FLT3/STAT5/miR-16/CDC25A semble spécifique aux cellules leucémiques FLT3-ITD.88	
Figure 34. La surexpression du micro-ARN 16 inhibe la prolifération des lignées leucémiques et des cellules primaires FLT3-ITD.....	89
Figure 35. Le miR-16 est un acteur de la régulation de la prolifération en aval de FLT3-ITD	90
Figure 36. La surexpression du micro-ARN-16 induit la différenciation monocytaire des cellules FLT3-ITD	92
Figure 37. Régulation du niveau de Bcl2 par le micro-ARN-16 et FLT3-ITD	94
Figure 38. L'inhibition de Bcl2 réduit drastiquement la prolifération des cellules leucémiques FLT3-ITD	95

Figure 39. Impact de l'adhésion sur fibronectine sur la prolifération et le niveau de CDC25A dans les cellules FLT3-ITD..... 96

Figure 40. Résumé schématique des résultats obtenus au cours de cette thèse..... 97

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Durée de vie et renouvellement de certaines cellules hématopoïétiques.....	12
Tableau 2. Classification morphologique (French-American-British) des LAM.....	22
Tableau 3 Classification OMS 2016 des LAM et néoplasmes myéloïdes associés	23
Tableau 4. Classification pronostique des LAM en fonction de leur profil cytogénétique et mutationnel.....	24
Tableau 5. Classement des mutations récurrentes dans les LAM d’après le Cancer Genome Atlas (Ley et al, 2013).....	26
Tableau 6. Tour d ’horizon des thérapies ciblées en cours de développement dans les LAM.	28
Tableau 7. Développement clinique des inhibiteurs de FLT3 dans les LAM.	41
Tableau 8. Essais cliniques basés sur des combinaisons aux inhibiteurs de FLT3 en cours.	43
Tableau 9. Facteurs de transcription régulant directement l’activité du promoteur de CDC25A.....	50
Tableau 10. Micro-ARN ciblant l’ARNm de CDC25A.....	52
Tableau 11. Dérégulation de l’expression des miR dans les LAM	68
Tableau 12. Cibles du micro-ARN 16 et leur implication dans le développement des cancers	73
Tableau 13. Dérégulation de l’expression du micro-ARN 16 dans les cancers	74

GLOSSAIRE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN – Acide DésoxyriboNucléique	FLT3 – Fms-Like Tyrosine kinase 3
ARNm – Acide RiboNucléique messenger	FLT3-ITD – FLT3-Internal Tandem Duplication
AMM – Autorisation de Mise sur le Marché	FL – FLT3 Ligand
ATP – Adénosine TriPhosphate	FLT3-TKD – FLT3 Tyrosine Kinase Domain
ATU – Autorisation Temporaire d’Utilisation	G-CSF – Granulocyte-CSF
Bcl2 – B-cell lymphoma 2	GM-CSF – Granulocyte Monocyte-CSF
Cbf β – Core Binding Factor Beta	GSK-3 β – Glucogen Synthase Kinase 3 Beta
CD - Cluster de Différenciation	HDAC – Histone Deacetylase
CDC25 – Cell Division Cycle 25	IDH – Isocitrate DeHydrogenase
CDK – Cyclin Dependent Kinase	IL - Interleukine
C /EBP – CCAAT/Enhancer-Binding Protein	JAK – Janus Kinase
CFU – Colony Forming Unit	JM - JuxtaMembrane
CFU-GEMM – CFU Granulocyte Erythrocyte Megakaryocyte Monocyte	KO – Knock-Out
CFU-GM – GFU Granulocyte Monocyte	LAM – Leucémie Aiguë Myéloïde
ChIP – Chromatin ImmunoPrecipitation	LAL – Leucémie Aiguë Lymphoïde
CHIP – Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential	LLC – Leucémie Lymphoïde Chronique
CSF – Colony Stimulating Factor	LMC – Leucémie Myéloïde Chronique
(LT /ST)-CSH – Long Term/Short Term Cellule Souche Hématopoïétique	Mcl-1 – Myeloid Leukemia Cell differentiation 1
CSL – Cellule Souche Leucémique	M-CSF – Monocyte-CSF
DLEU2 – Deleted in Leukemia 2	MAPK - Mitogen Activated Protein Kinase
ELN – European LeukemiaNet	MEC – Matrice ExtraCellulaire
ERK – Extracellular signal-Regulated Kinase	MEK – MAPK/ERK Kinase
EPO - Erythropoïétine	miR – Micro-ARN
FAB – French-American-British	miR-16 – Micro-ARN-16
	NES – Nuclear Export Sequence

NLS – Nuclear Localization Sequence

PLK – Polo-Like Kinase

PI3K – Phosphoinositide 3 Kinase

pR – point de Restriction

OncomiR – Micro-ARN oncogénique

Rb - Rétinoblastome

RE(R) – Réticulum Endoplasmique (Rugueux)

RTK – Récepteur à activité Tyrosine Kinase

RT-qPCR – Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction

RUNX1 – Runt-related transcription factor 1

siARN – small interfering ARN

SCF – Stem Cell Factor

SMC4 – Structural Maintenance of Chromosomes 4

STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription

TK – Tyrosine Kinase

TPO - Thrombopoïétine

UV - UltraViolet

WT – Wild Type

INTRODUCTION

Afin de faciliter la compréhension des résultats scientifiques obtenus lors de ce travail de thèse, une introduction présentera dans un premier temps notre modèle d'études : les leucémies aiguës myéloïdes, et plus précisément celles exprimant le récepteur muté FLT3-ITD, auquel une partie sera dédié. Dans un deuxième temps nous décrivons les deux molécules que nous avons étudiées dans ce domaine : la protéine CDC25A et le micro-ARN-16.

I. Les leucémies aiguës myéloïdes

Les leucémies sont des cancers qui affectent le processus de fabrication des cellules du sang (leucocytes, hématies, plaquettes). Aussi, pour comprendre les mécanismes sous-jacents à ces maladies, il est d'abord important de décrire le déroulement de ce processus dans un contexte non pathologique.

A. L'hématopoïèse

a) Généralités sur l'hématopoïèse

Du grec ancien *haíma* (« sang ») et *poíêsis* (« création »), le nom « hématopoïèse » désigne le processus de division et différenciation cellulaire permettant la production des différentes cellules sanguines. Ces cellules ont une durée de vie courte (cf tableau 1) et doivent donc être constamment renouvelées au cours de notre vie. Ce renouvellement est estimé à 1 trillion de cellules par jour en moyenne chez l'homme adulte, et on retrouve à son origine une petite population de cellules appelées Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) (Ogawa, 1993).

	Durée de vie	Production par la moelle osseuse
Hématies	120 jours	200 milliards/j
Plaquettes	7-10 jours	100 milliards/j
Neutrophiles	1-3 jours	50 milliards/j
Monocytes	Plusieurs mois	
Lymphocytes	Plusieurs mois à plusieurs années	

Tableau 1. Durée de vie et renouvellement de certaines cellules hématopoïétiques

Chiffres issus du site <http://hematocell.fr> (Université d'Angers)

b) La cellule souche hématopoïétique

Les CSH sont à l'origine de tout le processus d'hématopoïèse et donc à l'origine de toutes nos cellules sanguines.

D'un point de vue fonctionnel, les CSH sont des cellules multipotentes, capables de s'auto-renouveler et de reconstituer un système hématopoïétique complet dans un sujet immunodéprimé. (Ogawa et al, 1993). Cette propriété les rend particulièrement intéressantes dans le traitement de pathologies causant une insuffisance médullaire, telles que les LAM ou les aplasies médullaires, comme l'anémie de Fanconi par exemple. On réalise alors une allogreffe de CSH prélevées dans la moelle osseuse ou le sang du donneur, qui permettront en migrant jusqu'à la moelle osseuse, de reconstituer le système hématopoïétique du patient. On peut classer ces CSH en deux catégories : les CSH à long terme (LT-CSH) et les CSH à court terme (ST-CSH). Les LT-CSH sont comme leur nom l'indique capables de reconstituer sur une longue durée le système hématopoïétique chez un sujet

immunodéprimé, et ce sont elles qui se différencient en ST-CSH, qui elles ne redonnent un système hématopoïétique complet que pour une dizaine de semaines (Liu et al, 2012). Les CSH sont peu nombreuses, quelques centaines de milliers dans la moelle osseuse, et pour la grande majorité quiescentes, ce qui les protège des agressions génotoxiques.

D'un point de vue phénotypique, la caractérisation des CSH s'effectue grâce à des marqueurs de surface, mais un compartiment unique n'a pas encore été défini. Chez la souris, où ont été effectuées la plupart des études sur la caractérisation des CSH, on distingue les LT-CSH : Lin- CD33+ SCA- KIT+ CD38- CD34- Flk2-, et les ST-CSH : Lin- CD33+ SCA- KIT+ CD38- CD34+ Flk2+ (Osawa et al, 1996, Hess et al, 2006, Liu et al, 2012). Cependant une étude a par exemple également décrit l'existence de CSH dans le compartiment CD38+ (Higuchi et al, 2003).

De même, chez l'humain le compartiment des CSH faisant consensus dans la communauté scientifique est Lin- CD34+ CD38- CD90 (Thy-1) + (Seita et al, 2010) CD45RA- (Majeti et al, 2007), mais il a été montré que des cellules CD34+ CD38+ pouvaient reconstituer le système hématopoïétique de souris immunodéprimées (Taussig et al, 2008). Ainsi si les CSH sont bien définies d'un point de vue fonctionnel, leur caractérisation phénotypique comporte encore certaines zones d'ombre, les tests fonctionnels restent donc la meilleure façon de les caractériser.

c) *La niche hématopoïétique*

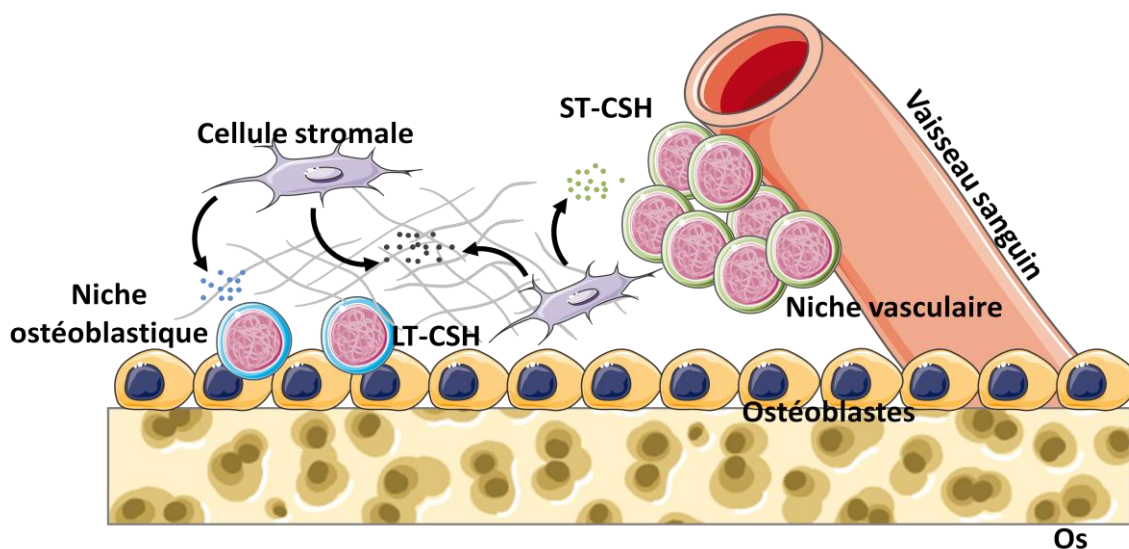


Figure 1. Représentation de la niche hématopoïétique

Les CSH, situées au niveau des vaisseaux sanguins ou de l'endosteum, bénéficient dans la niche hématopoïétique de la présence de cellules stromales et des molécules de la MEC essentielles à leur maintien. Inspiré de Klammer et Voerman, 2014

Au cours du développement, l'hématopoïèse a lieu tout d'abord dans la vésicule vitelline, puis se déplace au niveau du foie, puis de la rate. Au moment de la naissance, et pour le reste de la vie, l'hématopoïèse chez les mammifères a lieu dans la moelle osseuse rouge des os courts et plats (sternum, vertèbres, os iliaques,...) (Orkin et al, 2008). Au sein de la moelle, les CSH sont retrouvées au sein de zones appelées niches hématopoïétiques (Figure 1). Ces niches hématopoïétiques sont composées des cellules hématopoïétiques (dont un très faible pourcentage de CSH), mais également des cellules stromales (fibroblastes et cellules endothéliales) qui, grâce à la production de cytokines telles que le SCF (Stem Cell Factor) et des interleukines, stimulent l'hématopoïèse et permettent le

maintien des CSH (Orkin et al, 2008). Ces cellules sont également responsables de la sécrétion de l'essentiel des protéines de la Matrice Extra Cellulaire (MEC) retrouvées dans la niche hématopoïétique : fibronectine, collagènes et laminines (Klamer et Voerman, 2014, Nilsson et al, 1998). On y retrouve également des vaisseaux sanguins, auprès desquels se logent les ST-CSH, c'est à dire la grande majorité des CSH, (niche vasculaire). Les LT-CSH vont plutôt se nicher à proximité de l'endostéum (niche ostéoblastique) (Crane et al, 2017).

d) Déroulement de l'hématopoïèse

L'étape initiale de l'hématopoïèse est donc la CSH, décrite en détail ci-dessus. Cependant, les CSH sont majoritairement quiescentes, et leur potentiel de prolifération réduit ne leur permet pas d'être seules à l'origine des milliards de cellules hématopoïétiques générées chaque jour. La première étape de l'hématopoïèse est donc la différenciation des CSH en cellules appelées progéniteurs multipotents (Lin- CD34+ CD38- Thy1- CD45RA +). Ces cellules ne sont plus capables d'auto-renouvellement, mais ont conservé la capacité des cellules souches à donner naissance à toutes les cellules hématopoïétiques. Elles se différencient en progéniteurs matures ou engagés, aussi appelés CFU pour Colony Forming Unit car on les identifie soit grâce à des marqueurs de surface en cytométrie de flux, soit par des tests de clonogénie en regardant la morphologie des colonies formées. Ils ont un potentiel de prolifération bien plus élevé que leurs cellules mères et c'est donc eux qui assurent le maintien de l'hématopoïèse basale, les CSH étant d'avantage sollicitées après un stress affectant l'hématopoïèse (hémorragie, etc.) (Sun et al, 2014, Sawai et al, 2016, Crane et al, 2017). On distingue en premier lieu le progéniteur lymphoïde commun, qui va donner naissance à tous les lymphocytes ainsi qu'aux cellules dendritiques, et le progéniteur myéloïde commun (CFU-GEMM, pour Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage et Mégacaryocyte) qui va lui donner naissances à toutes les cellules de la lignée myéloïde (Akashi et al, 2000) via différents progéniteurs intermédiaires, que nous définirons plus loin pour les granulocytes et monocytes.

Les progéniteurs vont finalement donner naissance à des précurseurs des différents lignages (Figure 2). Ces précurseurs possèdent un potentiel de prolifération plus réduit, et présentent déjà des propriétés (morphologiques et fonctionnelles) propres à leur lignage. Une fois arrivées à maturation, les cellules vont quitter la moelle osseuse et rejoindre la circulation et les tissus pour assurer leurs différentes fonctions.

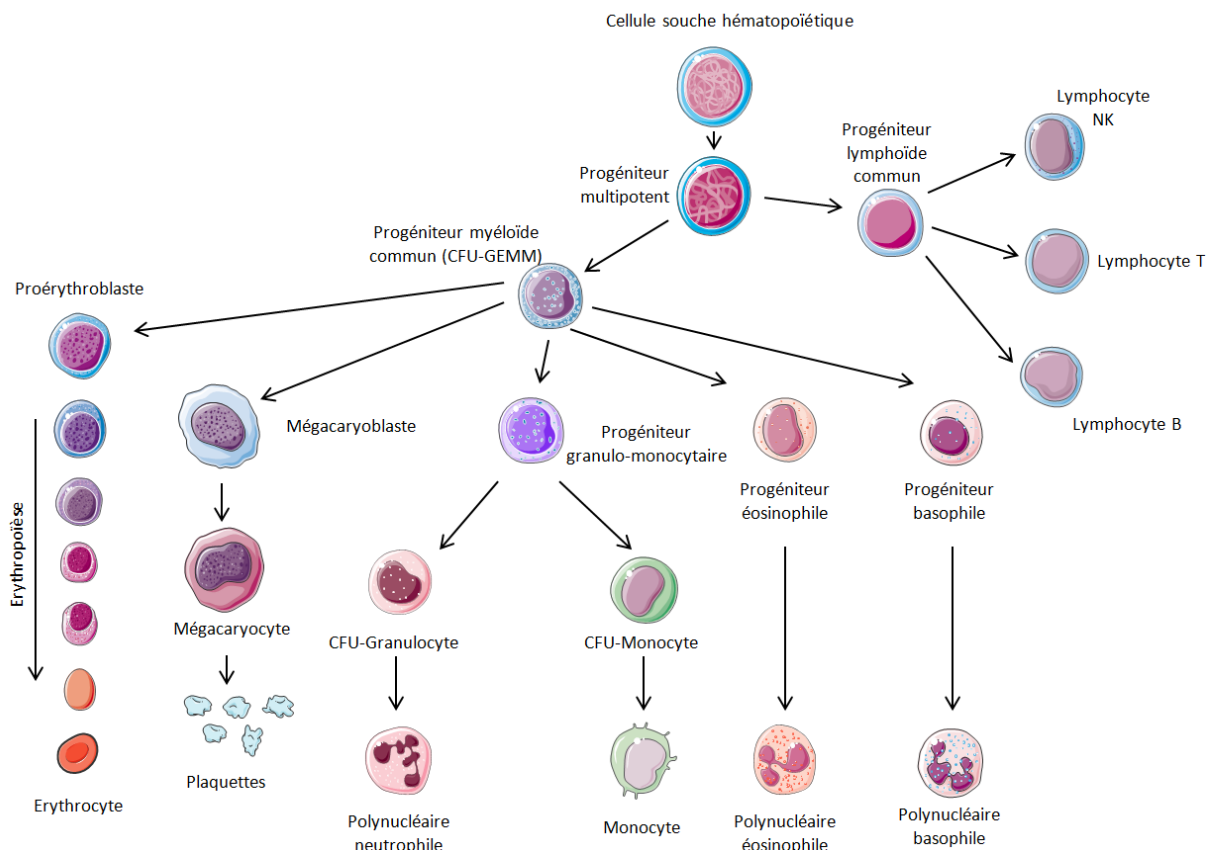


Figure 2. Déroulement de l'hématopoïèse

La CSH permet, après plusieurs étapes de division et différenciation, de donner naissance à l'ensemble des cellules sanguines matures.

e) Facteurs régulant l'hématopoïèse

Les principaux régulateurs du déroulement de l'hématopoïèse peuvent être classés en deux catégories : les cytokines et leurs récepteurs, et les facteurs de transcription (Figure 3).

Les cytokines sont une famille de protéines extracellulaires qui peuvent –par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire- induire une réponse biologique chez leurs cellules cibles. La fixation d'une cytokine à son récepteur va en effet activer des voies de signalisation telles que la voie JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), la voie des MAP kinases ou la voie PI3K. Ces différentes voies vont intervenir dans l'activation de la prolifération mais aussi la survie et la différenciation des cellules hématopoïétiques, ainsi que dans l'activation fonctionnelle des cellules matures (Robb, 2007).

Comme nous l'avons vu précédemment, ces cytokines peuvent être sécrétées par les cellules de la niche hématopoïétique, c'est notamment le cas du SCF. Cependant, les cytokines peuvent également être produites par des organes a priori non impliqués dans le processus d'hématopoïèse, ainsi l'érythropoïétine (EPO) est essentiellement produite par les reins. Certains de ces facteurs ont une expression ubiquitaire, comme le Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3 ligand), c'est l'expression de son récepteur à la surface des cellules hématopoïétiques qui détermine leur sensibilité à ce facteur. Les cytokines hématopoïétiques n'ont pas toutes le même spectre d'action. En effet, certaines vont

intervenir dans une voie de différenciation -c'est le cas de l'EPO qui régule essentiellement les progéniteurs des érythrocytes- tandis que d'autres, comme l'interleukine 3 (IL3) ou la thrombopoïétine (TPO) interviennent à différentes étapes de l'hématopoïèse (Metcalf et al, 2008).

La régulation de l'hématopoïèse implique également un grand nombre de facteurs de transcription qui, à l'instar des cytokines, agissent chacun à différentes étapes de l'hématopoïèse (Sive et Göttgens, 2014). Nous ne pourrions pas plus que pour les cytokines dresser ici une liste exhaustive de tous les facteurs impliqués dans l'hématopoïèse, aussi nous allons seulement présenter certains des facteurs essentiels.

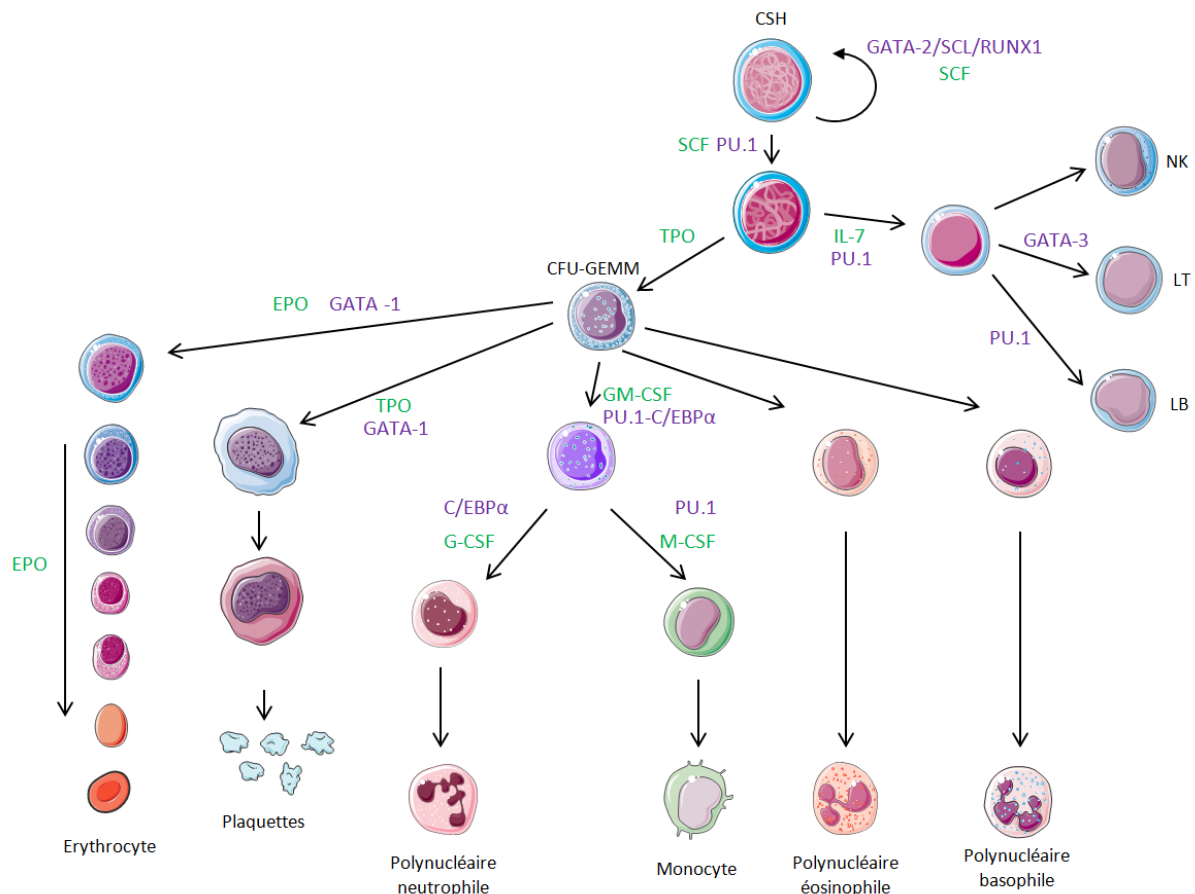


Figure 3 Principaux facteurs régulant l'hématopoïèse

Cytokines en vert, facteurs de transcription en violet. Inspiré de Orkin et al, 2008

Au niveau de la CSH, les facteurs SCL/TAL1 (Stem Cell Leukemia/T-cell Acute lymphoblastic Leukemia 1) et RUNX1 (Runt related transcription factor 1) jouent un rôle essentiel dans la survie, la quiescence et le maintien général de cette population de cellules (Zhu et Emerson, 2002, Porcher et al, 2017). RUNX1 -en association avec son partenaire le Cbfb (Core Binding Factor β)- est également indispensable aux étapes de l'hématopoïèse en aval de la CSH, il est d'ailleurs exprimé par toutes les cellules hématopoïétiques à l'exception des érythrocytes. (De Bruijn et Dzierzak, 2017). Des anomalies impliquant ces gènes sont d'ailleurs retrouvées dans certaines leucémies aiguës myéloïdes, ou LAM, anomalies auxquelles nous nous intéresserons dans la partie traitant de la classification de ces maladies. Un autre groupe de facteurs qu'il est important de mentionner quand on s'intéresse à l'hématopoïèse est la famille des facteurs de transcription GATA, composée de 6

membres caractérisés par leur capacité à se lier aux motifs GATA de l'ADN. Les facteurs GATA 1, 2, et 3 sont principalement exprimés dans les cellules hématopoïétiques. GATA3 intervient essentiellement dans la maturation des lymphocytes T, GATA1 est important pour la différenciation des érythrocytes et des mégacaryocytes, et GATA2 est impliqué à différentes étapes, notamment pour la prolifération et le maintien des CSH et des progéniteurs (Vincente et al, 2012). Enfin, le dernier facteur sur lequel nous allons nous pencher dans cette partie est le facteur de transcription PU.1. L'expression de ce facteur, codé par le gène SPI1, est sous contrôle de RUNX1 dans les cellules hématopoïétiques. Il intervient dans différentes étapes de la lympho- et de la myélopoïèse, et la partie suivante de cette introduction nous permettra de préciser son rôle dans la granulopoïèse, où il agit en parallèle du facteur de transcription C/EBP α (CCAAT/Enhancer Binding Protein alpha) (Friedman, 2002).

B. Gros plan sur la différenciation granulo-monocytaire

Ce travail de thèse nous a amenés à nous intéresser plus particulièrement à la différenciation monocytaire, mais celle-ci est tellement connectée à la différenciation des polynucléaires neutrophiles (PNN) –ou granulocytes- qu'il convient ici de présenter les deux. Ces deux lignées hématopoïétiques ont en effet un progéniteur commun, la CFU-GM, qui va pouvoir se différencier en deux progéniteurs unipotents : la CFU-G pour les granulocytes et la CFU-M pour les monocytes.

La différenciation monocytaire passe par différentes phases (monoblaste, promonocyte et enfin monocyte), et s'accompagne de l'apparition de marqueurs de surface spécifiques : tout d'abord le marqueur CD11b, puis plus tardivement le marqueur CD14 retrouvé uniquement sur les monocytes.

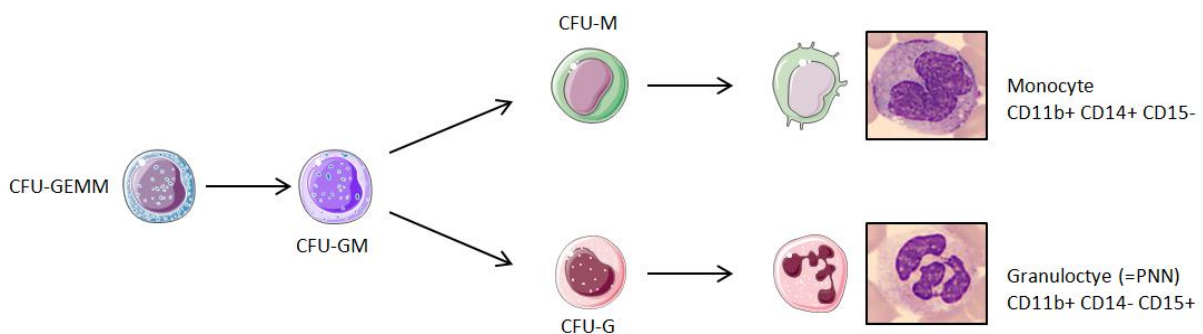


Figure 4. Déroulement de la granulo-monopoïèse

Schéma de la granulo-monopoïèse et Photos de monocyte et granulocyte matures obtenues en microscopie optique et coloration May-Grumwald-Giemsa. Photos issues du site <http://hematocell.fr> (Université d'Angers).

Au fur et à mesure de leur différenciation les précurseurs des monocytes vont également subir des modifications morphologiques pour arriver à l'apparence classique du monocyte avec un noyau lobé serpentiniforme ou en forme dite de « haricot » (Figure 4).

La différenciation granulocytaire s'accompagne également de l'apparition du marqueur de surface CD11b, mais à la fin de leur différenciation les cellules n'exprimeront pas CD14 mais CD15. Les granulocytes matures ont aussi un noyau pluri-lobé, mais celui-ci est bien plus fragmenté que celui des monocytes, avec des lobes reliés seulement par un filament de chromatine (Figure 4).

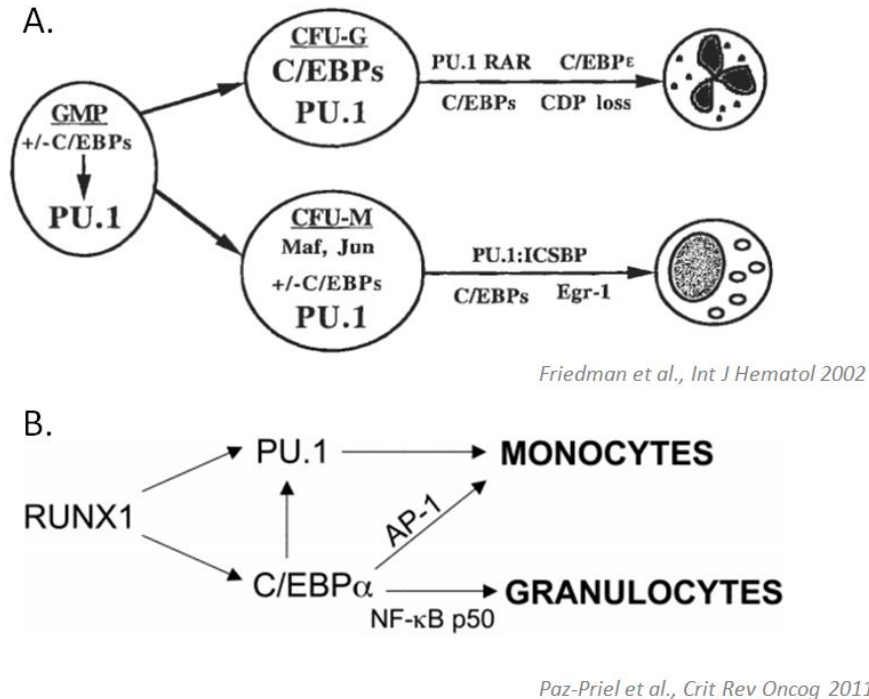


Figure 5. Acteurs de la régulation de la granulo-monopoïèse

A. Résumé des acteurs (cytokines et facteurs de transcription) de la granulo-monopoïèse, traduit de Friedman, 2002 **B.** Schéma du réseau de facteurs de transcription impliqués dans l'orientation des cellules vers la voie monocyte ou granulocyte, traduit de Paz-Priel et Friedman, 2011

La différenciation granulo-monocytaire est finement régulée par des cytokines et un réseau de facteurs de transcription qui vont déterminer dans laquelle des deux voies vont s'engager les cellules immatures. Les deux cytokines essentielles impliquées dans cette voie de l'hématopoïèse sont les Colony Stimulating Factors (CSF) G et M, qui vont orienter les CFU-GM respectivement dans la voie granulocytaire ou monocytaire. Cette décision induite par les cytokines va notamment impliquer deux facteurs de transcription essentiels pour la granulo-monopoïèse : CEBPα et PU.1 (Dahl et al, 2003). Ces deux facteurs, dont l'expression est régulée par le facteur de transcription RUNX1, vont intervenir en association avec d'autres facteurs dès la CFU-GM pour assurer la différenciation des cellules (Figure 5.A). S'ils sont tous deux importants dans chaque voie, ils ont cependant leur spécificité d'action. Ainsi, une forte expression de PU.1 par rapport à CEBPα va favoriser la monopoïèse, alors qu'un niveau plus élevé de CEBPα favoriserait la granulopoïèse (Dahl et al, 2003) ; d'ailleurs, on retrouve dans les LAM monoblastiques (où la différenciation monocytaire est interrompue) des niveaux faibles de PU.1. (D'Alò et al, 2008). En effet, lors de la différenciation monocytaire, CEBPα (en hétérodimère avec le facteur AP1) collabore avec PU.1 pour induire la maturation des cellules, alors qu'il s'homodimérise pour induire la granulopoïèse (Figure 5.B).

C. Hémopathies malignes

Découlant d'un défaut dans l'hématopoïèse, ce terme regroupe plusieurs pathologies impliquant une ou plusieurs anomalies dans la prolifération et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques.

Parmi les hémopathies malignes affectant la lignée myéloïde, on retrouve tout d'abord les syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques, qui se caractérisent respectivement par un excès ou un défaut de prolifération d'une ou plusieurs lignées cellulaires de la branche myéloïde. Ces syndromes peuvent par la suite évoluer en leucémies, qui sont des cancers se développant dans la moelle osseuse et le sang. On distingue les leucémies aiguës et chroniques. Une leucémie chronique est caractérisée par la prolifération anormale de cellules hématopoïétiques, causant l'accumulation de cellules différenciées dans la moelle et le sang ; la leucémie myéloïde chronique (LMC), caractérisée sur le plan cytogénétique par la translocation t(9;22), ou chromosome de Philadelphie, est donc considérée comme un syndrome myéloprolifératif. En revanche, dans le cas d'une leucémie aiguë myéloïde, les cellules affectées vont être bloquées dans leur processus de différenciation.

D. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

a) Généralités

On dénombre environ 3000 nouveaux cas de LAM par an en France (chiffres de la Ligue Nationale Contre le Cancer), dont environ 200 répertoriés en Occitanie Ouest (anciennement région Midi-Pyrénées). Elle est peu représentée chez les enfants, mais il s'agit de la principale leucémie aiguë chez l'adulte, où elle touche principalement les personnes de plus de 60 ans (la médiane d'âge pour le diagnostic est d'environ 70 ans). Malgré les efforts déployés pour l'amélioration du traitement depuis plusieurs années, la survie globale à 5 ans avoisine seulement les 40-50% chez les sujets jeunes traités par chimiothérapie, et nettement moins chez les sujets âgés (DiNardo et Cortes, 2016). Les LAM peuvent être l'évolution d'un syndrome myélodysplasique ou myéloprolifératif, ou encore être causées par un traitement (chimiothérapie ou radiothérapie) (on parle alors de LAM secondaire ou LAM-t), mais la grande majorité des LAM sont dites *de novo* et apparaissent sans que l'on puisse identifier de facteurs de risque connus. Cependant, il a récemment été mis en évidence qu'une petite partie de ces cancers serait liée à des mutations héréditaires (DiNardo et al, 2017).

b) Hématopoïèse leucémique

La LAM est causée par un défaut de l'hématopoïèse où l'apparition de mutations et aberrations chromosomiques dans les CSH ou cellules progénitrices myéloïdes vont donner naissance à des cellules souches leucémiques (CSL) puis à des progéniteurs leucémiques, engagés dans la voie myéloïde mais incapables de se différencier complètement. Ces progéniteurs leucémiques ont en outre un potentiel de prolifération extrêmement élevé, ce qui va mener dans la moelle osseuse et dans le sang à l'accumulation de cellules myéloïdes leucémiques immatures, appelées blastes leucémiques, qui vont progressivement empiéter sur l'hématopoïèse normale.

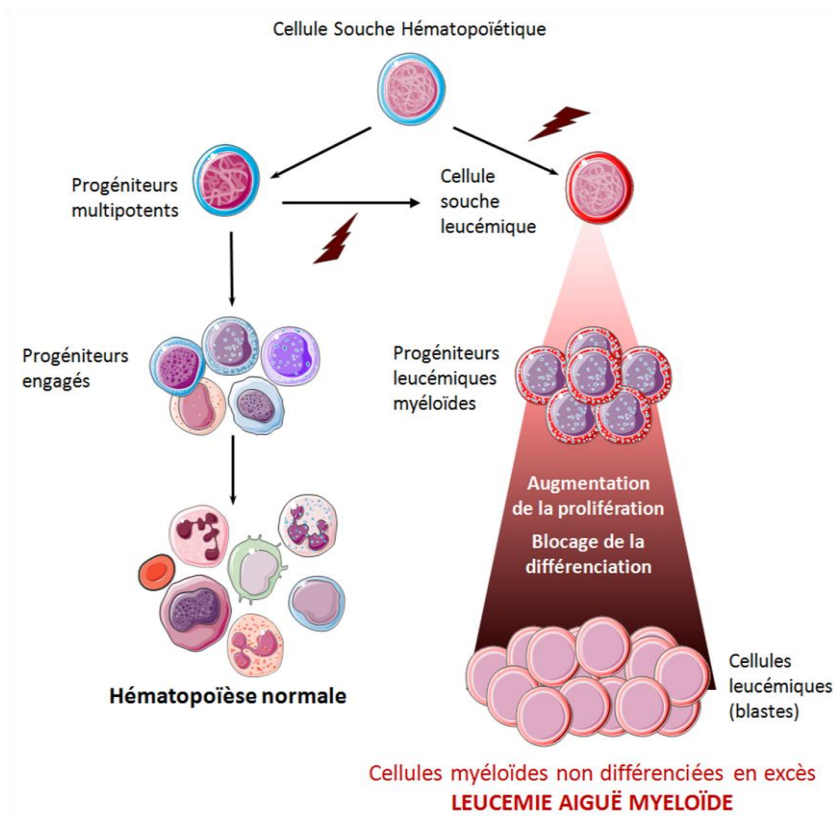


Figure 6. Comparaison de l'hématopoïèse normale et leucémique.

Des événements mutagènes (éclairs sur le schéma) affectant la CSH ou les progéniteurs sont à l'origine d'une hématopoïèse anormale donnant lieu à l'accumulation de cellules leucémiques dans la moelle et le sang. Inspiré de F. Delhommeau.

c) *Symptômes et diagnostic*

Les symptômes permettant de suspecter une LAM sont classés en deux catégories : les symptômes liés à l'envahissement de la moelle osseuse et à l'insuffisance médullaire qui en découle (infections, anémie, saignements, etc.), et ceux liés au syndrome tumoral (l'hypertrophie gingivale, splénomégalie, atteinte cutanée (leucémide), adénopathies, etc.)

Le plus souvent un hémogramme montrant une blastose circulante (présence de blastes dans le sang) plus ou moins associée à une hyperleucocytose, et/ou une leucopénie, une anémie, et/ou une thrombopénie, est ce qui va orienter vers un diagnostic de LAM. Il doit être confirmé par un myélogramme, examen de la moelle osseuse obtenue par ponction au niveau du sternum ou de l'os iliaque, montrant une infiltration de cellules "blastiques" (au moins 20% de blastes parmi les cellules nucléées de la moelle osseuse (Kufe et al, 2003), sauf en cas d'anomalie cytogénétique caractéristique) (Guide ALD n° 30, 2011).

d) *Classification et pronostic*

L'examen du myélogramme permettant de confirmer le diagnostic de la LAM apporte également plus d'informations pour caractériser la LAM : lignée, immunophénotypage et aspect morphologique des blastes, anomalies génétiques et moléculaires. La mise en commun de ces informations obtenues sur de nombreux patients au cours des années ont permis de mettre au point des classifications de sous-types de cette maladie. Ces classifications sont cruciales pour mettre au point des recommandations de prise en charge adaptées à chaque patient (Moarii et Papaemmanuil, 2017).

La classification des LAM selon leur aspect morphologique et cytochimique (test d'activité de la myéloperoxydase (MPO)) ont permis d'établir en 1976 la classification French-American-British détaillée dans le tableau 2 ci-dessous. Les LAM 3 de la classification FAB (LA promyélocytaires) représentent une catégorie particulière avec une anomalie génétique (t(15;17)(q22;q12)) qui leur est propre et un traitement ciblé qui a permis d'augmenter la survie globale à 5 ans à 95% ; elles sont donc systématiquement considérées à part des autres LAM et ne seront pas traitées dans la suite de cette thèse.

L'identification d'anomalies cytogénétiques se fait par analyse complète du caryotype, éventuellement complétée par une technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH). La classification couramment utilisée est celle du Medical Research Council (Grimwade et al, Blood 2010). Depuis 2010, plusieurs études (Papaemmanuil et al, 2016, Patel et al, 2012) s'intéressant au devenir des patients atteints de LAM en termes de survie ont pu mettre en évidence la valeur pronostique des anomalies génétiques recherchées au diagnostic mais également de certaines mutations. Ces résultats ont amené à la recherche systématique de certaines mutations par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou maintenant NGS au diagnostic. En effet, en se basant sur les études précédentes, l'European LeukemiaNet (ELN) a en 2017 révisé les recommandations qu'il avait proposées sept ans plus tôt (ELN 2010), en y incluant notamment la recherche de mutations au diagnostic (Döhner et al, 2017). Les anomalies cytogénétiques récurrentes et certaines anomalies moléculaires des LAM sont désormais intégrées dans la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cette classification est régulièrement révisée et la version la plus à jour date de 2016 (Tableau 3).

Les mutations les plus couramment et anciennement recherchées touchent les gènes *NPM1*, *FLT3* (sont recherchées les duplications interne en tandem (ITD) et leur ratio allélique ainsi que la taille de la région dupliquée, ainsi que les mutations du domaine tyrosine kinase – un chapitre sera consacré à *FLT3* et ces mutations plus loin dans l'introduction de cette thèse), *CEBPA* (codant pour le facteur de transcription C/EBP α) et plus récemment les mutations d'*IDH1* et 2 qui font l'objet de thérapies ciblées, et de plus en plus *TP53*, *RUNX1*, et *ASXL1*. En plus de ces recommandations, l'ELN 2017 inclut une nouvelle classification pronostique, présentée dans le Tableau 4, incluant anomalies cytogénétiques et mutations, utilisée pour la stratification pronostique, avec des implications sur la prise en charge thérapeutique.

Classification FAB	Désignation	Caractéristiques morphologiques
LAM 0	Différenciation minimale	Pas de granulation ni de corps d'Auer, MPO-
LAM 1	Sans maturation	Blastes peu différenciées (moins de 10% de cellules au delà du promyélocyte), parfois des corps d'Auer, MPO+
LAM 2	Avec maturation	Granulations fréquentes, corps d'Auer chez les patients t(8;21)(q22;22), MPO+
LAM 3	Promyélocytaire (t(15;17)(q22;q12))	Beaucoup de granulations, corps d'Auer en fagots, MPO+
LAM 4	Myélomonocytaire	Au moins 20% de cellules de la lignée granulocytaire, et 20% de cellules de la lignée granulocytaire
LAM 4 EO	Myélomonocytaire à éosinophiles (inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22))	5 à 10% de cellules éosinophiles présentant des granulations basophiles
LAM 5 (a et b)	Monoblastique	Souvent hyperleucocytaires, plus de 80% de blastes de type monocytaire avec au moins 20% de promonocytes pour le sous-type b, compartiment granulocytaire inférieur à 20%
LAM 6	Erythroleucémie	Au moins 50% de cellules de la lignée érythrocytaire (présentant souvent des anomalies morphologiques), et 30% de cellules myéloïdes des autres lignées
LAM 7	Mégacaryoblastique	Au moins 20% de la blastes, dont la moitié de la lignée mégacaryocytaire

Tableau 2. Classification morphologique (French-American-British) des LAM

Kufe et al, 2003

LAM avec anomalies génétiques récurrentes	<ul style="list-style-type: none"> - LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1 - RUNX1T1 - LA promyélocytaire avec PML - RARA - LAM avec inv(16) (p13.1q22) ou t(16 ;16) (p13.1q22) ; CBFβ - MYH11 - LAM avec t(9;11) (p22;q23) ; MLLT3 - KMT2A (MLL) - LAM avec t(6;9) (p23;q34) ; DEK - NUP214 - LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; GATA2, MECOM - LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22) (p13;q13) ; RBM15 - MKL1 - LAM avec mutation NPM1 - LAM avec mutation bi-allélique CEBPA - LAM avec BCR-ABL1 -LAM avec mutation RUNX1
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies	
Néoplasies myéloïdes post chimiothérapie	LAM ou syndrome myélodysplasique
LAM sans autre spécification (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 (ancienne érythroleucémie ou FAB M6) - LA mégacaryoblastique - LA myéloblastique à composante basophile - LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)
Sarcome granulocytaire	
Proliférations myéloïdes associées au syndrome de Down	<ul style="list-style-type: none"> - Réaction leucémoïde transitoire - LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle
Leucémies aiguës de lignée ambiguë	<ul style="list-style-type: none"> - Leucémie aiguë indifférenciée -Leucémie aiguë de lignée mixte (LALM) avec t(9;22)(q34.1;q11.2) ; BCR-ABL1 - LALM avec t(v;11q23.3); réarrangement de KMT2A - LALM B/myéloïde, NOS - LALM, T/myéloïde, NOS

Tableau 3. Classification OMS 2016 des LAM et néoplasies myéloïdes associés

D'après Arber et al, 2016

Catégorie de risque	Anomalie (cyto)génétique
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 NPM1 muté sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD low [†] Mutation biallélique de CEBPA
Intermédiaire	NPM1 muté et FLT3-ITD high [†] NPM1 sauvage sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD low [†] (sans lésions génétiques défavorables) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A [‡] Anomalies cytogénétiques non classifiées comme favorables ou adverses
Défavorable	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); réarrangement de KMT2A t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1) -5 ou del(5q); -7; -17/abn(17p) Caryotype complexe [§] , caryotype monosomique NPM1 sauvage et FLT3-ITD high [†] RUNX1 muté [¶] ASXL1 muté [¶] TP53 muté [#]

Tableau 4. Classification pronostique des LAM en fonction de leur profil cytogénétique et mutationnel

D'après l'ELN 2017 (Döhner et al, 2017)

[†] Low = faible ratio allélique (<0.5); high = fort ratio allélique (≥0.5) ;

[‡] La présence de t(9;11)(p21.3;q23.3) prime sur la présence de rares mutations concurrentes à pronostic défavorable ;

[§] Au moins trois anomalies chromosomiques ;

^{||} Au moins une monosomie (sauf perte du X ou du Y) associée à au moins une autre monosomie ou anomalie chromosomique (sauf anomalies CBFβ) ;

[¶] Ne peuvent être utilisés comme marqueurs pronostiques défavorables dans un sous-type de LAM à pronostic favorable

[#] mutation associée de façon significative aux caryotypes complexes et monosomiques

e) *Mutations et leucémogénèse*

En comparaison avec les autres cancers, les LAM présentent généralement peu de mutations, rarement plus d'une dizaine par patient (DiNardo et Cortes, 2016, Ley et al, 2013). Le premier modèle, dit du « double hit », proposé par Gilliland et Griffin en 2002 suggérait que l'apparition de la leucémie nécessitait seulement deux mutations dites « driver », c'est-à-dire à l'origine de la maladie (Gilliland et Griffin, 2002). Ces altérations génétiques étaient classées en deux catégories, résumées dans la figure 7 ci-dessous : les mutations activant la signalisation cellulaire étaient considérées comme responsables de l'excès de prolifération des progéniteurs leucémiques, et les mutations touchant les facteurs de transcription hématopoïétiques comme responsables du blocage de différenciation de ces cellules.

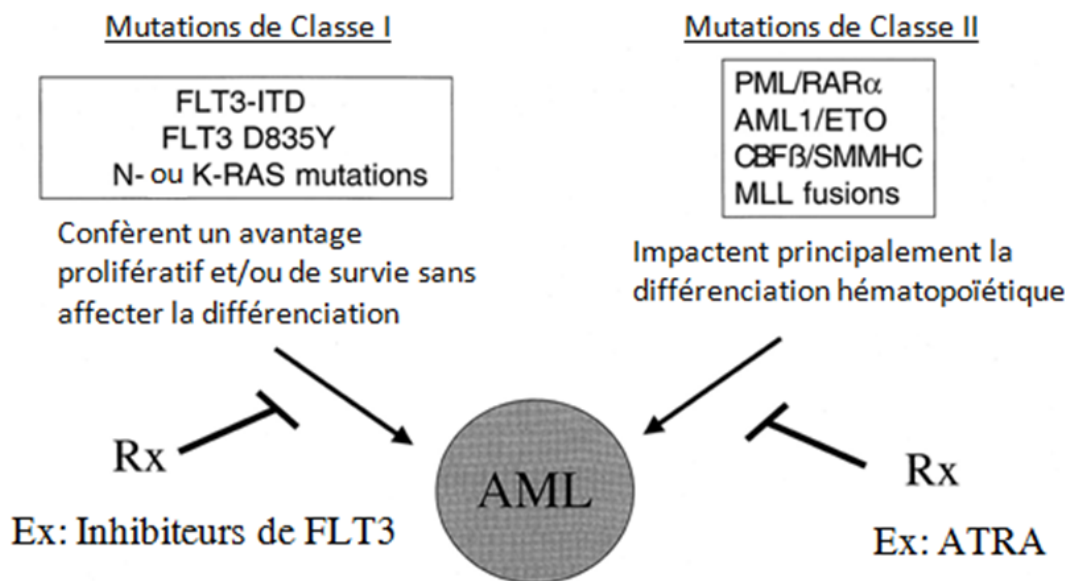


Figure 7. Modèle du « double hit » d'après Gilliland et Griffin

Gilliland et Griffin proposent un modèle de collaboration entre des mutations affectant des acteurs de la prolifération et de la différenciation dans le développement de la LAM. Traduit de Gilliland et Griffin, 2002.

Cependant, ce modèle où chacune des deux mutations aurait un effet bien distinct sur les cellules leucémiques a été mis à mal par des publications montrant le rôle de mutations de type I dans l'arrêt de différenciation (Sexauer et al, 2012, Radomska et al, 2006 et 2012). Finalement, le travail du Cancer Genome Atlas a permis en 2013 de refondre complètement ce modèle en identifiant de nombreuses mutations récurrentes dans leur cohorte de patients (Ley et al, 2013).

Ces mutations ont été reclassées en 9 catégories (décrites dans le Tableau 5), où l'on retrouve les catégories du « double hit ». En effet, les mutations de type I deviennent la classe 5, retrouvée chez presque deux tiers des patients, ce qui en fait la classe de mutations la plus représentée chez les patients, mais montre bien qu'elles ne sont pas comme on le pensait indispensables à la leucémogénèse. Les altérations affectant les facteurs de transcription sont quant à elles retrouvées dans deux catégories : la classe 1 des transcrits de fusion impliquant des facteurs de transcription, et la classe 7 regroupant les mutations affectant les facteurs de transcription myéloïdes (de façon intéressante, les mutations germinales pouvant prédisposer à l'apparition d'une LAM font partie de

ce groupe de mutations (DiNardo et Cortes, 2016)). La deuxième catégorie de mutations ne concerne qu'un seul gène : la nucléophosmine *NPM1*. Ces mutations sont les plus fréquentes dans les LAM (retrouvées dans 1/3 de tous les cas de LAM, et la moitié des cas présentant un caryotype normal) et sont associées à un pronostic plutôt favorable après chimiothérapie en l'absence de la mutation FLT3-ITD (Tableau 4).

Classe de mutation	Exemples	Fréquence
1 – Transcrits de fusion impliquant des facteurs de transcription	Fusions de MLL, t(8;21)(q22;q22.1), t(16;16)(p13.1;q22)	18 %
2 – NPM1		27 %
3 – Suppresseurs de tumeur	TP53	16 %
4 – Gènes régulant la méthylation de l'ADN	Tet2, DNMT3A, IDH 1 et 2	44 %
5 – Activation de signalisation cellulaire	FLT3, KIT, RAS	59 %
6 – Gènes de régulation de la chromatine	ASXL1, fusions de MLL	30 %
7 – Facteurs de transcription myéloïdes	CEBPA, RUNX1, GATA2	22 %
8 – Gènes du complexe de la cohésine	RAD21, SMC1 et 2	13 %
9 – Gènes du spliceosome	SRSF2, U2AF35, ZRSR2	14 %

Tableau 5. Classement des mutations récurrentes dans les LAM d'après le Cancer Genome Atlas (Ley et al, 2013)
Adapté de Meyer et Levine, 2014

La troisième catégorie regroupe les mutations affectant des gènes suppresseurs de tumeur, dont le gène *TP53* dont les mutations sont essentiellement retrouvées dans des LAM secondaires ou issues de syndromes myélodysplasiques, et sont associées aux caryotypes complexes et monosomiques et à un pronostic défavorable (Tableau 4). Les trois dernières catégories regroupent les mutations touchant respectivement les gènes régulateurs de la chromatine (on y retrouve donc aussi les fusions de *MLL*, ainsi que le gène *ASXL1*), les gènes du complexe de la cohésine, et les gènes du spliceosome.

La quatrième catégorie regroupe les mutations touchant des gènes régulateurs de la méthylation de l'ADN (*DNMT3A*, *Tet2* et *IDH 1 et 2*). Ces mutations sont présentes chez près de la moitié des patients. Cette catégorie de mutations s'est avérée particulièrement intéressante dans la compréhension de l'apparition des LAM. En effet, elles ont été retrouvées au sein d'une hématopoïèse clonale dans des cellules hématopoïétiques progénitrices ou matures dans le sang de patients non atteints de LAM, désormais appelée « hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé » (CHIP), dont l'incidence augmente avec l'âge. L'apparition d'autres mutations drivers telles que FLT3-ITD ou NPM1 sont d'autres événements permettant la transformation des cellules vers une leucémie (Figure 8) (Chan et Majeti, 2013, Shlush et al, 2014). Il semble donc important pour pouvoir éradiquer la maladie et prévenir les rechutes de pouvoir également cibler ce clone pré-leucémique.

L'identification des mutations récurrentes dans les LAM a logiquement permis une meilleure compréhension de la biologie de ces maladies, en particulier en terme de leur évolution clonale, et aussi l'identification de cibles thérapeutiques potentielles. Ceci s'est traduit ces dernières années par l'émergence de nouvelles possibilités de traitements ciblés pour certains sous-groupes de patients atteints de LAM, faisant profondément évoluer la stratégie classique de traitement.

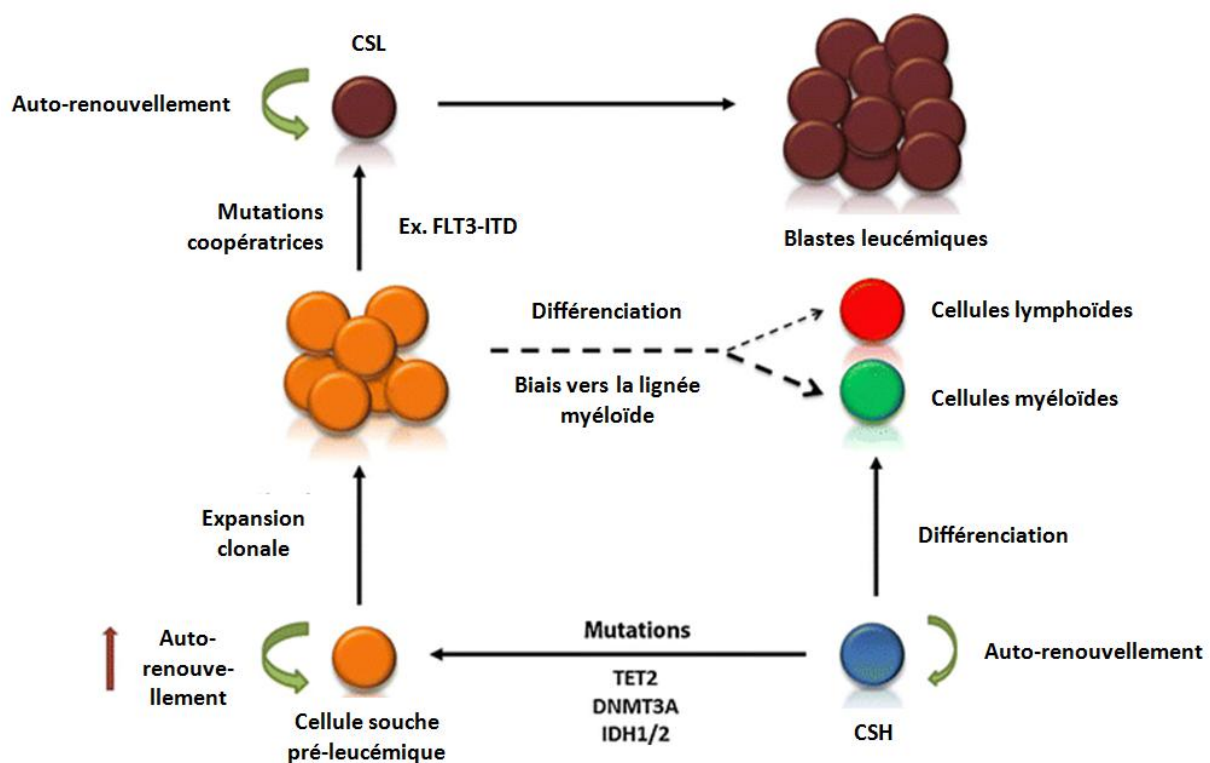


Figure 8. Evolution clonale des cellules leucémiques

Les mutations affectant des gènes régulant la méthylation de l'ADN sont à l'origine d'une hématopoïèse clonale qui peut évoluer en LAM après apparition d'autres mutations. Traduit de Chan et Majeti, 2013

f) *Thérapie historique : le 3+7*

Le traitement classique pour les LAM repose sur la chimiothérapie intensive et se divise en deux phases. La première phase, dite d'induction, a pour objectif l'obtention d'une rémission complète (moins de 5% de blastes médullaires, et reconstitution de l'hématopoïèse périphérique), et consiste en une combinaison d'une anthracycline (daunorubicine, idarubicine, ou mitoxantrone : des inhibiteurs de la topoisomérase II) pendant 3 à 5 jours avec de la cytarabine (un analogue de nucléoside agissant de façon cytotoxique pendant la phase S du cycle cellulaire) en perfusion continue pendant 7 jours, ce qui lui a donné son appellation : le « 3+7 ». Après l'induction vient une phase de consolidation destinée à prévenir les rechutes. Les patients appartenant au groupe favorable de la classification de l'ELN 2017 et en rémission complète vont pouvoir poursuivre la chimiothérapie exclusive avec des cures répétées de cytarabine à hautes doses. Les patients appartenant aux autres sous-groupes seront orientés vers une greffe allogénique de CSH à chaque fois qu'elle sera possible.

Le 3+7 est utilisé depuis les années 1970, et a essentiellement fait l'objet d'optimisation de doses jusqu'en 2017 où ont été enregistrées de nouvelles molécules : d'une part la midostaurine (inhibiteur de FLT3), qui est désormais systématiquement ajoutée à la chimiothérapie intensive chez les patients porteurs de la mutation FLT3-ITD et FLT3-TKD ; et d'autre part la mise sur le marché aux Etats-Unis puis en Europe d'un médicament (Vyxeos®) encapsulant la cytarabine et la daunorubicine dans un liposome, qui permet de délivrer en même temps les deux médicaments, et ce de façon plus ciblée sur la moelle osseuse.

La chimiothérapie et l'allogreffe étant des traitements lourds, certains patients, dont les personnes âgées ou comorbides, ne sont pas éligibles pour les recevoir. L'alternative disponible pour ces patients depuis plusieurs années (Autorisation de mise sur le marché en 2004 aux Etats-Unis et en 2007 en France), est l'azacitidine (Vidaza®), un agent hypométhylant moins cytotoxique et mieux toléré que le traitement conventionnel, qui ne permet pas d'obtenir autant de rémissions complètes que la chimiothérapie, mais qui a néanmoins amélioré la survie globale (et la qualité de vie) par rapport aux soins de supports.

g) Nouvelles stratégies thérapeutiques

Cible	Traitement	Développement en France	Date d'AMM aux Etats-Unis
FLT3	Midostaurine	AMM 2017	2017
	Quizartinib	ATU nominative 2018	
	Crenolanib	Phase 3	2018
	Gilteritinib	Phase 3	
	Sorafenib (en maintenance post-allogreffe ; traitement non approuvé dans la LAM) FF-10101	Phase 1	
IDH2	AG-221 Enasidenib	ATU 2018	2017
IDH1	AG-120 Ivosidenib	Phase 3	2018
BCL-2	Venetoclax	Phase 3	2018
MCL-1	S63845	Phase 1	
CDK4/6	Palbociclib	Phase 3	
MDM2	Idasanutlin	Phase 3	
CD33	Gemtuzumab Ozogamycine	AMM 2018	2000 puis 2017
	SGN-CD33A Vadastuximab talirine	<i>Phase 3 (arrêté)</i>	
	BiTE CD33xCD3 AMG330	Phase 1	
	CAR-T cells	Etude pré-clinique	
Voie Hedgehog	Glasdegib	Phase 3	2018
CD123	SL-401	Phase 2	
	DART CD123xCD3 Flotetuzumab	Phase 1	

Tableau 6. Tour d'horizon des thérapies ciblées en cours de développement dans les LAM

Adapté de Bertoli et Récher, 2018.

AMM = Autorisation de Mise sur le Marché, ATU= Autorisation Temporaire d'Utilisation.

Avec l'identification des mutations récurrentes dans les LAM et les efforts déployés pour mieux comprendre la biologie de chaque sous-type, des cibles thérapeutiques potentielles ont émergé, et ces deux dernières années ont été particulièrement riches tant au niveau des essais cliniques que de l'enregistrement de nouvelles molécules pour le traitement des LAM. Les molécules enregistrées ou en développement prometteur sont répertoriées dans le tableau 6. Les inhibiteurs de FLT3 ont la part belle dans les molécules actuellement testées dans les LAM, avec l'enregistrement en 2017 du premier inhibiteur de FLT3, la midostaurine (un inhibiteur multikinase à large spectre), en association avec la chimiothérapie, et seront présentés plus en détail dans le chapitre de cette introduction portant sur FLT3-ITD. Les essais cliniques sur les inhibiteurs d'IDH 1 ou 2 ont eu des résultats très prometteurs sur les LAM en rechutes ou réfractaires (Eytan et al, 2017) qui ont mené à un enregistrement accéléré de l'enasidenib (anti-IDH2 muté) aux Etats-Unis avant même un essai de phase 3, ainsi qu'à l'enregistrement de l'ivosidenib (anti-IDH1-muté). On notera également l'approbation accélérée par la FDA (Food and Drug Administration) du venetoclax, un inhibiteur de la protéine anti-apoptotique Bcl2 déjà approuvé dans le traitement des LLC, qui a obtenu des résultats spectaculaires en traitement de première ligne en combinaison avec l'azacitidine ou la cytarabine à faible dose chez les patients âgés (>75 ans) ou non éligibles à une chimiothérapie classique (Lin et al, 2016, DiNardo et al, 2018).

On assiste donc à une petite révolution dans le monde du traitement de la LAM, avec plus d'enregistrements de molécules ces deux dernières années que sur les quatre décennies précédentes. Par ailleurs de nombreuses molécules aux cibles variées (cycle cellulaire, immunothérapie, signalisation,...) actuellement en essais cliniques pourraient dans les prochaines années encore diversifier le panel de traitements disponibles pour les patients selon les caractéristiques de leur maladie. L'idée de la « thérapie à la carte » se concrétise donc de plus en plus pour les LAM grâce aux avancées qui ont culminé ces deux dernières années, et il est plus important que jamais de continuer d'étudier avec précision la biologie de cette maladie pour pouvoir améliorer le traitement des sous-groupes ne bénéficiant pas à l'heure actuelle de thérapie ciblée ou en cas d'échec ou de rechute après ces traitements.

II. Le récepteur FLT3 et sa mutation ITD

Ce travail de thèse se concentre sur la biologie des LAM portant la mutation FLT3-ITD, nous allons donc ici dans un premier temps présenter le récepteur FLT3 et ses fonctions dans l'hématopoïèse, puis détailler les conséquences de la mutation ITD au niveau de la signalisation induite par le récepteur, ainsi que son importance clinique dans les LAM.

A. Récepteur sauvage

FLT3 (Fms-Like Tyrosine kinase 3), également appelé CD135 ou flk2 (Foetal Liver Kinase 2) est un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) de classe III. La famille des RTK de classe III comprend six membres :

- Le récepteur FLT3
- C-Kit, le récepteur du SCF
- CSFR1 (ou Fms), le récepteur du Colony Stimulating Factor 1
- Le PGDFR (récepteur du Platelet Derived Growth Factor) alpha et beta
- Les récepteurs du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor 1 and 2)

Ce sont tous des récepteurs transmembranaires qui, comme tous les RTK, ont pour fonction d'activer des cascades de signalisation cellulaire après interaction avec leur ligand. Ils sont caractérisés par la présence de cinq à sept domaines de type immunoglobuline dans leur domaine extracellulaire (Terman et al, 1992).

a) Structure du récepteur

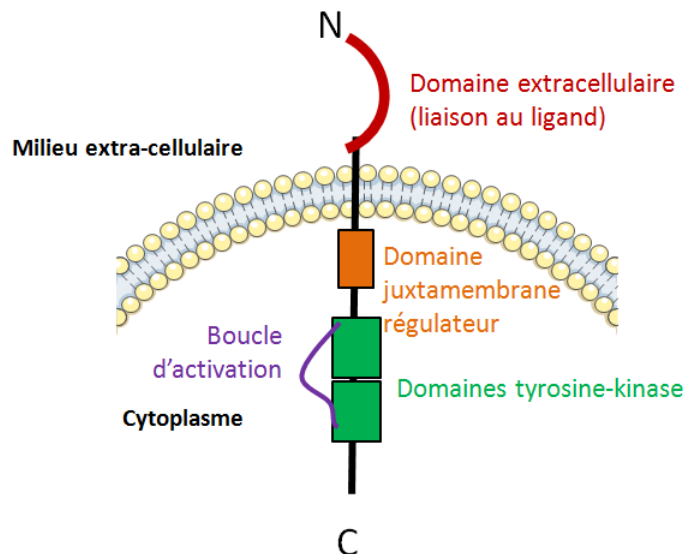


Figure 9. Structure générale du récepteur FLT3

FLT3 est un RTK de classe III constitué d'un domaine extra cellulaire pour reconnaître le ligand, et de trois domaines cytoplasmique : un domaine régulateur et deux domaines à activité tyrosine kinase.

Le récepteur FLT3 est une protéine codée par le gène *FLT3* (chromosome 13q12), de 933 acides aminés. La protéine transmembranaire glycosylée a un poids moléculaire apparent de 160 kDa, nous verrons dans la suite de cette introduction qu'il existe une forme non glycosylée du récepteur,

localisée à l'intérieur de la cellule, ayant un poids moléculaire de 130 kDa. FLT3 est constitué, comme tous les autres RTK de classe III, de N-ter en C-ter de :

- Un domaine extracellulaire d'interaction avec son ligand
- Un domaine transmembranaire « single-pass »
- Un domaine juxtamembranaire (JM) régulateur de son activité tyrosine kinase
- Deux domaines à activité tyrosine kinase (TK), le domaine N et le domaine C, et leur boucle d'activation (Figure 9).

En l'absence de ligand, le récepteur est sous forme monomérique en conformation dite d'auto-inactivation : la conformation du domaine JM bloque l'accès au site catalytique des domaines TK. Après fixation du ligand, les récepteurs vont former des homodimères, et ce changement de conformation va permettre leur autophosphorylation sur le domaine JM, ce qui va amener à sa libération du site catalytique. L'activation complète du récepteur nécessite ensuite un changement de conformation de la boucle d'activation, qui va passer en conformation DFG « in », où les chaînes latérales de son motif DFG n'encombrent plus la poche à ATP (Fig. 10) ; l'auto-phosphorylation de la boucle d'activation va ancrer cette conformation, le récepteur passe alors en conformation dite active (Klug et al, 2018).

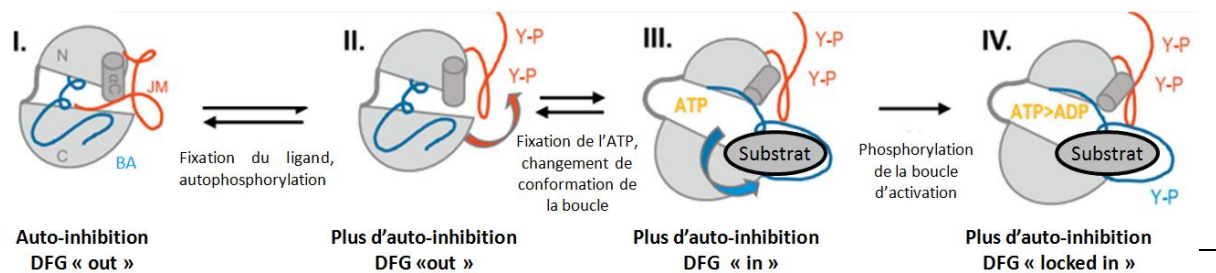


Figure 10. Mécanisme d'activation de FLT3 après fixation du ligand

L'activation de FLT3 après fixation du ligand nécessite l'autophosphorylation du domaine régulateur et son changement de conformation. Traduit de Klug et al, 2018

b) Expression et fonctions de FLT3

A sa découverte, en 1991, FLT3 a été identifié comme un marqueur des compartiments les plus immatures (CSH, progéniteurs multipotents) de l'hématopoïèse (Matthews et al, 1991). Un travail à ensuite montré que FLT3 n'était en fait pas retrouvé dans les CSH, mais dans les progéniteurs multipotents n'ayant plus de capacité d'auto-renouvellement (Adolfsson et al, 2001). L'expression de FLT3 est ensuite maintenue chez les progéniteurs engagés myéloïdes et lymphoïdes (Zriwil et al, 2018), puis dans certaines voies de différenciation : on retrouve FLT3 dans la CFU-GM (Böiers et al, 2010) et tout le long de la différenciation monocyttaire (Kim et al, 2015, Stirewalt et Radich, 2003), ainsi que dans les précurseurs des cellules dendritiques (Karsunky et al, 2003) (Fig. 11).

Cependant, l'expression de FLT3 n'est *a priori* pas restreinte aux cellules hématopoïétiques : son ARNm ainsi que la protéine ont été détectés dans des cellules du placenta et du système nerveux (deLapeyrière et al, 1995) sans toutefois qu'une fonction de FLT3 dans ces organes n'ait été caractérisée.

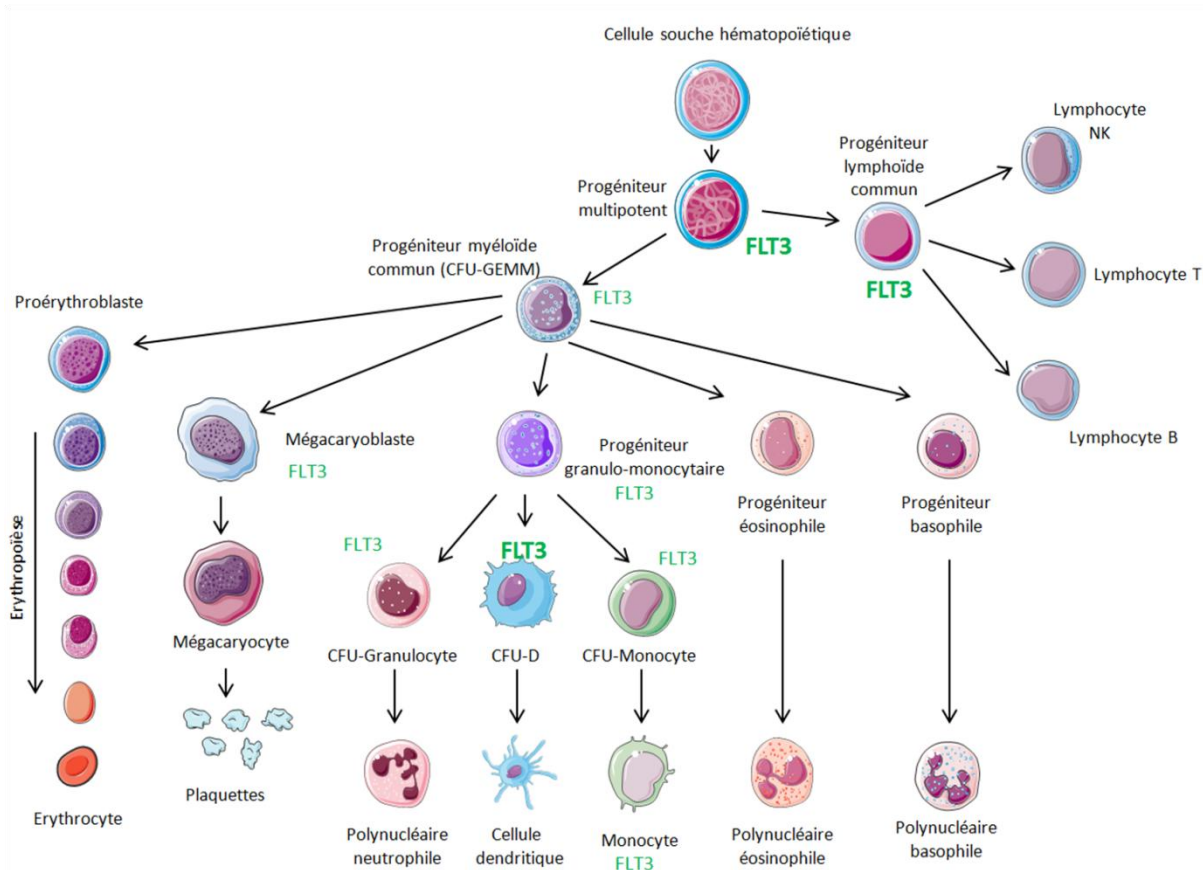


Figure 11. Expression de FLT3 dans l'hématopoïèse normale

Adapté de Stirewalt et Radich, 2003

FLT3 : forte expression **FLT3** : expression plus faible. CFU-D : précurseur des cellules dendritiques

L'inactivation génétique de *FLT3* (KO) chez la souris n'a pas d'effet sur la population de cellules hématopoïétiques matures, et donne des individus sains (Mackarehtschian et al, 1995). Cependant, ces souris ont un compartiment des progéniteurs lymphoïdes réduit. De plus, la greffe de CSH de souris *FLT3* KO ne permet pas de reconstituer une hématopoïèse complète chez les souris receveuses, avec des déficiences aussi bien dans la branche myéloïde que lymphoïde, indiquant l'importance de *FLT3* pour le maintien des cellules hématopoïétiques multipotentes.

La fonction principale de *FLT3* semble être la régulation de mécanismes de prolifération et de survie dans les cellules hématopoïétiques. En effet, la stimulation de *FLT3* induit une expansion des CSH *in vitro* (Zeigler et al, 1994), et de nombreux progéniteurs hématopoïétiques sont stimulés par un traitement avec le ligand de *FLT3* (FL) : les progéniteurs lymphoïdes, les cellules dendritiques et les cellules Natural Killer, ainsi que les CFU-GM (Lyman et Jacobsen, 1998, Nicholls et al, 1999). De plus, l'injection de FL provoque une augmentation du nombre de lymphocytes et des cellules myéloïdes dans le sang, ainsi qu'une expansion des progéniteurs myéloïdes CFU-GEMM et CFU-GM (Brasel et al, 1996). La signalisation *FLT3* semble également jouer un rôle dans la différenciation des monocytes/macrophages (Nicholls et al, 1999) et des lymphocytes B (Ray et al, 1996).

Les souris KO pour *FLT3* et pour *KIT* (gène codant pour le récepteur au SCF c-Kit, un RTK de classe III également impliqué dans l'hématopoïèse) présentent une population de cellules hématopoïétique très réduite par rapport aux souris sauvages ou simple KO, avec une lignée lymphoïde particulièrement affectée (Mackarehtschian et al, 1995). Ce travail suggère donc une collaboration

de la signalisation de FLT3 et de KIT pour assurer le bon déroulement de l'hématopoïèse. Cette hypothèse a par la suite été corroborée par plusieurs travaux qui ont montré une synergie du ligand de FLT3 (FL) avec d'autres facteurs pour induire la prolifération des cellules hématopoïétiques. En effet, il a été montré *in vitro* que l'association du FL avec le SCF ou des interleukines (IL6, IL3, IL11 et 7) et le GM-CSF permet d'induire l'expansion de cellules progénitrices (Zeigler et al, 1994, Ray et al, 1996, Shurin et al, 1998, Ebihara et al, 1998).

a) *Signalisation en aval de FLT3*

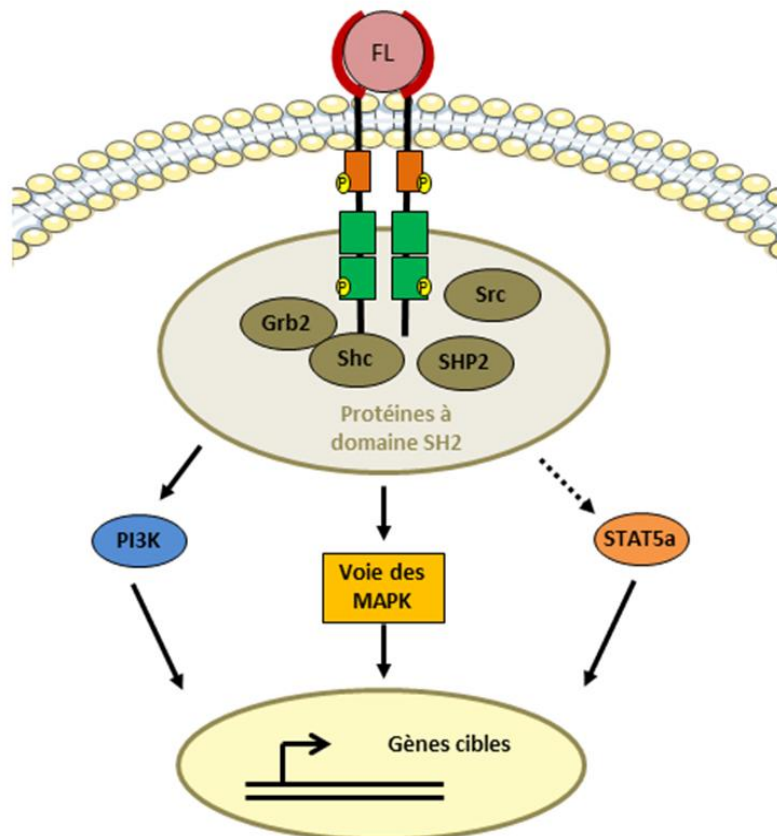


Figure 12. Principales voies activées en aval du complexe FL/FLT3

L'interaction de protéines à domaine SH2 avec le récepteur activé permet la transduction d'un signal pro-survie et prolifération. Adapté de Swords et al, 2012 et Staudt et al, 2018

Comme nous l'avons décrit précédemment, la fixation du FL à FLT3 conduit à la dimérisation du récepteur, et à son activation *via* la transphosphorylation de ses domaines JM et TK. Ceci permet le recrutement au niveau du domaine TK de protéines adaptatrices à domaine SH2 (Src Homology 2) telles que les kinases de la famille Src (« Sarc », de « sarcome »), Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), Shc (SH2-containing collagen-related protein), et SHP2 (Src Homology Phosphatase 2) (Dosil et al, 1993, Heiss et al, 2006) qui vont permettre la transduction du signal pour permettre la prolifération et la survie des cellules hématopoïétiques (Figure 12) .

Il a été montré dans la souris que la sous-unité p85 de la PI3K (Phosphatidylinositol Kinase 3) pouvait également se lier au récepteur phosphorylé (Dosil et al, 1993), cependant il semblerait que son mécanisme de régulation chez l'humain soit plus indirect, *via* les protéines Gab et Grb2 (Zhang et al, 1999 et Octobre 2000). Les protéines Gab peuvent également moduler la signalisation de la voie des MAP Kinases (Zhang et al, Octobre 2000), et un travail sur la mégacaryopoïèse a montré l'activation

de la p38-MAPK en aval de FLT3 (Desterke et al, 2011). Une activation du facteur de transcription STAT5a (mais pas STAT5b) après activation de FLT3 a également été décrite, mais si STAT5 est d'ordinaire activé par la kinase JAK en réponse aux cytokines, cela ne semble pas être le cas ici et le mécanisme d'activation de STAT5a dans ce modèle reste à élucider (Zhang et al, Septembre 2000).

b) Le FLT3 ligand

Le FLT3 ligand (ou FL), cloné en 1995 chez l'homme (Lyman et al, 1994), est une protéine transmembranaire de type I de 235 acides aminés. Le domaine N-terminal extracellulaire de cette protéine peut-être clivé par la TNF α converting enzyme (TACE) pour libérer une forme soluble du FL (Lyman et al, 1994, Horiuchi et al, 2010). La forme soluble et la forme transmembranaire du FL peuvent toutes les deux stimuler les cellules exprimant FLT3 (Lyman et al, 1994, Hannum et al, 1994). Différents variants d'épissage de l'ARNm de FL ont été retrouvés exprimés dans de nombreux tissus (Hannum et al, 1994), et il est plus particulièrement retrouvé exprimé dans les cellules stromales de la moelle osseuse (Lisovsky et al, 1996). La grande variété des tissus qui expriment le FL indique que la spécificité de son action va dépendre des cellules exprimant son récepteur, FLT3. La présence de FLT3 sur des cellules hématopoïétiques exprimant aussi le FL témoigne d'un mode d'action autocrine et paracrine du FL.

Les souris KO pour le FL ont un phénotype plus sévère que celui des souris KO pour FLT3 : on observe une forte diminution de certaines populations de cellules hématopoïétiques, notamment les lymphocytes et les cellules dendritiques. Cette différence pourrait s'expliquer par les lignées de souris utilisées, ou bien par l'existence d'un autre récepteur au FL encore non identifié (Taspogas et al, 2017). A l'inverse, des souris surexprimant le FL présentent une augmentation du compartiment myéloïde, ainsi que des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules dendritiques, associée à une splénomégalie, une hyperleucocytose, et une anémie due à la réduction du compartiment érythrocytaire (Taspogas et al, 2014). Cette capacité du FL à stimuler l'hématopoïèse a récemment été exploitée dans un travail sur la vaccination anti-tumorale : l'utilisation de FL en adjuvant à un vaccin intra-ganglionnaire administrant un ARNm codant pour un antigène tumoral a permis une meilleure mobilisation et expansion des lymphocytes T cytotoxiques, et donc à une meilleure réponse immunitaire anti-tumorale *in vivo* (Kreiter et al, 2016).

c) FLT3 et son ligand dans l'hématopoïèse leucémique

L'expression du récepteur FLT3 est souvent dérégulée dans les hémopathies malignes. Plus précisément, on observe très fréquemment une surexpression de l'ARNm et de la protéine FLT3 dans les blastes de LAM et de leucémie aiguë lymphoblastique de type B (LAL-B) (Carow et al, 1996, Birg et al, 1992), et parfois dans les leucémies chroniques et les LAL-T (Rosnet et al, 1996). L'expression de FLT3 dans les cellules de LAM coïncide avec l'expression du FL, et cette double expression permet l'activation constitutive de FLT3 dans les cellules leucémiques de façon autocrine (Zheng et al, 2004). La stimulation de cellules leucémiques (échantillons primaires ou lignées cellulaires) par le FL ou une combinaison FL+SCF stimule leur prolifération et permet leur survie dans un milieu sans sérum (Drexler et al, 1999). Par ailleurs, la trisomie du chromosome 19 (chromosome où se trouve le gène FLT3LG codant pour le FL) est souvent retrouvée dans certaines hémopathies malignes de la lignée myéloïde (Nimmer et al, 2002).

Au-delà des modifications de son expression, le récepteur FLT3 peut être muté dans les hémopathies malignes, et plus particulièrement dans les LAM, où près d'un patient sur trois présente une

mutation activatrice de FLT3 (Tasogas et al, 2017). Ces mutations sont souvent retrouvées dans la région codant pour le domaine juxtamembranaire (il s'agit des mutations ITD que nous allons détailler ci-dessous), mais il existe également des mutations ponctuelles (substitutions) affectant les domaines tyrosine kinase, appelées mutations TKD.

B. Le récepteur muté FLT3-ITD

a) Description de la mutation ITD

ITD signifie «Internal Tandem Duplication» : il s'agit d'une duplication de 3 à 400 paires de base dans une partie de la séquence du gène FLT3 codant pour le domaine JM (exon 14 ou 15), ne modifiant pas le cadre de lecture. Cette modification du domaine JM lève sa fonction d'inhibition de l'activation du récepteur en l'absence de ligand : le récepteur muté peut se dimériser et autophosphoryler ses domaines TK de façon constitutive (Kiyoi et al, 1998) pour ensuite activer la signalisation cellulaire en aval (Figure 13). Dans le cas d'une mutation hétérozygote, le récepteur FLT3-ITD peut aussi bien s'homodimériser ou former des hétérodimères avec la forme sauvage du récepteur. En effet, la modification structurale du domaine JM sur FLT3-ITD permet de lever l'auto-inhibition du récepteur sauvage en l'absence de FL (Kiyoi et al, 2002).

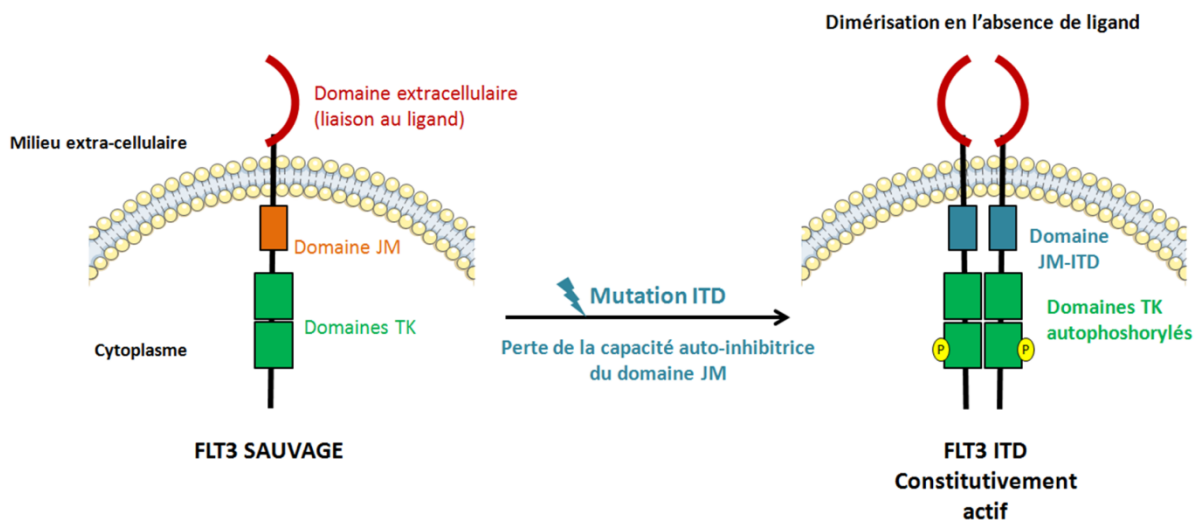


Figure 13. Activation constitutive du récepteur FLT3 par la mutation ITD

La mutation ITD affecte la conformation du domaine juxtamembranaire régulateur (JM), ce qui ne lui permet plus d'inhiber l'autophosphorylation et l'activation de FLT3 en l'absence de ligand.

b) Signalisation en aval du récepteur muté

L'introduction d'une mutation FLT3-ITD dans un modèle murin, d'abord par greffe de cellules Baf3 porteuses de la mutation, puis par knock-in d'un allèle muté directement dans les souris (FLT3^{WT/ITD}), conduit à l'établissement d'un syndrome myéloprolifératif caractérisé entre autres par une splénomégalie et une hyperleucocytose (Kelly et al, 2002, Li et al, 2008). La perte de l'allèle sauvage chez les souris knock-in (FLT3^{ITD/ITD}) rend la maladie encore plus agressive, mais ne permet toujours pas d'obtenir un phénotype de LAM, car si les cellules mutées prolifèrent de façon exacerbée, elles se différencient toujours en cellules hématopoïétiques matures. Ces observations ont permis de classer FLT3-ITD comme une mutation driver de type I dans le modèle du double hit (Li et al, 2011).

L'activation constitutive du récepteur permet donc la transduction d'un signal favorisant la prolifération et la survie des cellules leucémiques ; on retrouve d'ailleurs activées en aval de FLT3-ITD les voies PI3K et MAPK, impliquées dans la prolifération des cellules hématopoïétiques en réponse au FL dans un contexte FLT3 sauvage (Staudt et al, 2018).

L'inhibition de la voie des MAPK grâce à un dominant négatif de la protéine Ras ou un inhibiteur de MEK inhibe significativement la prolifération des cellules FLT3-ITD (Mizuki et al, 2000, Takahashi, 2006), illustrant le rôle de cette voie dans la prolifération induite par l'oncogène FLT3-ITD. Par ailleurs, le rôle des MAPK dans la résistance à l'apoptose des cellules FLT3-ITD a été montré en 2005 par Yang et al : la kinase RSK1 est activée en aval de ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), et va permettre la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique BAD (Bcl-2 Associated Death promoter), l'empêchant d'initier l'apoptose (Yang et al, 2005). La voie PI3K/Akt permet également de stimuler la prolifération tout en échappant à la mort cellulaire en aval de FLT3-ITD, notamment par la phosphorylation inactivatrice du facteur de transcription de la famille Forkhead Foxo3a et donc l'inhibition de l'expression de ses cibles, dont le régulateur négatif du cycle cellulaire p27^{KIP1}, et la protéine pro-apoptotique Bim (Scheijen et al, 2004, Brandts et al, 2005).

Au-delà de l'activation constitutive des voies classiquement activées par le FL dans les cellules hématopoïétiques, on trouve en aval de FLT3-ITD une activation très marquée du facteur de transcription STAT5, activation qui n'est pas retrouvée (ou bien plus faiblement) dans des cellules exprimant le récepteur sauvage ou portant une mutation TKD (Choudharhy et al, 2005). Le mode d'activation de STAT5 par FLT3-ITD est encore sujet à controverse : il semblerait que FLT3-ITD n'active pas la kinase JAK (principal régulateur des facteurs STAT), et un article paru en 2007 propose une régulation directe de STAT5 par FLT3-ITD (Choudhary et al, 2007). Cependant, des travaux plus récents ont montré que STAT5 pouvait être activé en aval de FLT3-ITD par plusieurs kinases de la famille Src : Lyn (Okamoto et al, 2007), Src (Leischner et al, 2012), et Fyn (Chougule et al, 2016). STAT5 a de nombreuses cibles qui se sont avérées essentielles pour les cellules leucémiques FLT3-ITD. On peut tout d'abord citer la kinase Pim 1 qui, en aval de FLT3-ITD, régule la prolifération et la survie des cellules leucémiques *via* ses cibles telles que la protéine anti-apoptotique BAD (Kim et al, 2005), ou la kinase Chk1 (Yuan et al, 2013). STAT5 permet également l'expression de la protéine anti-apoptotique MCL-1 (Yoshimoto et al, 2009), et du régulateur du cycle cellulaire CDC25A, qui a été identifié par notre équipe comme un acteur essentiel dans la biologie des LAM FLT3-ITD (Bertoli et al, 2015, ce travail sera présenté plus en détails à la fin de la partie de l'introduction traitant de CDC25A). De par ses cibles et sa spécificité à la mutation ITD, STAT5 est considéré comme un acteur essentiel de la signalisation oncogénique de FLT3-ITD dans les LAM.

Un résumé de la signalisation oncogénique en aval de FLT3-ITD est proposé figure 15.

c) Impact de la localisation cellulaire de FLT3-ITD sur sa signalisation oncogénique

FLT3, comme toute protéine adressée à la membrane, est synthétisé au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (RER), et va ensuite rejoindre la membrane plasmique en passant par un transport vésiculaire et l'appareil de Golgi. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe deux formes de FLT3 : une forme mature glycosylée de 160 kDa, retrouvée à la membrane, et une forme non glycosylée de 130 kDa, qui reste localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Schmidt-Arras et al, 2005). Dans le cas du récepteur muté, la forme immature est la forme majoritaire dans les cellules. On peut supposer que la modification de la séquence de FLT3 perturbe

le processus de maturation de la protéine, et cette localisation intracellulaire permet au récepteur muté d'émettre une signalisation différente de celle du récepteur membranaire (Choudhary et al, 2009). En effet, Le FL étant retrouvé uniquement à l'extérieur des cellules, cette forme non glycosylée ne peut a priori pas émettre de signal. Cependant, lorsque le récepteur est constitutivement activé par la mutation ITD, il peut alors signaler à la fois depuis la membrane plasmique et depuis le RE. Il a été montré en 2009 que la forme mature transmembranaire de FLT3-ITD activait de façon constitutive les voies situées en aval du récepteur sauvage (MAPKinases et PI3K), mais que la forme non glycosylée située au niveau du RER était responsable de l'activation de STAT5 (Schmidt-Arras et al, 2005, Choudhary et al, 2009) (Figure 14).

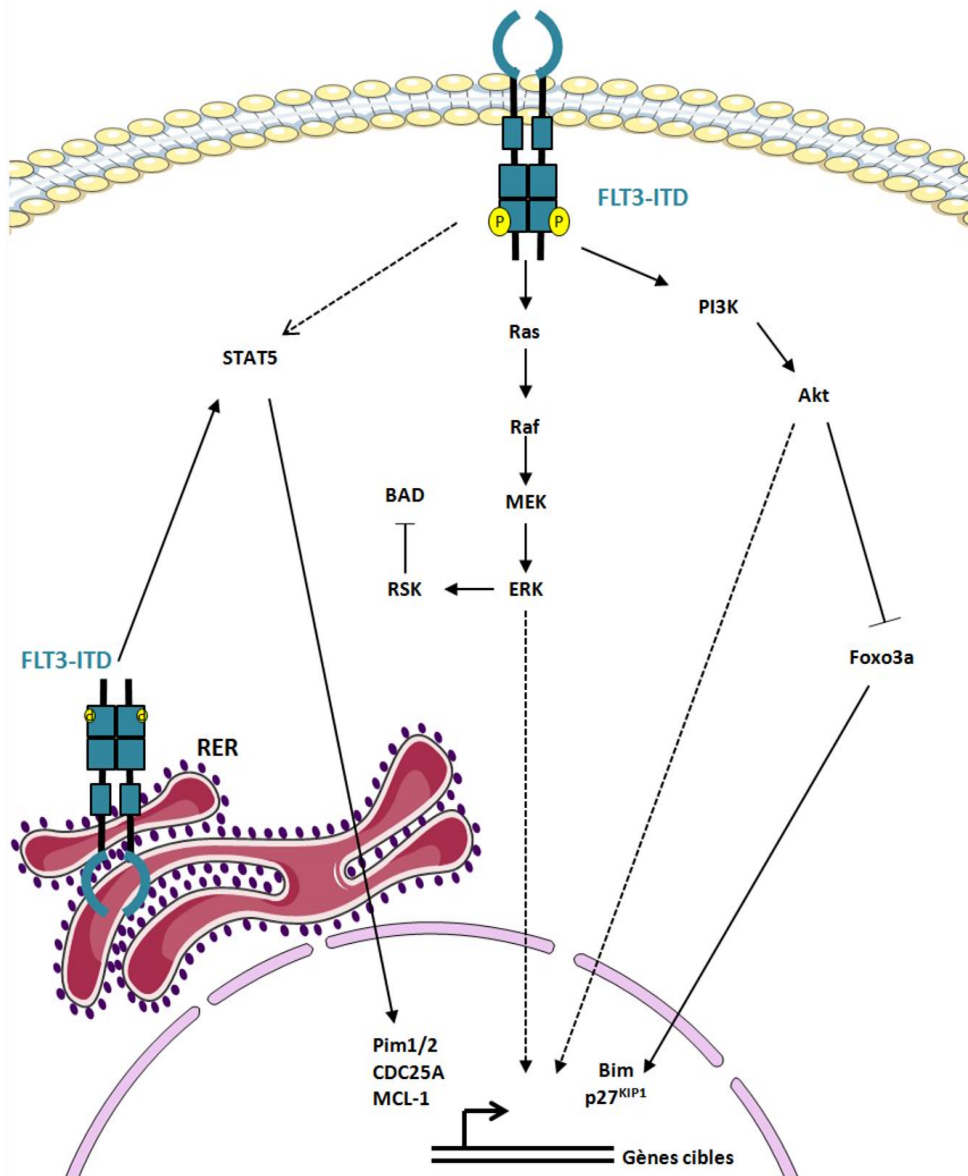


Figure 14. Signalisation oncogénique de FLT3-ITD en fonction de sa localisation cellulaire.

Selon sa localisation subcellulaire le récepteur muté FLT3-ITD active différentes voies de signalisation impliquées dans la transformation des cellules leucémiques.

Etonnamment, la localisation intracellulaire de FLT3 portant une mutation TKD, qui active également le récepteur de façon constitutive, n'active pas la même signalisation, mais au contraire induit la perte de son activité oncogénique, ce qui concorde avec les résultats montrant que FLT3-TKD

n'active pas STAT5 (Choudharhy et al, 2005), et illustre une fois de plus l'importance de la signalisation STAT5 dans la transformation des cellules par FLT3-ITD.

d) Le rôle inattendu de FLT3-ITD dans le blocage de différenciation

Comme nous l'avons décrit précédemment, FLT3-ITD est considérée comme une mutation de type I dans le modèle du double hit, c'est-à-dire qu'elle permet la prolifération anormale des cellules ; et cette théorie semble appuyée par les modèles murins. Cependant plusieurs travaux ont montré un rôle pour FLT3-ITD dans le blocage de différenciation des cellules leucémiques chez l'humain.

En 2000, une expérience de transcriptomique comparant des cellules exprimant le récepteur sauvage ou le récepteur muté a montré que la mutation ITD induisait une forte baisse de l'expression de facteurs de transcriptions PU.1 et C/EBP α , impliqués dans la différenciation myéloïde (Mizuki et al, 2003). En plus de son expression, FLT3-ITD peut également inhiber la fonction de C/EBP α en favorisant sa phosphorylation par la kinase ERK ou CDK1, et son inhibition induit une différenciation granulocytaire des lignées cellulaires leucémiques exprimant FLT3-ITD (Radomska et al, 2006, Radomska et al, 2012). Notre équipe a également identifié CDC25A comme régulateur potentiel de C/EBP α en aval de FLT3-ITD, et l'inhibition ou l'invalidation génétique de CDC25A dans des lignées leucémiques ou des cellules primaires exprimant FLT3-ITD induit une différenciation vers la lignée monocyttaire (Bertoli et al, 2015). En ce qui concerne PU.1, la régulation de son expression en aval de FLT3-ITD est médiée par le micro-ARN 155 (miR-155), dont l'expression est induite par STAT5 et NF- κ B, et qui cible l'ARNm de PU.1 (voir la partie IV. A. c de cette introduction pour une explication du fonctionnement des micro-ARN). L'inhibition de miR-155 ou la surexpression de PU.1 sont à l'origine d'une réduction de la prolifération et d'une induction de l'apoptose des cellules leucémiques exprimant FLT3-ITD (Gerloff et al, 2015). Il a plus récemment été montré que FLT3-ITD régulait, de façon positive cette fois, l'expression d'un autre facteur de transcription impliqué dans la différenciation myéloïde : le facteur RUNX1 ; l'inhibition de RUNX1 bloque la prolifération et relance la différenciation myéloïde des cellules FLT3-ITD, et les sensibilise à l'inhibition de FLT3-ITD (Hirade et al, 2016)

Enfin, Sexauer et al ont montré l'impact du micro-environnement sur la différenciation des cellules leucémiques FLT3-ITD. Ils ont tout d'abord remarqué dans le cadre d'un essai clinique de phase II testant un inhibiteur de FLT3 en traitement de la LAM en rechute ou réfractaire (Nybakken et al, 2016) que certains patients présentaient une différenciation des cellules leucémiques en réponse à l'inhibition de FLT3. Ils ont démontré grâce à des échantillons primaires et des lignées leucémiques FLT3-ITD que le traitement par un inhibiteur de FLT3 induit la mort des blastes circulants, mais la différenciation des blastes situés dans la moelle osseuse (Sexauer et al, 2012).

e) Impact pronostique de la mutation FLT3-ITD

La mutation FLT3-ITD est retrouvée dans plus de 20% des patients atteints de LAM, ce qui en fait la deuxième mutation la plus fréquente, et est particulièrement associée aux caryotypes dits intermédiaires (en particulier normaux) et aux LAM de type M5 de la classification FAB (monocytaires) (Thiede et al, 2002, Papaemmanuil et al, 2016). Les LAM avec mutation FLT3-ITD sont souvent hyperleucocytaires à cause d'une forte prolifération des cellules leucémiques (DiNardo et Cortes, 2016), et la présence de la mutation confère un mauvais pronostic aux LAM avec caryotype intermédiaire. En effet, les LAM FLT3-ITD rechutent plus souvent, ce qui diminue la survie globale des patients (Abu-Duhier, 2000, Fröhling et al, 2002). De plus, la mutation peut apparaître à la rechute

chez des patients où elle n'a pas été détectée au diagnostic, ce qui peut suggérer l'existence d'un clone très minoritaire au diagnostic portant la mutation qui se serait étendu après la chimiothérapie (Shih et al, 2002).

Comme nous avons pu rapidement le voir dans la partie traitant de la classification pronostique des LAM, il existe des facteurs modulant l'impact pronostique de la mutation FLT3-ITD (ELN 2017) :

- Les mutations associées : L'association de FLT3-ITD à des mutations du gène *NPM1* confère un meilleur pronostic aux patients d'après la classification de l'ELN 2017
- Le ratio allélique : un ratio élevé de l'allèle muté par rapport à l'allèle sauvage confère un mauvais pronostic aux patients (Thiede et al, 2002), qui sont désormais séparés en FLT3-ITD high (ratio > 0,5) et low (ratio < 0,5). Les patients FLT3-ITD low présentant aussi une mutation de *NPM1* ont un pronostic similaire aux patients non mutés pour FLT3 (Pratcorona et al, 2013).
- La taille de l'insertion en tandem : Comme nous l'avons vu plus haut, la taille de l'insertion peut varier de plusieurs centaines de paires de bases, et la taille de l'insertion a été décrite comme corrélée à un mauvais pronostic et une survie globale plus faible (Stirewalt et al, 2006). Cependant, ces résultats ont par la suite été remis en question (Gale et al, 2008, Kusec et al, 2006), des études plus poussées semblent donc nécessaires pour trancher sur l'impact pronostique véritable de la taille de l'insertion.
- La localisation de l'insertion : Une localisation de l'insertion hors du domaine JM (retrouvé dans 15% des cas) a été décrite comme un facteur pronostic défavorable (Schlenk et al, 2014).

Par ailleurs, depuis 2017 les patients porteurs de la mutation bénéficient d'une thérapie ciblée qui a permis d'améliorer significativement la survie de ces patients : la midostaurine (un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant FLT3) est en effet désormais utilisée de manière systématique en combinaison avec la chimiothérapie standard d'induction (anthracycline + cytarabine), les consolidations et l'entretien pour les patients adultes porteurs de LAM avec la mutation FLT3-ITD.

f) Mécanismes de résistance à la chimiothérapie

Au vu du mauvais pronostic et du fort taux de rechute observés chez les patients FLT3-ITD, il convient de se demander par quel(s) mécanisme(s) les cellules leucémiques FLT3-ITD peuvent résister à la chimiothérapie.

On peut tout d'abord rappeler que FLT3-ITD régule négativement plusieurs protéines pro-apoptotiques (BAD, Bim, Foxo3a), et favorise l'expression de la protéine anti-apoptotique MCL-1, ce qui pourrait donc permettre aux cellules d'échapper à la mort cellulaire induite par les traitements génotoxiques. Par ailleurs, Pardee et al ont montré qu'en réponse à la chimiothérapie, FLT3-ITD régule positivement l'expression de p53 et que cette surexpression est indispensable à la résistance médiée par FLT3-ITD (Pardee et al, 2011) ; plus récemment une équipe a établi une lignée cellulaire FLT3-ITD résistante à la cytarabine, et la lignée ainsi établie présentait une surexpression de p53 et de MCL-1 ainsi qu'une mutation du gène *TP53* (Ko et al, 2019). p53 étant un acteur essentiel de la réponse aux dommages à l'ADN, qui peut soit orienter la cellule vers la réparation des dommages soit vers l'apoptose, ces deux travaux illustrent bien l'importance de la régulation de l'apoptose et de la réponse aux dommages à l'ADN dans la réponse des cellules leucémiques aux traitements génotoxiques. Un travail de notre équipe a d'ailleurs impliqué un autre acteur de la réponse aux

dommages à l'ADN, la kinase Chk1, dans la résistance à la chimiothérapie médiée par FLT3-ITD (Yuan et al, 2013) ; et un article publié cette année a montré que la surexpression d'acteurs de la réponse aux dommages en aval de FLT3-ITD était nécessaire à la résistance des cellules à la cytarabine, et que l'inhibition de Chk1 sensibilise les cellules leucémiques au traitement *in vivo* (Wu et al, 2019).

Outre la régulation des voies de réponse aux dommages à l'ADN, FLT3-ITD permet également d'échapper aux effets cytotoxiques de la cytarabine en inhibant l'expression du transporteur responsable de l'entrée de la cytarabine dans les cellules : la protéine ENT1 (Equilibrative Nucleoside Transporter 1) (Jin et al, 2009)

Toutes ces études sont autant de rationnels justifiant d'inhiber FLT3 ou les voies en aval pour essayer de pallier aux rechutes après chimiothérapie.

C. Développement d'inhibiteurs de FLT3

a) Mécanisme(s) et spécificité de l'inhibition de FLT3

Les inhibiteurs de FLT3 fonctionnent par compétitivité avec l'ATP au niveau de la poche à ATP située entre les deux domaines kinases, mais au sein de ce fonctionnement général, on distingue deux catégories d'inhibiteurs de FLT3. Les inhibiteurs de type I (tels que la midostaurine, le gilteritinib, et le crenolanib) se fixent près de la poche à ATP quelle que soit la conformation du récepteur. Les inhibiteurs de type II (sorafenib et quizartinib) lient un domaine hydrophobe adjacent à la poche à ATP qui n'est accessible qu'en conformation inactive du récepteur, et empêchent son activation. Les inhibiteurs de type II ne sont par conséquent pas efficaces pour inhiber FLT3 en cas de mutation TKD, qui favorise une conformation active du récepteur, contrairement aux récepteurs de type I pouvant inhiber toutes les formes du récepteur (Short et al, 2019, Larossa-Garcia et Baer, 2017). On peut aussi classer les inhibiteurs de FLT3 selon leur spécificité pour FLT3 : les inhibiteurs dits de première génération sont en réalité des inhibiteurs de plusieurs tyrosines kinases dont FLT3, ce qui peut leur conférer une efficacité plus importante en terme d'inhibition de la signalisation leucémique mais également plus d'effets « off-target » potentiellement indésirables dus à leur faible spécificité ; les inhibiteurs de seconde génération ont eux été développés pour cibler plus spécifiquement FLT3, et avec une meilleure efficacité, dans le but de pallier à l'aspect trop transitoire de la réponse des patients aux inhibiteurs de première génération (Daver et al, 2019).

Un nouvel inhibiteur de FLT3 est actuellement en cours de développement. Il s'agit du FF-10101, un inhibiteur de type 1 qui, contrairement aux autres inhibiteurs, ne fonctionne pas par compétitivité avec l'ATP. En effet, il inhibe FLT3 en formant une liaison covalente irréversible avec le résidu cystéine 695 du site actif du domaine TK du récepteur. Ce mode d'action lui confère une grande spécificité, avec un IC50 de 0,2 nM pour FLT3 contre 1nM pour Kit et des IC50 de l'ordre de 10nM pour les autres tyrosines kinases étudiées. Cet inhibiteur a fait preuve d'une très grande efficacité sur des lignées leucémiques et des échantillons de patients FLT3-ITD ou TKD, ainsi que dans des expériences de xénogreffes (Yamaura et al, 2018, Bertoli, 2019), et il est actuellement testé en essai clinique de phase 1/2 (NCT03194685).

b) État de l'art des inhibiteurs de FLT3 utilisés ou testés en clinique

Comme nous avons pu le voir dans la partie «Nouvelles stratégies thérapeutiques » de cette introduction, les inhibiteurs de FLT3 font l'objet de toutes les attentions en ce qui concerne la mise

au point de nouvelles stratégies pour traiter les LAM, et en particulier les LAM avec mutation FLT3-ITD.

Génération	Inhibiteur	Phase de développement
Première génération	Midostaurine (type I)	AMM en 2017 dans le traitement des LAM avec mutation de FLT3 en combinaison avec la chimiothérapie
	Sorafenib (Type II)	Phase 3 : <ul style="list-style-type: none"> • Première ligne de traitement en combinaison avec la chimiothérapie chez les patients FLT3-ITD high • prévention de la rechute après allogreffe chez les patients FLT3-ITD
	Lesaurtinib (Type I)	Phase 2
	Sunitinib (Type I)	Phase 2
	Ponatinib (Type II)	Phase 2
Seconde génération	Quizartinib (Type II)	Phase 3 : <ul style="list-style-type: none"> • En monothérapie dans les LAM FLT3-ITD en rechute ou réfractaires (QuANTUM-R) – Résultats disponibles, ATU nominative pour les patients en rechute ou réfractaires • En première ligne en combinaison avec la chimiothérapie d'induction et de consolidation (QuANTUM FIRST) – Résultats encore non disponibles, recrutement terminé
	Gilteritinib (Type I)	Phase 3 : <ul style="list-style-type: none"> • Maintenance après induction/consolidation dans les LAM FLT3-ITD • En monothérapie dans les LAM FLT3-ITD en rechute ou réfractaires – Résultats disponibles, ATU nominative pour les patients en rechute ou réfractaires • Maintenance après allogreffe dans les LAM FLT3-ITD • Combinaison avec l'azacitidine chez les patients FLT3-ITD non éligibles pour la chimiothérapie intensive Phase 1/2 : En première ligne en association avec la chimiothérapie (bras contrôle : chimiothérapie+midostaurine)
	Crenolanib (Type II)	Phase 3 : Combinaison avec la chimiothérapie dans les LAM FLT3-ITD en rechute ou réfractaires
	FF-10101 (Type I)	Phase 1/2

Tableau 7. Développement clinique des inhibiteurs de FLT3 dans les LAM.

Adapté de Daver et al, 2019.

On notera tout d'abord la première AMM pour un inhibiteur de FLT3 en 2017 : après un essai clinique de phase 3 randomisé testant la midostaurine (un inhibiteur de première génération de type I) en combinaison avec la chimiothérapie d'induction/consolidation et de maintenance qui a montré une amélioration significative de la survie chez les patients FLT3-ITD ou FLT3 TKD, elle a été approuvée dans le traitement des LAM avec mutation de FLT3 en combinaison avec la chimiothérapie (Levis, 2017).

D'autres inhibiteurs de FLT3 sont actuellement en développement, dont quatre actuellement en essai clinique de phase III (Tableau 7). Parmi ceux-ci, un des plus prometteurs est l'inhibiteur de seconde génération de type II Quizartinib (ou AC220). Les résultats d'un essai clinique de phase 3 comparant l'efficacité du quizartinib en monothérapie par rapport à la chimiothérapie de sauvetage (essai QuANTUM-R, NCT02039726) ont récemment été rendus publics, et ont montré une amélioration de la survie globale médiane (4,7 mois contre 6,2 mois, P=0.0177) pour les patients traités par quizartinib. Il s'agit du premier essai clinique montrant une amélioration de la survie globale avec un inhibiteur de FLT3 dans les LAM FLT3-ITD en rechute ou réfractaires (Cortes et al, 2018), et ces résultats ont amené le quizartinib à bénéficier en France depuis la fin de l'année 2018 d'une autorisation temporaire d'utilisation nominative pour les patients traités pour une LAM FLT3-ITD en rechute ou réfractaires. Un autre essai de phase III est en cours, QuANTUM-First (NCT02668653), pour évaluer l'efficacité et la tolérance du quizartinib en combinaison avec la chimiothérapie d'induction et consolidation, puis en monothérapie en maintenance.

Un autre inhibiteur de seconde génération, le gilteritinib, a depuis montré son efficacité dans le traitement des LAM FLT3-ITD en rechute ou réfractaires. En effet, les résultats de l'essai clinique de phase 3 ADMIRAL (NCT02421939), testant l'efficacité du gilteritinib en monothérapie par rapport à la chimiothérapie de sauvetage, ont été présentés en avril 2019 lors du congrès de l'American Association for Cancer Research. Le gilteritinib en monothérapie permet d'améliorer nettement la survie globale par rapport aux traitements standards (5,6 mois contre 9,3 mois, P=0.0007), et a reçu l'AMM aux Etats-Unis pour les patients traités pour une LAM FLT3-ITD en rechute ou réfractaires ; il bénéficie pour le moment d'une ATU nominative en France (Bertoli, 2019).

c) Comment contourner le problème des résistances aux inhibiteurs de FLT3 ?

Malgré l'engouement suscité par les inhibiteurs de FLT3 dans le traitement des LAM FLT3-ITD, nombreux sont les patients qui rechutent ou ne répondent pas à ces thérapies ciblées. Ces phénomènes de résistances peuvent s'expliquer par l'apparition de mutations ponctuelles de type FLT3-TKD qui rendent les cellules leucémiques résistantes aux inhibiteurs de type II, ou bien par une activation constitutive de voies de signalisation situées en aval de FLT3 (Daver et al, 2015).

Une des voies les plus décrites comme médiatrice de la résistance aux inhibiteurs de FLT3 est celle des kinases Pim : en l'absence de traitement, Pim1 stabilise la forme non glycosylée de FLT3-ITD ce qui promeut l'activation de STAT5 et donc l'expression de Pim1 (Natarajan et al, 2013), et l'inhibition de Pim permet de sensibiliser des lignées leucémiques et des cellules primaires FLT3-ITD à l'inhibition de FLT3 (Fathi et al, 2012, Green et al, 2015).

Le micro-environnement peut également, comme nous l'avons vu précédemment, moduler la réponse des cellules leucémiques aux inhibiteurs de FLT3 (Sexauer et al, 2013), et il peut favoriser la résistance : le contact des cellules leucémiques avec les cellules de la moelle osseuse favorise l'activation de la voie ERK indépendamment de FLT3-ITD, ce qui les protège de l'effet pro-

apoptotique des inhibiteurs de FLT3, l'inhibition de MEK suffit à sensibiliser à nouveau les cellules leucémiques (Yang et al, 2014). De plus, l'adhésion des cellules leucémiques à la MEC favorise la surexpression de la protéine CDC25A via la voie Akt (Fernandez-Vidal et al, 2006), et CDC25A a été montré comme essentielle à la prolifération des cellules leucémiques FLT3-ITD (Bertoli et al, 2015). Enfin, après chimiothérapie, le niveau de FL circulant dans le sang augmente chez les patients, et cette augmentation de concentration du FL peut inhiber les effets cytotoxiques des inhibiteurs de FLT3, notamment en augmentant fortement leur IC50 (Sato et al, 2011, Yang et al, 2014).

La signalisation induite par FLT3-ITD permet la surexpression de protéines anti-apoptotiques (Yoshimoto et al, 2009). La surexpression de ces protéines (Bcl2, Mcl-1, protéines de la famille Bcl-2) a été décrite dans plusieurs travaux comme impliquée dans la résistance aux inhibiteurs de FLT3 (Breitenbuecher et al, 2009, Bagrintseva et al, 2005), et l'inhibition de la protéine pro-apoptotique Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) restaure la sensibilité des cellules leucémiques FLT3-ITD à l'inhibition de FLT3 (Kohl et al, 2007).

L'idée à retenir des travaux décryptant les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de FLT3, est que l'efficacité de ces inhibiteurs pourrait être amplifiée si l'on arrivait à cibler ces mécanismes de résistance. Un résumé des essais cliniques visant à combiner un inhibiteur de FLT3 avec l'inhibition d'une ou plusieurs voie(s) de résistance possible(s) est présenté dans le tableau 8. Il reste donc capital de comprendre le mieux possible la signalisation en aval de FLT3-ITD afin d'anticiper de potentiels mécanismes de résistance et réfléchir à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Inhibiteur de FLT3	Traitement en combinaison
Midostaurine	LGH447 (inhibiteur de Pim) - NCT02078609
Gilteritinib	Venetoclax (inhibiteur de Bcl2) - NCT03625505
Sorafenib	Palbociclib (inhibiteur de CDK6, régulateur transcriptionnel de FLT3 et Pim1 (REF)) - NCT03132454
	Bortezomib (inhibiteur du protéasome) + Vorinostat (inhibiteur des histones déacétylases) - NCT01534260
	Omacetaxine mepesuccinate (inhibition de la synthèse protéique) - NCT03170895
Quizartinib	Omacetaxine mepesuccinate - NCT03135054
	Venetoclax (inhibiteur de Bcl2) - NCT03735875
	Milademetan (inhibiteur de MDM2) - NCT03552029
SEL24	SEL24 (inhibiteur ciblant à la fois les kinases Pim et FLT3) – NCT03008187

Tableau 8. Essais cliniques basés sur des combinaisons aux inhibiteurs de FLT3 en cours.

Adapté de Short et al, 2019.

III. Le régulateur du cycle cellulaire CDC25A

Un travail de notre équipe a identifié la phosphatase CDC25A comme un acteur essentiel de la biologie des LAM FLT3-ITD (Bertoli et al, 2015). Ce travail de thèse se concentre donc sur cette protéine, dont nous allons ici présenter les fonctions et régulations, et l'importance dans le contexte des cancers.

A. Le cycle cellulaire

a) Les phases du cycle cellulaire

On appelle cycle cellulaire l'enchaînement des étapes permettant à une cellule mère de se diviser en deux cellules filles. Le cycle cellulaire est divisé en 4 phases :

- Une première phase de croissance de la cellule, appelée G1 (« Gap 1»),
- La phase de synthèse (S) où la cellule réplique son ADN,
- Une deuxième phase de croissance (G2),
- Et enfin la phase de mitose (M), où la cellule sépare les deux copies de son matériel génétique et se divise pour donner deux cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère.

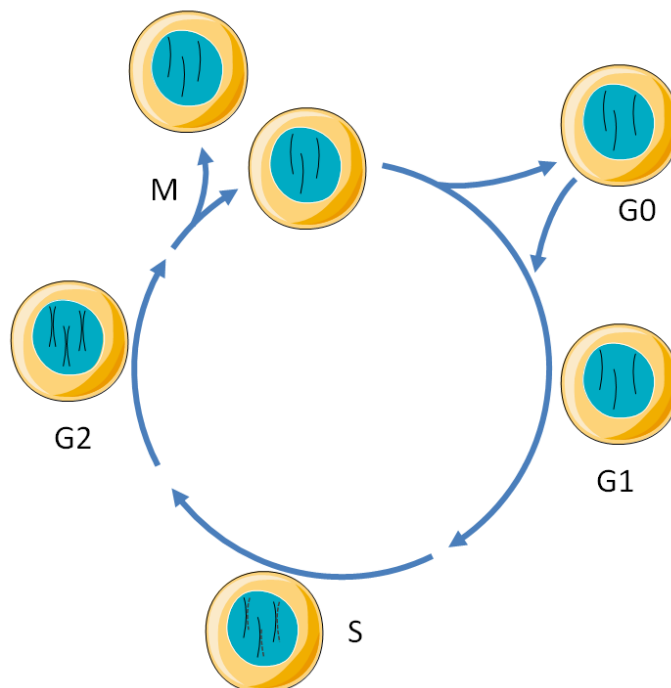


Figure 15. Enchaînement des phases du cycle cellulaire

En phase G1 les chromosomes sont monochromatidiens, ils se répliquent lors de la phase S (pointillés), et sont bichromatidiens en phase G2. La mitose (M) permet notamment la séparation des chromatides sœurs et l'obtention de deux cellules filles à chromosomes monochromatidiens.

Cependant, toutes les cellules de l'organisme ne cyclent pas constamment. En effet, la plupart des cellules différenciées sont quiescentes, dans une phase que l'on appelle G0, elles peuvent cependant avec le signal adéquat reprendre leur cycle en phase G1.

b) Contrôle du déroulement du cycle cellulaire

L'enchaînement des phases du cycle cellulaire est un phénomène très contrôlé par la cellule. En effet, une division cellulaire réalisée de façon incorrecte (mauvaise séparation des chromosomes, ADN endommagé,...) peut à terme amener à l'accumulation d'anomalies génétiques et donc à la cancérisation des cellules. Pour éviter ces divisions défectueuses, il existe de nombreux points de contrôle (ou « checkpoints ») répartis le long des phases du cycle, dont seuls les principaux seront présentés ici (Fig. 16).

La première étape déterminante dans la progression du cycle cellulaire est appelée le point de restriction (ou pR). Il se situe en phase G1, et c'est à ce moment que sera décidé si la cellule va entamer un nouveau cycle ou rester en phase G1. Cette décision dépend de signaux extérieurs appelés signaux mitogènes qui vont activer dans la cellule des voies de signalisation pour mettre en place les futures phases du cycle.

Une fois le pR passé, la cellule ne peut pas redevenir quiescente, et doit donc continuer dans les différentes étapes du cycle. Cependant, si l'ADN est endommagé la progression dans le cycle ne peut se faire sans risquer des erreurs de réplication ou de ségrégation des chromosomes à la mitose. Plusieurs points de contrôle de l'intégrité de l'ADN sont donc répartis au cours du cycle : à l'entrée en phase S, au cours de la phase S, et à l'entrée en mitose (respectivement G1/S, intra-S, et G2/M). En cas de dommages à l'ADN ou de stress réplcatif (arrêt des fourches de réplication, pénurie de nucléotides, etc.), des mécanismes de signalisation cellulaire vont être enclenchés pour arrêter le cycle le temps de pallier aux dommages ou, le cas échéant, déclencher l'apoptose de la cellule.

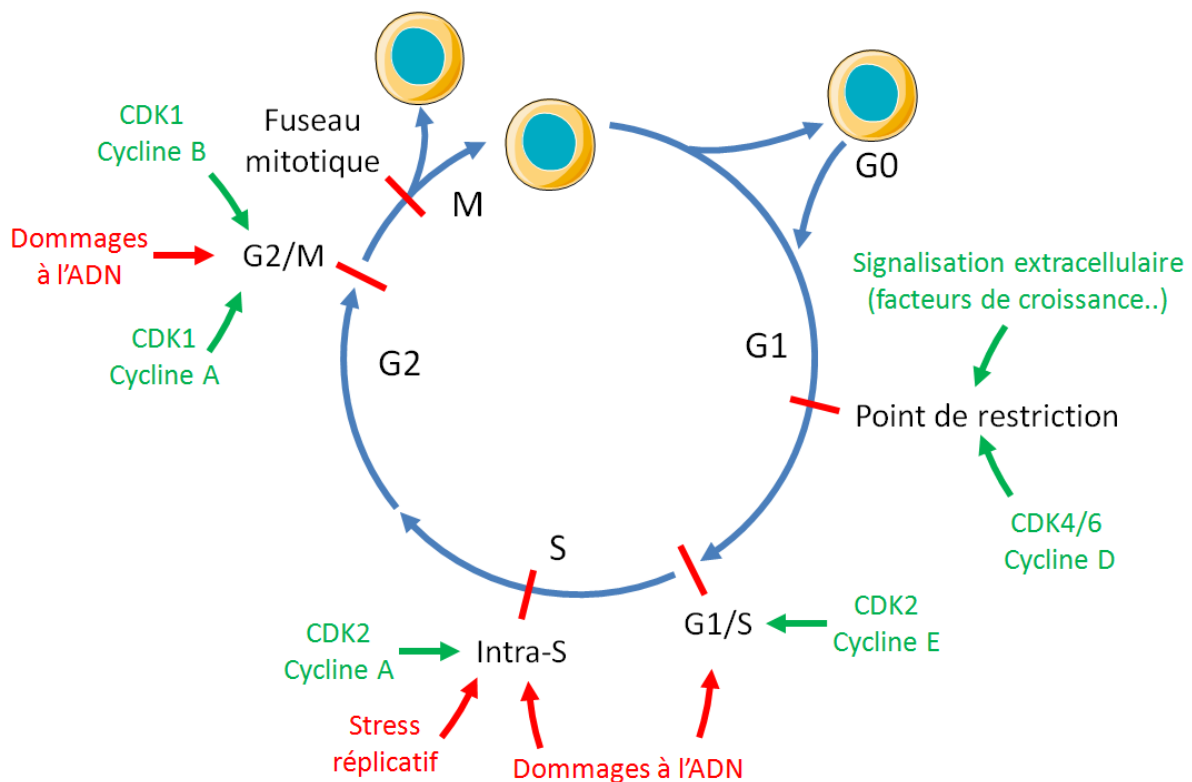


Figure 16. Principaux points de contrôle du cycle cellulaire

Vert : facteurs permettant le passage des points de contrôle. Rouge : facteurs causant l'arrêt des cellules aux points de contrôle. Harashima et al, 2013 et Otto et Sicinski, 2017.

Si tous les points de contrôle ont été validés, la cellule va progresser à travers toutes les phases du cycle. Cet enchainement est coordonné par deux familles de protéines : les cyclines, et les kinases qui y sont associées (CDK, Cyclin Dependent Kinases) ; chaque phase va être régulée par un ou plusieurs binômes CDK-cycline (Fig 11).

L'association des CDK avec leurs cyclines, ainsi que l'activité kinase des CDK et donc leur fonction de promotion du cycle cellulaire, sont sous le contrôle de phosphorylations, régulées notamment par les phosphatases de la famille Cell Division Cycle 25 (CDC25).

B. La famille des phosphatases CDC25

a) Fonction

La famille des protéines CDC25 comprend trois isoformes chez l'Homme : CDC25A, B, et C, codées par trois gènes différents. Ces phosphatases sont dites à double spécificité car elles peuvent déphosphoryler à la fois un résidu tyrosine et thréonine ou sérine sur une même protéine.

A.



B.

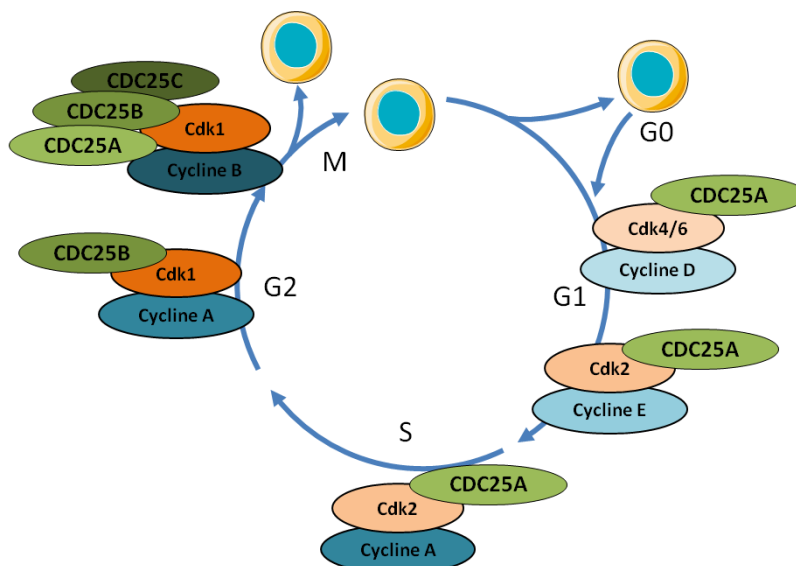


Figure 17. Fonction des phosphatases CDC25 dans la régulation des CDK au cours du cycle cellulaire

A. Mécanisme de régulation des CDK par les phosphatases CDC25 B. Rôle des différentes CDC25 au cours du cycle.

Leur fonction la plus décrite est la régulation des CDK au cours du cycle cellulaire : la déphosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 des CDK (phosphorylés par les kinases wee1 ou myt1) va libérer leur site de fixation de l'ATP et donc leur permettre d'exercer leur rôle de kinase au cours du cycle (Fig. 17 A). Si leur fonction peut paraître redondante, chaque CDC25 pouvant en théorie activer toutes les CDK du cycle, il a été montré une répartition du rôle des CDC25 au cours du cycle : il a été longtemps accepté que les trois intervenaient pour l'entrée en mitose,

mais CDC25A intervient spécifiquement aux phases G1 et S, et CDC25B au niveau de la phase G2 (Fig. 17 B, Boutros et al, 2006) ; mais un travail de Timofeev et al décrit la régulation du complexe CDK1-cycline A en phase G2 par CDC25A, qui agirait donc dans toutes les phases du cycle (Timofeev et al, 2009). Par ailleurs, plusieurs travaux ont montré qu'en plus de leur fonction de déphosphorylation des CDK, les CDC25 modulent également leur activité en régulant leur association avec leur cycline partenaire (Bertero et al, 2013, Timofeev et al, 2010).

b) Structure et régulation

Les phosphatases CDC25 sont constituées d'un domaine régulateur en N-terminal, et du domaine catalytique en C-terminal. La structure du domaine catalytique est similaire pour chaque isoforme et est très conservée entre les espèces, elle comprend le motif consensus du site actif phosphatase à double spécificité : HCX₅R (Rudolph, 2002). En revanche, chaque CDC25 possède un domaine régulateur différent, ce qui permet notamment leur régulation différentielle au cours du cycle. Néanmoins, certains éléments de régulation sont retrouvés chez les trois phosphatases (Figure 18). Tout d'abord, chaque CDC25 comporte dans son domaine régulateur une séquence NES (Séquence d'Export Nucléaire) et une séquence NLS (Séquence de Localisation Nucléaire), ce qui leur permet donc de réaliser des allers-retours entre le noyau et le cytoplasme, comme cela a été montré pour CDC25A (Källström et al, 2005), CDC25B (Lindqvist et al, 2004) et l'homologue des CDC25 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Keaton et al, 2008).

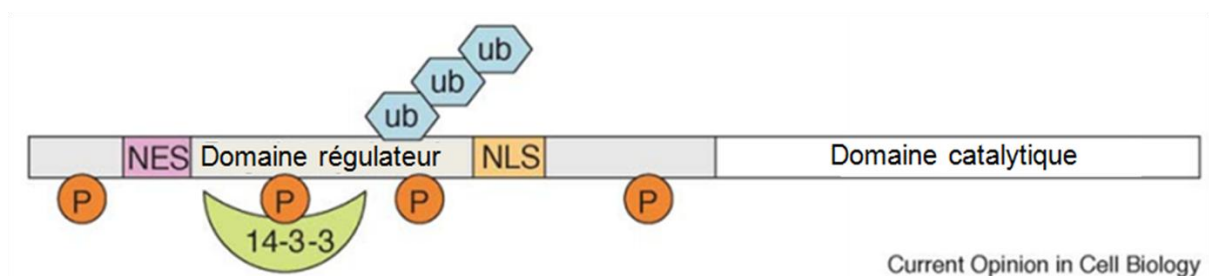


Figure 18. Structure commune aux trois phosphatases CDC25

Les CDC25A sont composées d'un domaine catalytique, et d'un domaine régulateur contenant une séquence NES et une séquence NLS ainsi que des sites de phosphorylation (P) et d'ubiquitination (ub). Traduit de Boutros et al, 2006.

De plus, par leur action d'activation du cycle cellulaire, les phosphatases CDC25 sont des éléments essentiels des points de contrôle en réponse aux dommages à l'ADN. L'endommagement de l'ADN va activer une cascade complexe de signalisation menant notamment à l'activation des kinases ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia-Telangiectasia/RAD3-related), qui vont à leur tour activer les kinases checkpoint 1 et 2 (Chk1 et Chk2) et p38. Les CDC25 possèdent dans leur domaine régulateur des sites de phosphorylation reconnus par ces kinases, et vont donc être phosphorylés en réponse à des dommages à l'ADN. Ces phosphorylations peuvent constituer des sites d'interaction de la protéine régulatrice 14-3-3, et cette interaction peut amener à la séquestration des CDC25 dans le cytoplasme (dans le cas de CDC25B et C) ou au blocage de leur interaction avec les CDK (dans le cas de CDC25A), et donc à l'inhibition de leur fonction de phosphatase (Aressy et Ducommun, 2008). CDC25A peut également comme nous le verrons par la suite être dégradée en conséquence de sa phosphorylation par les kinases des checkpoints. Ainsi, les CDC25 ne seront plus capables d'activer les CDK et le cycle cellulaire sera interrompu tant que l'ADN sera endommagé.

C. Fonctions non canoniques de CDC25A

Contrairement aux deux autres isoformes, un KO du gène de CDC25A dans un modèle murin est létal à un stade précoce du développement embryonnaire (Ray et al, Juillet 2007). Ceci laisse à penser que si l'absence de CDC25B ou C peut-être compensée par les deux autres isoformes, ce n'est pas le cas de CDC25A, qui doit donc avoir des fonctions qui lui sont propres.

Tout d'abord il convient de rappeler ici que CDC25A intervient pour déphosphoryler les CDK au cours de presque toutes les étapes du cycle cellulaire, notamment en G1 et G1/S, alors que les deux autres interviennent essentiellement en G2 et M (Fig. 17B). Cependant, des travaux ont montré que l'absence de CDC25B ou C pouvait perturber l'entrée en phase S des cellules (Turowski et al, 2003 et Aressy et Ducommun, 2008), suggérant une redondance au moins partielle des fonctions de CDC25A dans le cycle.

L'intérêt spécifique de CDC25A repose peut-être alors dans ses fonctions dites « non-canoniques », qui ne sont pas liées à sa capacité à activer les CDK au cours du cycle. En effet, quelques travaux ont montré que CDC25A pouvait déphosphoryler d'autres substrats que les CDK, et intervenir dans la biologie de la cellule à d'autres niveaux que la progression du cycle cellulaire. On citera tout d'abord le travail de Leisser et al (Leisser et al, 2004), identifiant le facteur de transcription pro-apoptotique Forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1 (FKHRL1) comme cible de CDC25A : la déphosphorylation de cette protéine induit sa séquestration dans le noyau, et donc la transcription de ses cibles et l'induction de l'apoptose dans un modèle de cellules de carcinome ovarien. La déphosphorylation directe de FKHRL1 par CDC25A n'a cependant pas été complètement démontrée. De façon intéressante, un autre travail avait montré quelques années auparavant un rôle anti-apoptotique de CDC25A lié à son interaction avec ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) : CDC25A inhibe l'activité kinase d'ASK1, indépendamment de sa propre activité phosphatase, et empêche l'entrée en apoptose à la suite d'un stress oxydatif (Zou et al, 2001). Plus récemment, Liang et al ont pour la première fois fait le lien entre CDC25A et métabolisme cellulaire (Liang et al, 2016) : ce travail identifie une nouvelle fonction de CDC25A, nécessitant la phosphorylation de son résidu tyrosine 59. En effet, après phosphorylation par la kinase Src, CDC25A déphosphoryle directement la kinase PKM2 (Pyruvate Kinase M2, impliquée dans les étapes finales de la glycolyse). La déphosphorylation de PKM2 par CDC25A dans le noyau des cellules induit l'expression de gènes de la glycolyse et promeut l'effet Warburg et la tumorigénèse dans des cellules de glioblastome.

Au-delà de son rôle dans le cycle cellulaire, CDC25A intervient donc dans différentes fonctions cellulaires (apoptose, métabolisme) dont la dérégulation peut rapidement amener à la transformation des cellules. D'ailleurs, comme nous le verrons dans le paragraphe « CDC25A et cancer », la surexpression de CDC25A permet la transformation des cellules en coopération avec différents oncogènes (Ray et al, Février 2007). Il est donc crucial que cette protéine soit finement régulée.

D. Modes de régulation de CDC25A

Outre les régulations communes à toutes les CDC25 décrites dans le paragraphe III. B. b, la phosphatase CDC25A est au cœur d'un réseau de régulations complexe, intervenant à tous les niveaux, de la transcription de son gène à la régulation de la protéine mature.

a) *Régulation transcriptionnelle de CDC25A*

L'expression de l'ARNm (ARN messenger) de CDC25A est strictement contrôlée au cours du cycle cellulaire et plus particulièrement à la transition G1/S. L'induction de la transcription du gène *CDC25A* à la fin de la phase G1 et l'augmentation du niveau cellulaire de CDC25A est une des conséquences du passage du point de restriction induit par les signaux mitogènes extracellulaires et est essentielle à la progression de la cellule vers la phase S (Bartek et Lukas, 2001). En effet, en réponse à ces signaux mitogènes, une cascade de signalisation est activée dans la cellule, qui amène à l'activation de la transcription du gène de la cycline D. Une fois exprimée, la cycline D va s'associer avec les CDK4 et 6, leur permettant de phosphoryler la protéine du rétinoblastome (Rb). Rb en l'absence de phosphorylation s'associe au facteur de transcription E2F, inhibant sa fonction d'activation de la transcription. E2F est libéré après phosphorylation de Rb, et vient activer la transcription de ses gènes cibles, dont CDC25A et la cycline E, permettant l'entrée en phase S (Vigo et al, 1999, Chen et al, 1999). De plus, un travail de Sullivan et al a montré que CDC25A était une cible transcriptionnelle directe du régulateur du cycle cellulaire Forkhead box M1 (FOXO1), qui active sa transcription via un mécanisme dépendant d'E2F ; par ailleurs l'activité transcriptionnelle de FOXO1 est augmentée par une forte expression de CDC25A (Sullivan et al, 2012), suggérant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif similaire à celle menant à l'activation d'E2F.

La transcription de CDC25A peut également être activée en réponse à la signalisation induite par l'interleukine 6 (IL6). En effet Barré et al ont montré que la stimulation de cellules hépatiques HepG2 par l'IL6 entraînait la localisation du facteur de transcription STAT3 au promoteur de CDC25A pour activer sa transcription. Cette activation nécessite la collaboration de STAT3 avec la protéine c-Myc qui se fixe également au promoteur de CDC25A en réponse à l'IL6 (Barré et al, 2005).

c-Myc peut également réguler la transcription de CDC25A indépendamment de STAT3. En effet c-Myc en hétérodimère avec son partenaire Max, peut lier le promoteur de CDC25A et activer sa transcription dans un contexte d'induction de l'apoptose (Galaktionov et al, 1996). De façon intéressante, une corrélation entre myc et ses cibles, dont CDC25A, est observée dans les cancers du sein et les lymphomes de Burkitt (Ben-Yosef et al, 1998).

La transcription de CDC25A peut également être régulée négativement par les acteurs des points de contrôle du cycle cellulaire. En effet, il a été montré que le suppresseur de tumeur p53, acteur essentiel de la réponse aux dommages à l'ADN, peut inhiber la transcription de CDC25A *via* le répresseur transcriptionnel ATF3 (Activating Transcription Factor 3) (Rother et al, 2007, Pozo-Molina et al, 2015, Demidova et al, 2009). De plus, si nous avons plus haut présenté le facteur STAT3 comme un activateur de la transcription de CDC25A en réponse à l'IL6, il peut également, avec d'autres partenaires, l'inhiber. Tout d'abord, Barré et al ont montré dans le même travail qu'en réponse à un stress oxydatif STAT3 s'associait à Rb pour inhiber l'activité du promoteur de CDC25A (Barré et al, 2005). Un autre travail a montré que p21, une cible transcriptionnelle de p53 activée en réponse aux dommages à l'ADN, s'associe à STAT3 et E2F pour réprimer la transcription de CDC25A (Vigneron et al, 2006). Une liste exhaustive des régulateurs transcriptionnels directs connus de CDC25A est présentée dans le tableau 9.

Rôle dans la régulation de la transcription	Facteur de transcription	Contexte cellulaire
Activation	C-Myc	NIH 3T3 (Galaktionov et al 1996) En association avec STAT3 en réponse à l'IL6, lignée HepG2 (cancer du rein) (Barré et al, 2005)
	E2F	Cellules murines NIH 3T3 (Chen et al, 1999) En réponse à l'oestradiol (E2) dans une lignée mammaire (Ru Lee et al, 2006) Cycle cellulaire des cellules HeLa (Li et al, 2007)
	NANOG	Transition G1-S dans des cellules souches embryonnaires humaines (Zhang et al, 2009)
	ACTR	Plusieurs lignées cellulaires (Louie et al, 2006)
	E7 (protéine du papillomavirus humain)	Disruption des complexes E2F-Rb au promoteur de CDC25A dans le cancer du col de l'utérus (Wu et al, 2000 et Nguyen et al, 2002)
	NPAS2	Lignées cellulaires MCF-7 (cancer du sein) et MCF-10A (tissu épithélial) (Yi et al, 2009) En association avec BMAL1 dans les lignées HLE et HLF (carcinome hépatocellulaire) (Yuan et al, 2017)
	TCF/ β -caténine	Cellules mésangiales humaines, en réponse à l'activation de la voie Wnt (Vijayakumar et al, 2011)
	FEZF1	Cellules souches de gliome (Yu et al, 2017)
	YBX1	Lignées d'adénocarcinome pulmonaire (Zhao et al, 2016)
	FOXM1	Lignées U2OS (ostéosarcome) et CWR22rv1 (cancer de la prostate) (Sullivan et al, 2012)
Répression	Rb	En association avec E2F (Chen et al, 1999 et Vigo et al, 1999) En association avec STAT3 en réponse au stress oxydatif dans les cellules HepG2 (Barré et al, 2005) En association avec HMGA1 dans la différenciation des adipocytes (Esposito et al, 2009)
	HIF-1 α	Inhibe la liaison de Myc au promoteur de CDC25A en réponse à l'hypoxie dans la lignée HCT116 (cancer du colon) (Hammer et al, 2007)
	TIF1 β	Sa forme déphosphorylée s'associe au facteur HP1 au promoteur de CDC25A au cours du cycle des cellules HeLa (Chang et al, 2008)
	ATF3	Activé par p53 dans la lignée HCT116 (Demidova et al, 2009) en réponse à l'arsenic dans la lignée MCF-7 (Pozo-Molina et al, 2015)
	CUT1	NIH-3T3 : activé par l'activité phosphatase de CDC25A (Paskind et al, 2000)
	KDM2A	Réprime l'activité transcriptionnelle de E2F dans la lignée MCF-7 (Rizwani et al, 2014)
	Prox1	La répression de l'expression de CDC25A médie l'inhibition de cellules de neuroblastomes causée par la surexpression de Prox1 (Foskolou et al, 2013)
	E2F	En complexe avec p130 dans les kératinocytes (Iavarone et al, 1999) En association avec STAT3 et p21 en réponse aux dommages à l'ADN (Vigneron et al, 2006)

Tableau 9. Facteurs de transcription régulant directement l'activité du promoteur de CDC25A

b) *Post transcriptionnelle et traductionnelle*

Après transcription de leur gène, les ARNm des CDC25 sont tous soumis à un épissage alternatif (Fig. 19), qui donne naissance à plusieurs variants de chaque isoforme. Dans le cas de CDC25A, il existe deux variants d'épissage connus : CDC25A 1 et 2 (Wegener et al, 2000), chacun possédant un site catalytique intact et fonctionnel. Le variant 2 de CDC25A a un exon de moins que le variant 1, il lui manque donc certains domaines de régulation, notamment le site de phosphorylation activatrice par les CDK, ce qui suppose une activité plus réduite, et il semble moins fortement exprimé au cours de cycle. Il n'y a à ce jour que très peu de choses connues sur ces variants d'épissage, et le rôle de la forme 2 par rapport à la forme entière de la protéine reste encore à décrire.

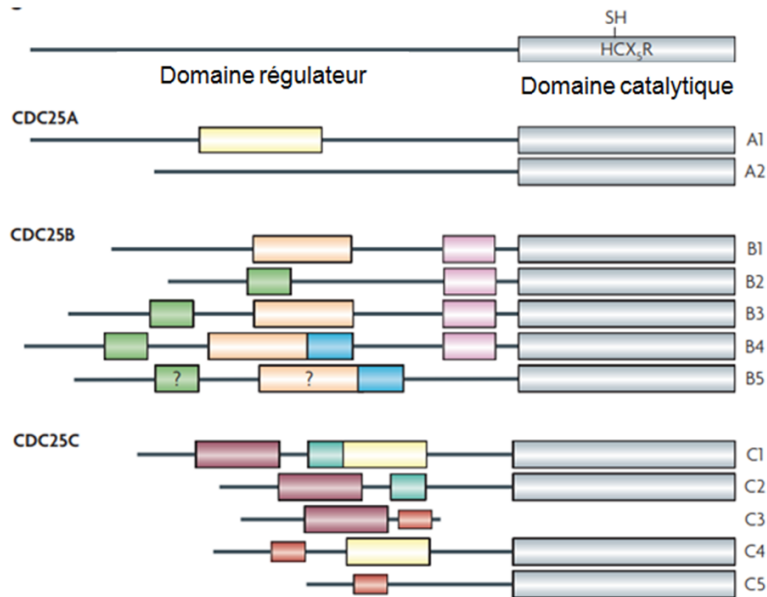


Figure 19. Variants d'épissage des CDC25

Le domaine régulateur N-terminal des CDC25 est sujet à un épissage alternatif permettant de générer plusieurs isoformes de ces protéines. ? : Domaines dont la présence reste à confirmer. Traduit de Boutros et al, 2007.

L'ARNm de CDC25A peut également être régulé par plusieurs micro-ARN (miARN ou miR, petits ARN possédant des séquences d'interactions avec certains ARNm, l'interaction d'un miARN avec une de ces cibles empêche sa traduction, et peut amener à sa dégradation). On peut tout d'abord citer les miRNA de la famille 15/16, des suppresseurs de tumeur connus pour cibler des gènes impliqués dans la transition G1/S, qui ont été identifiés comme régulateurs négatifs de CDC25A dans un modèle animal de maladie rénale polykystique (Lee et al, 2008), et dans des cellules HeLa en réponse aux UV (Pothof et al, 2009). On peut également mentionner comme régulateurs de CDC25A dans un contexte oncogénique ou de stress cellulaire : la famille Let-7 (Johnson et al, 2007, Zhu et al, 2015), le miR-21 en réponse aux radiations ionisantes, causant un arrêt du cycle (Li et al, Juillet 2011) ainsi qu'en réponse à l'hypoxie (de Oliveira, 2009), le miR-125b dans un modèle de gliome où il cible également CDK6 (Shi et al, 2010), et le miR-99a dans un contexte de cancer du sein (Qin et al, 2019). Une liste exhaustive des miR connus pour cibler l'ARNm de CDC25A est présentée dans le tableau 10, et de nombreux sont encore probablement à découvrir, car le logiciel TargetScan (Agarwal et al, 2015) prédit plus de 800 micro-ARN comme régulateurs potentiels de l'ARNm de CDC25A.

Micro-ARN	Contexte cellulaire
Let-7	Criblage dans des échantillons de rétinoblastome (Huang et al, 2007) Cancer du poumon (Johnson et al, 2007) Carcinome hépatocellulaire (Zhu et al, 2015) Carcinome ovarien (Zhang et al, 2018)
miR-449	Lignées Saos-2 (sarcome) et IMR90 (fibroblastes) (Yang et al, 2009) Lignées T24 et 5637 (cancer de la vessie) (Chen et al, 2012) Cancer de l'endomètre (Ye et al, 2014) Neuroblastome (Zhao et al, 2015) Sensibilité aux irradiations des lignées PC-3 et DU-145 (cancer de la prostate) (Mao et al, 2016) Cellules SKOV3 (cancer de l'ovaire) (Yuan et al, 2015)
miR21	Réponse des cellules HCT116 à l'hypoxie (de Oliveira et al, 2009) Réponse aux radiations ionisantes dans la lignée U251 (glioblastome) (Li et al, Juillet 2011) Infection de cellules par le cytomégalo virus congénital humain (Fu et al, 2015) Mort neuronale (Chatterjee et al, 2016) Radiorésistance dans un modèle murin (Hu et al, 2017) Néphropathie diabétique (Kölling et al, 2017)
miR-15/16	Modèle murin de maladies rénales polykystiques (Lee et al, 2008) Cellules HeLa, en réponse aux UV (Pothof et al, 2009) Spermatogenèse (Chen et al, 2019) Gliome (Krell et al, 2018)
miR-322/424 et miR-503	Différenciation des cellules musculaires (Sarkar et al, 2010) Réponse au TGF- β de cellules épithéliales mammaires (Llobet-Navas et al, 2014 et Vaiana et al, 2016)
miR-125b	Lignée U251 (gliome) (Shi et al, 2010) Etablissement d'un modèle du réseau de micro-ARN dans le rétinoblastome (Yang et al, 2015)
miR-483-3p	Cellules NHK (kératinocytes) (Bertero et al, 2013)
miR-141-3p	Différenciation des cellules mésenchymateuses en réponse à l'activation de Wnt (Qiu et al, 2014)
miR-144-5p	Cancer de la vessie (Matsushita et al, 2015)
miR-497	Chondrosarcome (Lu et al, 2016)
miR-184	Cancer du poumon non à petites cellules (Lin et al, 2015)
miR-99a-5p	Cancer du sein (lignées MCF-7 et MDA-MB-231) (Qin et al, 2019)
miR-365	Radiorésistance du cancer du poumon non à petites cellules (Li et al, 2019)

Tableau 10. Micro-ARN ciblant l'ARNm de CDC25A

En ce qui concerne la régulation de la traduction de CDC25A, peu de choses sont connues. CDC25A a été identifié dans différents travaux comme cible du facteur de traduction eIF2 α (Tomko et al, 2008, Di Fusco et al, 2017), notamment un travail de notre équipe dans un modèle de néoplasie myéloproliférative portant la substitution V617F sur la kinase JAK2 (JAK2^{V617F}) montrant que STAT5 active la traduction de CDC25A *via* eIF2 α , et que cette activation est essentielle à la prolifération des

cellules (Gautier et al, 2012). Il a également été montré que le régulateur de la méiose BOLL (Boule-Like) active la traduction de CDC25A, et que la perturbation de cette voie affecte la spermatogenèse chez l'homme (Lin et al, 2012). Enfin, un travail réalisé chez le xénope a montré la forte sensibilité de la traduction de CDC25A au niveau du facteur de traduction eif4A (Daga et al, 1999).

c) Stabilité

Le gène *CDC25A* (chromosome 3p21) code pour une protéine de 65 kiloDalton (kDa), constituée comme ses isoformes CDC25B et C d'une partie C-terminale contenant le domaine catalytique, et d'une partie N-terminale comportant de nombreux éléments de régulation (Fig. 13). Si le domaine catalytique de CDC25A est similaire à celui de ses isoformes et très conservé entre les espèces, son domaine régulateur lui est propre, et la protéine CDC25A est donc régulée de façon indépendante de CDC25B et C.

Tout comme l'expression de son ARNm, le niveau protéique de CDC25A dans la cellule est très finement régulé, et ce en fonction de la progression du cycle cellulaire. Nous avons évoqué dans le paragraphe précédent les éléments pouvant réguler la synthèse protéique de CDC25A, nous allons maintenant nous intéresser à la régulation de sa stabilité.

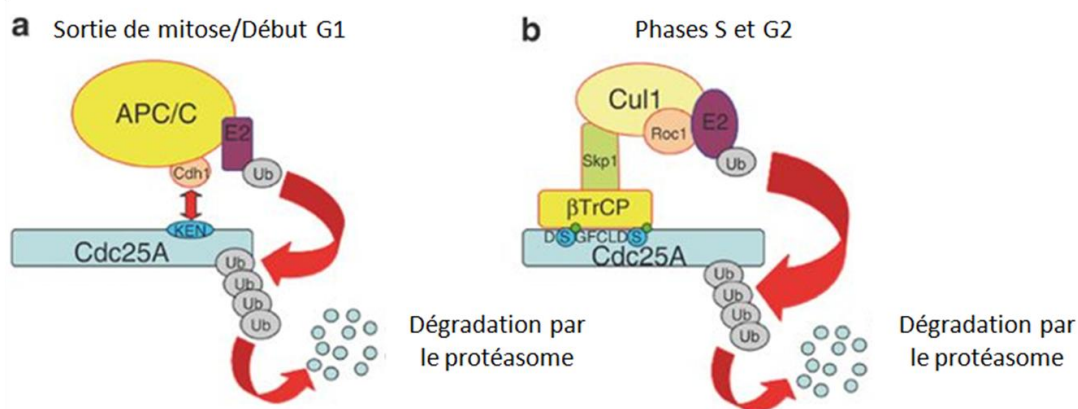


Figure 20. Dégradation de CDC25A au cours du cycle cellulaire

A. En sortie de mitose, CDC25A est dégradée par le complexe ubiquitine-ligase APC/C^{Cdh1}. **B.** Lors de l'interphase son niveau est contrôlé par le complexe ubiquitine-ligase SCF^{βTRCP} après phosphorylation de son motif phosphodegron. Traduit de Busino et al, 2004

Le niveau de CDC25A dans la cellule est régulé par la voie de dégradation ubiquitine/protéasome, et sa stabilité varie au cours du cycle cellulaire : sa demi-vie est très faible au cours de l'interphase (moins de 30 minutes), mais elle se stabilise pendant la mitose (demi-vie >2 heures). En effet, au cours de la mitose, CDC25A est phosphorylée par le complexe CDK1-Cycline B sur ses résidus sérine 17 et 115, ce qui lui permet d'échapper à la dégradation par la voie du protéasome (Mailand et al, 2002). Elle est ensuite rapidement dégradée après ubiquitination en fin de mitose et à l'entrée en phase G1. La E3 ligase responsable de l'ubiquitination de CDC25A après la mitose est l'Anaphase Promoting Complex APC/C^{Cdh1} (Donzelli et al, 2002), la dégradation de CDC25A médiée par APC/C nécessite le motif KEN Box (K₁₄₁EN₁₄₃) présent dans le domaine N-terminal de CDC25A. Durant l'interphase, l'adressage de CDC25A au protéasome est modulé par une autre E3-Ubiquitine ligase : le complexe SCF^{βTRCP} (Skp Cullin F-box β-Transducin-Repeat Containing Protein) (Busino et al, 2003) (Fig. 20). La dégradation de CDC25A en interphase est un mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN, mais également une façon d'assurer un turn-over de la protéine en conditions normales.

La liaison de SCF^{βTRCP} à CDC25A, indispensable à son ubiquitination, s'effectue au niveau du domaine DSG (phosphodegron) de CDC25A et nécessite une série de phosphorylations. La première est la phosphorylation de la ser76 par CHK1 (en phase S et G2) ou GSK3β en phase G1 et après Ser79 puis Ser82 et Ser88. Ser82 peut-être phosphosé par la kinase NEK11 (NIMA-related Kinase 11), elle-même activée par la kinase Chk1 au point de contrôle G2/M (Melixetian et al, 2009). La kinase CK1α (Caseine Kinase) peut également phosphoryler successivement les résidus Ser79 et Ser82 de CDC25A, après phosphorylation du résidu Ser76 par Chk1 (Honaker et al, 2010). Ces deux exemples laissent déjà entrevoir un rôle important de Chk1 dans la régulation de la stabilité de CDC25A en réponse aux dommages à l'ADN. En effet, Chk1 phosphoryle de nombreux résidus nécessaires à l'adressage de CDC25A au protéasome : Ser76, 123, 178, 280, et 293 (Sørensen et al, 2003). Il a par ailleurs été montré que Chk1 régule le niveau de CDC25A et sa phosphorylation dans un cycle cellulaire non perturbé par des dommages, assurant ainsi le turn-over de la protéine au long de l'interphase (Zhao et al, 2002). En cas de dommages à l'ADN, la phosphorylation sur le résidu Ser123 peut également être assurée par la kinase Chk2 après activation par ATM (Falck et al, 2001).

Dans différents contextes, d'autres kinases sont capables d'assurer les phosphorylations permettant la dégradation de CDC25A par SCF^{βTRCP}. Tout d'abord nous avons mentionné ci-dessus la kinase GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase), comme pouvant phosphoryler le résidu Ser76 en phase G1, pour ce faire elle nécessite en amont la phosphorylation sur le résidu tyrosine 80 de CDC25A, qui peut être assurée par la Polo-like kinase 3 (Plk3) (Kang et al, 2008). Dans un contexte de stress osmotique, la MAP (Mitogen-Activated Protein) kinase p38 peut phosphoryler CDC25A sur ses résidus 76 et 123 et induire sa dégradation (Goloudina et al, 2003). Notre équipe a récemment identifié le résidu Ser40 comme permettant la liaison avec SCF^{βTRCP}, lorsque Ser88 est également phosphorylé, cette phosphorylation serait assurée par le complexe CDK4-cycline D1 (Dozier et al, 2017). Enfin, un travail réalisé dans le xénope a montré une régulation de CDC25A par la voie ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase)/MAPK permettant sa dégradation par SCF^{βTRCP} (Isoda et al, 2009).

Il existe également des régulateurs positifs de la stabilité de CDC25A. Tout d'abord, CDC25A peut-être prise en charge par des enzymes de déubiquitination, ou Dub : Dub3 a été montré comme pouvant stabiliser CDC25A, et sa surexpression permet la transformation de fibroblastes murins (Pereg et al, 2010). Plus récemment, il a été montré que la Dub USP7 (Ubiquitin-Specific processing Protease 7) pouvait stabiliser CDC25A en réponse à des dommages à l'ADN dans un contexte BRCA2 muté, et que CDC25A pourrait donc jouer un rôle dans la tumorigenèse des cancers du sein mutés BRCA2 (Bizwas et al, 2018). CDC25A peut également être stabilisée par la heat-shock protein 90 (hsp90), dans un contexte de carcinome pancréatique, démontrant *in cellulo* l'intérêt de coupler un inhibiteur de hsp90 au traitement conventionnel de ces cancers, la gemcitabine, afin d'obtenir une dégradation totale de CDC25A et une meilleure inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses (Giessrigl et al, 2012). Il a été montré de façon originale en 2016 que CDC25A pouvait également être régulée par acétylation/déacétylation *via* l'acetyltransferase ARD1 (Arrest defective 1) et la déacétylase HDAC11 (Histone DeAcetylase 11). L'acétylation prolonge la demi-vie de CDC25A (mais inhibe son activité phosphatase) après dommages à l'ADN. Enfin, un travail très récent de Cheon et al a identifié la protéine du centromère CENP-W comme un régulateur positif de CDC25A *via* son action de déstabilisation du complexe SCF à la transition G2/M (Cheon et al, 2018).

d) *Activité*

Des phosphorylations/déphosphorylations sur différents résidus peuvent également moduler l'activité phosphatase de CDC25A.

Les principales modifications post-transcriptionnelles connues pour stimuler l'activité phosphatase de CDC25A sont les suivantes :

- La phosphorylation activatrice de CDC25A par CDK2 en fin de phase G1 est à l'origine d'une boucle d'amplification du signal mitogène qui permet l'entrée en phase S (Hoffman et al, 1994)
- Raf1 a été décrit comme pouvant phosphoryler et activer CDC25A dans des cellules de mammifère et de xénope (Galaktionov et al, 1995)
- La kinase Pim1 peut phosphoryler et activer CDC25A dans un contexte d'apoptose induite par c-myc (Mochizuki et al, 1999). Cette activation a également été décrite par la suite dans un contexte de mort des cellules neuronales induite par des dommages à l'ADN (Zhang et al, 2010)
- CDK5, une CDK n'intervenant a priori pas dans la progression du cycle cellulaire et impliquée dans la biologie de la maladie d'Alzheimer, a été décrite dans des cellules de cerveau de souris comme capable de phosphoryler les trois CDC25 (sur les résidus Ser40, 116 et 161 pour CDC25A), ce qui augmente leur activité (Chang et al, 2012)
- La kinase ribosomale S6 (RSK) peut phosphoryler *in vitro* les 3 isoformes de CDC25 dans une région conservée proche du NLS (Ser293 et 295 pour CDC25A). *In cellulo* les CDC25A et B sont préférentiellement phosphorylées en mitose, et la phosphorylation favorise la transition G2/M (Wu et al, 2014)
- Un travail récent de notre équipe a identifié une nouvelle phosphorylation activatrice de CDC25A, sur son résidu Ser283, catalysée en phase G2 par les complexes CDK-cycline du cycle (Mazzolini et al, 2016).

En ce qui concerne l'inhibition de CDC25A, on peut citer les trois modes de régulation suivants :

- Un des modes d'inhibition des CDC25 que nous avons cité précédemment est sa séquestration par la protéine 14-3-3 qui empêche leur interaction avec les CDK. Cette interaction peut être favorisée par la phosphorylation par Chk1 des résidus Ser178 et Thr507 de CDC25A, afin de retarder l'entrée en mitose de la cellule (Chen et al, 2003).
- Après stimulation de cellules murines par le TGF- β (Transforming Growth Factor β), la kinase p160^{ROCK} (rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase), activée par RhoA, phosphoryle CDC25A, *a priori* sur la sérine 123, pour inhiber son activité et ralentir la croissance cellulaire (Bhowmick et al, 2003).
- Enfin, CDC25A est également la cible d'autres phosphatases : les CDC14. CDC14A déphosphoryle CDC25A sur les résidus phosphorylés par CDK1/cycline B à la transition G2/M : les Ser 116 et 321 et régule donc sa stabilité (Esteban et al, 2006), mais CDC14A régule aussi indirectement la déphosphorylation de CDC25A pour moduler la transition G2/M (Vàzquez-Nouvelle et al, 2010). CDC14B quant à elle déphosphoryle directement CDC25A sur les résidus Ser88 et Ser261 pour l'inactiver et assurer le bon déroulement de la mitose (Tumurbaatar et al, 2011).

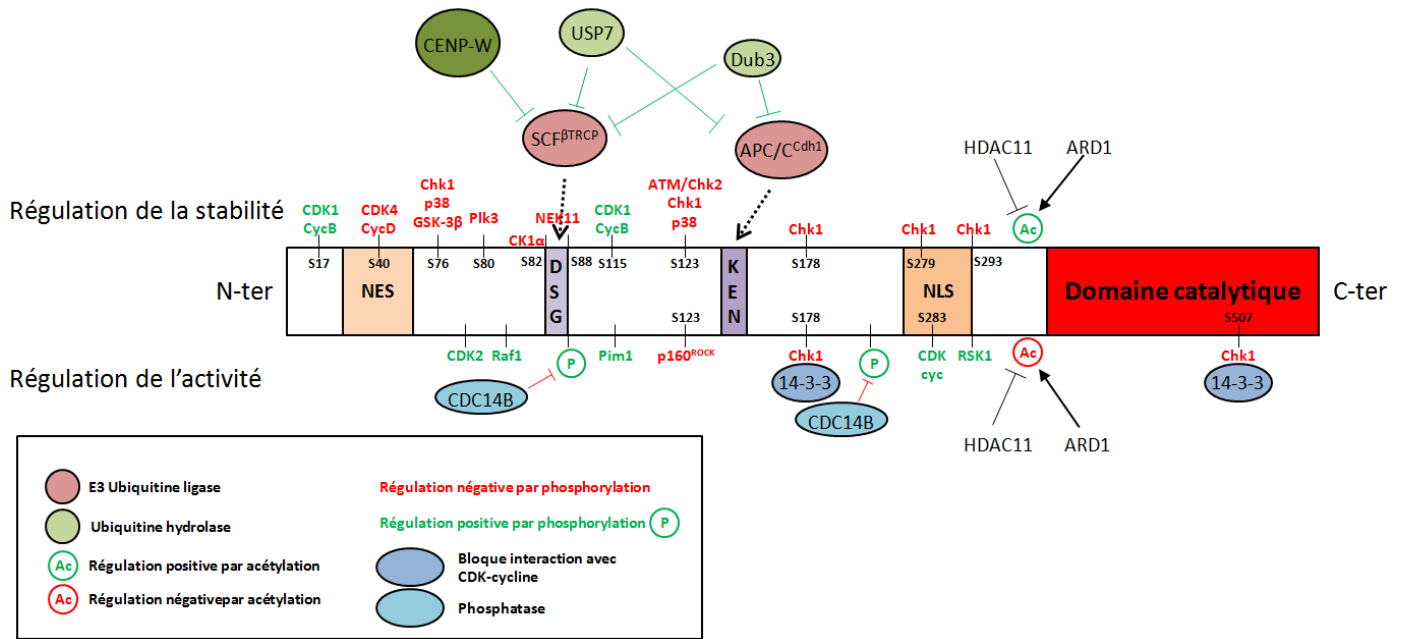


Figure 21. Résumé des acteurs connus régulant la stabilité et l'activité de CDC25A

Cyc = cycline

e) Localisation de CDC25A

Comme nous l'avons vu précédemment, CDC25A possède à la fois une séquence NES et une séquence NLS, ce qui devrait lui permettre de se localiser à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Il a d'ailleurs été montré grâce à des expériences de photoblanchiment sur des cellules exprimant une forme de CDC25A taggée par la YFP (Yellow Fluorescent Protein) que celle-ci pouvait réaliser des navettes entre les deux compartiments, de façon indépendante de l'exportine 1 (Källström et al, 2005), et sa localisation semble varier selon le type cellulaire. Tout ceci laisse à penser qu'il existe des mécanismes régulant sa localisation cellulaire, cependant la difficulté à visualiser cette protéine en microscopie limite grandement la connaissance dans ce domaine. Les seules données publiées de microscopie réalisée sur la protéine endogène montrent que la localisation de CDC25A dans des cellules murines est dépendante de l'inhibiteur du cycle p21 : l'absence de p21 favoriserait la translocation de CDC25A dans le noyau (Jaime et al, 2002).

De façon intéressante, les résultats des travaux réalisés avec des surexpressions de CDC25A semblent mettre en évidence une corrélation entre la localisation de CDC25A et son rôle dans l'apoptose. En effet, des travaux réalisés dans différents modèles montrent que la localisation cytoplasmique de CDC25A jouerait un rôle anti-apoptotique, en inhibant le facteur pro-apoptotique ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1), tandis que sa localisation nucléaire favoriserait l'apoptose en activant le facteur de transcription pro-apoptotique FKHLR1 (ForKHead in Rhabdomyosarcoma-Like1) (Leisser et al, 2004 et Al-Matoug et al, 2017). Des travaux réalisés au laboratoire ont également montré que suite à des stimuli apoptotiques non génotoxiques, CDC25A est clivée par les caspases ce qui génère une protéine nucléaire tronquée, ne possédant que la partie carboxy-terminale contenant le domaine catalytique et dont la surexpression induit l'apoptose des cellules (Mazars et al, 2009). De même, la déphosphorylation de PKM2 par CDC25A ne se fait que sur la forme nucléaire de PKM2

(Liang et al, 2016). Une meilleure compréhension des mécanismes régulant la localisation de CDC25A devraient donc permettre de mieux comprendre certaines de ses fonctions non canoniques.

E. CDC25A et cancer

a) Expression de CDC25A dans les cancers

De par leur action de promotion du cycle cellulaire, et leur rôle de pivot dans les points de contrôle du cycle, les CDC25 ont présenté d'emblée un intérêt en oncologie, et de nombreuses études se sont intéressées à leur expression dans les cancers. Des surexpressions de CDC25A et B ont été retrouvées dans de nombreux cancers (poumon, sein, rétinoblastome, prostate, ovaire, œsophage, thyroïde, larynx, estomac, foie, gliome, cancer colorectal, neuroblastome, lymphome non hodgkinien), et sont souvent associées à un mauvais pronostic (Boutros et al, 2007 et Singh et al, 2015).

Les dérégulations de l'expression de CDC25A dans les cancers ne sont *a priori* pas dues à une modification (délétion, mutation,...) de son gène, de plus on observe assez peu de corrélation entre le niveau d'ARNm et de protéine de CDC25A dans les cancers (Boutros et al, 2007). C'est donc la régulation de l'expression de la protéine qui doit être affectée, potentiellement à tous les niveaux (de la transcription du gène à la stabilité de la protéine).

Un régulateur transcriptionnel positif de CDC25A connu depuis longtemps pour ses propriétés oncogéniques est la protéine c-myc. La surexpression concomitante de c-myc et CDC25A semble d'ailleurs prédire un mauvais pronostic dans les lymphomes non-Hodgkiniens (Aref et al, 2003), et nous avons précédemment évoqué la corrélation entre l'expression de c-myc et de CDC25A dans le cancer du sein et le lymphome de Burkitt. On peut donc facilement imaginer que l'expression de CDC25A soit dérégulée lors de la transformation des cellules par c-myc.

La régulation de la stabilité de CDC25A est également impliquée dans sa surexpression dans certains cancers. Dans les cancers du sein tout d'abord, il a été montré que CDC25A avait une demi-vie plus longue dans des lignées cellulaires avec une forte expression de CDC25A, que dans des lignées cellulaires avec une expression plus faible (Llöfler et al, 2003). De plus, l'ubiquitine hydrolase Dub3, qui stabilise CDC25A par déubiquitination, a été montrée comme responsable de la surexpression de CDC25A dans des échantillons de cancer sur sein (Pereg et al, 2010), et sa surexpression est corrélée avec la surexpression de CDC25A ainsi qu'à un mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire (Zhou et al, 2015). La stabilisation de CDC25A par la Dub USP7 joue un rôle dans la survie des cellules murines BRCA2 mutées et donc la tumorigenèse dans le cancer du sein (Bizwas et al, 2018). Enfin, l'inactivation de la kinase GSK-3 β , qui phosphoryle CDC25A et ainsi la marque pour l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome, dans des tissus cancéreux est corrélée avec une surexpression de CDC25A. On peut également imaginer que les dérégulations de l'expression de Chk1 ou d'autres acteurs de la voie ATR très souvent observées dans les cancers puissent être à l'origine de modifications du niveau protéique CDC25A.

b) Rôle de CDC25A dans l'oncogénèse

Le gène *CDC25A* est considéré comme un proto-oncogène, et les dérégulations de son expression ne seraient pas simplement un symptôme de la dérégulation globale du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses, mais bien un mécanisme de transformation des cellules. Galaktionov et al ont montré en 1995 que la surexpression de CDC25A transformait des fibroblastes murins et leur permettait de former des colonies en milieu semi-solide (agar). De plus, plusieurs travaux ont montré que la

surexpression (ectopique ou non) de CDC25A accélérât l'enchaînement des phases du cycle cellulaire, en présence ou non de dommages à l'ADN (Xu et al, 2003, Timofeev et al, 2009), et promouvait l'instabilité génétique sur le long terme (Neelsen et al, 2013, Cangi et al, 2008), montrant bien que la surexpression de CDC25A peut permettre aux cellules cancéreuses d'échapper aux points de contrôle du cycle cellulaire.

Les travaux de Ray et al ont montré le potentiel oncogénique de CDC25A à l'échelle d'un organisme. Ils ont tout d'abord utilisé un modèle de souris transgénique surexprimant CDC25A de façon tissu-spécifique dans l'épithélium mammaire, et ont montré une augmentation de la prolifération des cellules mammaires, mais pas de transformation ni de tumorigenèse. En revanche, dans des souris surexprimant à la fois CDC25A et un oncogène (Ras ou Neu), CDC25A accélère la tumorigenèse mammaire chez les souris (Ray et al, Février 2007). Dans l'article « réciproque », ils ont établi une lignée de souris hétérozygotes pour CDC25A et ont montré à la fois *in vivo* et *in vitro* (sur des fibroblastes issus de leurs souris), que la diminution du niveau de CDC25A causée par l'hétérozygotie rend les cellules résistantes à la transformation induite par l'oncogène Ras (Ray et al, Juillet 2007). Ces travaux illustrent donc l'importance du niveau d'expression de CDC25A dans les mécanismes de transformation cellulaire.

Par ailleurs, une autre fonction plus étonnante de CDC25A dans la progression du cancer du sein a été plusieurs fois décrite. Des travaux ont en effet suggéré un rôle pour CDC25A dans l'invasion cellulaire dans des modèles de cancer du poumon (He et al, 2005) et du foie (Ray et al, Février 2007, Xu et al, 2008), sans toutefois proposer de mécanisme derrière cette nouvelle fonction. En 2011, Feng et al ont montré que CDC25A régule indirectement la transcription de la métalloprotéase MMP1, une protéine capable de dégrader la matrice extra-cellulaire et donc de permettre aux cellules métastatiques d'envahir les tissus voisins. Ils ont démontré *in vitro* et *in vivo* que le niveau de CDC25A corrélait positivement avec la capacité des cellules tumorales mammaires à réaliser des métastases, et que son invalidation empêchait la formation de ces métastases ; CDC25A est d'ailleurs généralement surexprimée dans les cancers du sein, et une forte expression est associée à un phénotype très invasif (Feng et al, 2011). Dans le cancer de l'endomètre, il a été montré cette année que la surexpression de CDC25A favorise la croissance tumorale et l'invasion *via* l'activation de la voie Notch (Chen et al, Février 2019).

CDC25A semble donc être impliquée dans de nombreux phénomènes essentiels à la tumorigenèse, dont la prolifération cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN, mais également la capacité d'invasion des cellules.

c) Inhibition pharmacologique de CDC25A en cancérologie

La dérégulation du cycle cellulaire et le contournement de ses points de contrôle sont des caractéristiques majeures de toutes les cellules cancéreuses. Aussi, la grande majorité des acteurs du cycle et de la réponse aux dommages à l'ADN ont fait l'objet de développement d'inhibiteurs pharmacologiques dans l'espoir de pouvoir cibler ces cellules à la prolifération anormale. Parmi les inhibiteurs dont le développement a le plus abouti, on peut citer le Palbociclib, un inhibiteur de CDK4 et CDK6, deux substrats déphosphorylés spécifiquement par CDC25A –mais pas CDC25B ni C, qui a reçu l'AMM pour le traitement de certains cancers du sein (HR+ HER2- de stade avancé ou

métastatique), et est actuellement testé en phase I/II dans les LAM portant un réarrangement du gène MLL (NCT03844997).

Au vu de l'importance de CDC25A démontrée dans différents modèles de cancers, et de sa position idéale au cœur des mécanismes de régulation du cycle et de la réponse aux dommages à l'ADN, elle représente une cible thérapeutique très intéressante, et de nombreux inhibiteurs ont été développés. Ces inhibiteurs ne ciblent pas spécifiquement CDC25A mais les trois isoformes de CDC25. Il en existe plusieurs catégories, les inhibiteurs les plus actifs appartenant à la famille des quinones. Les inhibiteurs de type quinone ciblent les 3 phosphatases sans spécificité particulière pour un isoforme, très probablement en oxydant le résidu cystéine du site catalytique grâce à des ROS (Reactive Oxygen Species). Les plus efficaces de ces inhibiteurs ainsi que leur structure sont présentés figure 22.

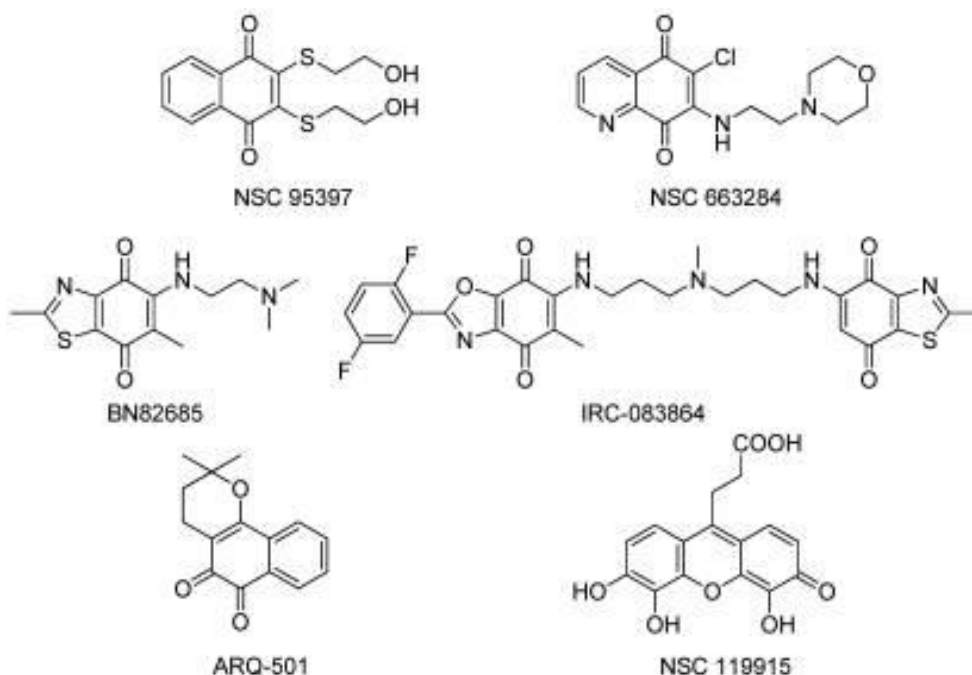


Figure 22. Structure des inhibiteurs de CDC25 de type quinone les plus puissants.

Issu de Brenner, 2014

Plusieurs de ces inhibiteurs ont montré une efficacité *in vitro* et *in vivo* pour réduire la prolifération des cellules cancéreuses (Cazales et al, 2007, Guo et al, 2007), mais le plus puissant est l'IRC-083864 (IRC) avec une IC50 de 20nM. L'IRC inhibe la prolifération de nombreuses lignées cancéreuses, dont certaines résistantes aux chimiothérapies, ainsi que la croissance tumorale dans des modèles de xénotransplante sur souris *nude* (Brezak et al, 2009). Son aspect prometteur a conduit à son acquisition par le groupe pharmaceutique Debio en 2009, et il est entré en essai clinique de phase II sous le nom de Debio 0931. Cependant l'essai n'a jamais abouti et aucun résultat n'a été publié, il n'y a pas eu d'autres essais depuis (Ferrari et Gentili, 2016), probablement en raison d'un excès de toxicité.

L'IRC reste à ce jour l'inhibiteur avec le plus de potentiel pour cibler les CDC25, mais l'enthousiasme autour de CDC25A comme cible thérapeutique s'est quelque peu essouffé ces dernières années. Il faut savoir qu'il est compliqué de cibler de façon spécifique les phosphatases, à cause du caractère très conservé de la structure de leur site actif (Lavecchia et al, 2010), et d'autant plus les CDC25 qui ont un site actif particulièrement plat avec une surface d'interaction très large (Brenner et al, 2014).

Des approches alternatives aux inhibiteurs pharmacologiques commencent à se développer, c'est notamment le cas des oligonucléotides antisens qui commencent à être élaborés avec pour objectif leur utilisation en clinique (Juliano, 2016), on pourrait imaginer que cette méthode (qui invalide génétiquement l'expression d'une protéine) pourrait permettre de cibler spécifiquement les trois isoformes CDC25 et de limiter les toxicités. Cependant à l'heure actuelle il n'y a pas d'oligonucléotide antisens disponible pour cibler CDC25A (ou n'importe quelle autre protéine) en clinique, et il reste donc crucial de continuer de décrypter les voies par lesquelles CDC25A participe à la tumorigenèse afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

F. CDC25A dans l'hématopoïèse normale et leucémique

Plusieurs travaux ont montré l'importance de différents acteurs du cycle dans le bon déroulement de l'hématopoïèse (Steinman, 2002, Hao et al, 2016). Il existe cependant très peu de données sur le rôle de CDC25A ou son expression dans l'hématopoïèse, avec seulement un travail montrant l'importance de sa régulation pour un bon déroulement de l'érythropoïèse (Melkun et al, 2002).

Plus d'intérêt a revanche été porté à CDC25A dans le contexte des hémopathies malignes. Tout d'abord, un travail de notre équipe a montré la surexpression de CDC25A en aval de tyrosine kinases mutées dans plusieurs hémopathies malignes : NPM-ALK dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules, BCR-ABL dans les leucémies myéloïdes chroniques et le récepteur tyrosine kinase FLT3 muté (FLT3-ITD) dans les leucémies aiguës myéloïdes (Fernandez-Vidal et al, 2009). Par ailleurs, CDC25A est surexprimée dans les syndromes myéloprolifératifs exprimant la kinase mutée JAK2^{V617F}, et son inhibition réduit la prolifération et le potentiel clonogénique des lignées cellulaires et échantillons primaires JAK2^{V617F} (Gautier et al, 2012). Dans les LAM, notre équipe a montré que l'expression de CDC25A était régulée positivement par l'adhésion des cellules leucémiques à la MEC (plus précisément à la fibronectine, qui est une des molécules les plus représentées dans la MEC de la niche hématopoïétique), et c'est cette hausse du niveau de CDC25A qui est responsable de l'accélération de prolifération observée chez les cellules leucémiques en condition d'adhésion par rapport aux cellules en suspension (Fernandez-Vidal et al, 2006). Plusieurs travaux se sont intéressés aux effets de l'inhibition de CDC25A dans les LAM (Brenner et al, 2014), et le plus récent en date a montré une grande hétérogénéité dans la réponse de blastes dérivés d'échantillons primaires à l'inhibition des CDC25 (Brenner et al, 2017). L'an dernier, un travail s'intéressant à la protéine neuronale à domaine PAS 2 (NPAS2) a décrit sa surexpression dans les LAM ainsi que son importance pour la prolifération des cellules leucémiques, et a montré que CDC25A était un des acteurs responsable de la prolifération cellulaire en aval de NPAS2 (Song et al, 2018).

Enfin, un travail de notre équipe résumé dans la figure 23 a montré l'importance capitale de CDC25A dans les LAM portant la mutation FLT3-ITD (Bertoli et al, 2015). En effet, l'expression de CDC25A est régulée par le récepteur muté, et ce de façon très précoce, indiquant qu'il ne s'agit pas d'un effet indirect causé par l'état du cycle cellulaire. De plus, l'inhibition pharmacologique ou l'inactivation de CDC25A dans des lignées leucémiques FLT3-ITD ou des échantillons primaires de patients portant cette mutation permet de stopper la prolifération des cellules leucémique, et d'induire leur différenciation dans la voie monocytaire. Ces résultats font de CDC25A une cible thérapeutique potentielle particulièrement intéressante dans les LAM FLT3-ITD, d'autant plus que le Docteur Bertoli a suggéré lors de son travail de thèse un potentiel impact du niveau d'ARNm CDC25A sur la survie

dans les LAM FLT3-ITD sur une cohorte de 180 patients toulousains traités par chimiothérapie intensive (Fig. 24).

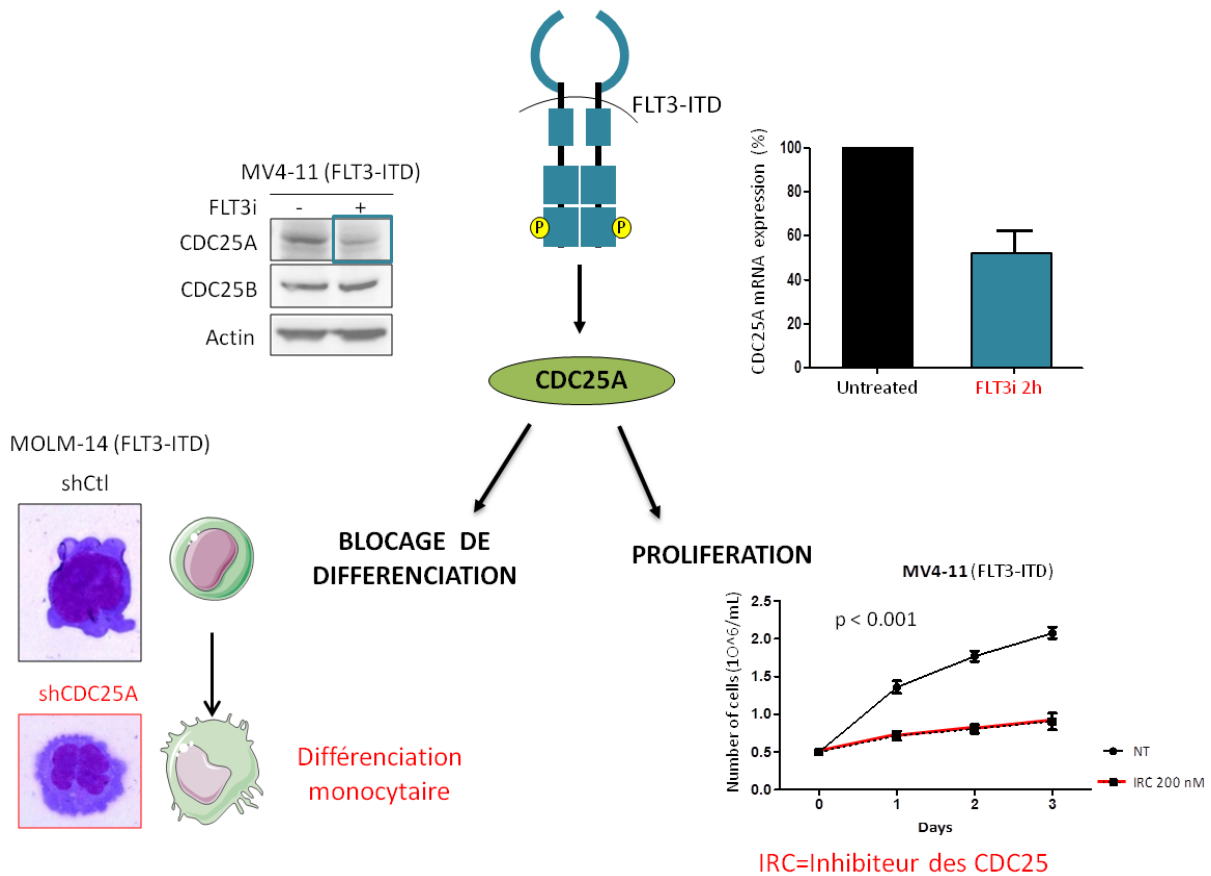


Figure 23. Résultats précédents de l'équipe (Bertoli et al, 2015).

L'expression de CDC25A est contrôlée de façon précoce par FLT3-ITD au niveau de la protéine et de l'ARNm.

L'inhibition ou l'inactivation génétique de CDC25A permet un arrêt de prolifération des cellules leucémiques FLT3-ITD ainsi que leur différenciation dans la voie monocytaire.

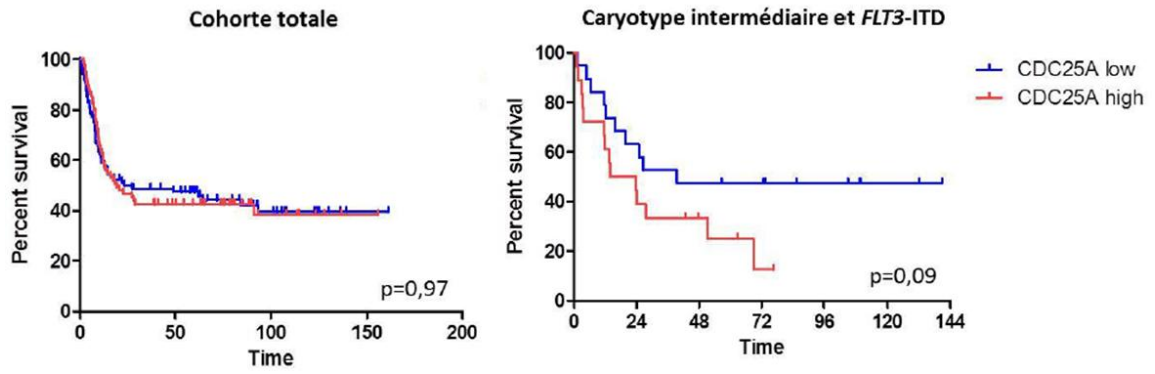


Figure 24. Survie globale en fonction de l'expression de CDC25A (S. Bertoli)

Analyse de la survie globale des patients de notre cohorte par la méthode de Kaplan-Meier et comparaison en fonction de l'expression de CDC25A (ARN) selon le test du log-rank. Le temps (time) est exprimé en mois.

IV. Le micro-ARN 16

Comme nous le verrons dans la partie Résultats de cette thèse, nous avons identifié le micro-ARN-16 comme régulateur essentiel de CDC25A dans notre modèle. Nous allons donc ici présenter de façon très générale la biologie des micro-ARN, puis le micro-ARN-16 et ses fonctions de suppresseur de tumeur.

A. Les micro-ARN

Au-delà des gènes transcrits en ARN messagers eux même traduits en protéines, de nombreuses régions du génome sont transcrites pour donner des ARN dits « non codants », c'est à dire non traduits en protéines. Parmi les petits ARN non codants, on retrouve les micro-ARN (miARN ou miR), de petits ARN simple brin d'une vingtaine de nucléotides qui régulent l'expression de certaines protéines dans les cellules eucaryotes.

Le premier micro-ARN identifié a été découvert en 1983 chez *C. elegans* : il s'agit d'un micro-ARN encodé au locus *LIN-4*, et régulant négativement l'expression de la protéine Lin-14 par complémentarité avec son ARNm, cette régulation est essentielle au développement larvaire du nématode (Lee et al, 1993). Depuis cette découverte, plus de 2600 micro-ARN ont été annotés chez l'homme d'après la base de données miRBase (Kozomara et al, 2019).

a) *Transcription des micro-ARN*

La grande majorité des miR est transcrite comme les ARNm par l'ARN Polymérase II (Pol II) (Lee et al, 2004), mais certains situés au sein de régions riches en séquences répétées de type Alu peuvent être transcrits par l'ARN Polymérase III (Pol III) (Borchert et al, 2006).

Les séquences codant pour les miR peuvent avoir différentes localisations au sein du génome. La majorité des miR sont situés dans les séquences introniques d'unités transcriptionnelles (TU) codant ou non pour une protéine (Rodriguez et al, 2004). On peut également les retrouver dans les exons de séquences non codantes, ou plus rarement de séquences codantes (Kim et al, 2009). Les unités transcriptionnelles contenant les séquences des miR peuvent être monocistroniques ou polycistroniques, c'est à dire contenir la séquence d'un ou plusieurs micro-ARN. La majorité des miR sont regroupés dans des TU polycistroniques, on parle alors de cluster (Yu et al, 2006) ; les miR retrouvés au sein d'un même cluster partagent généralement une homologie de séquence, probablement due à la duplication et l'évolution d'une séquence, on parle alors de séquences paralogues (Yu et al, 2006). Des séquences paralogues peuvent également être retrouvées dans des clusters différents. Les miR situés au sein d'une TU codante dépendent de l'activité du promoteur de cette TU pour leur expression. En revanche, pour les autres miRs, dits intergéniques, la compréhension des mécanismes régulant leur transcription passe par l'identification du promoteur de ces TU intergéniques. Plusieurs méthodes ont été mises au point au cours des années pour prédire la séquence de ces promoteurs, en se basant sur des techniques de séquençage ou l'étude de marqueurs chromatinien tels que les modifications d'histones, et ont permis de commencer à annoter les promoteurs des miR ou des clusters de miR intergéniques. Cependant, ces prédictions manquent encore de vérification expérimentale, et de nombreux promoteurs restent encore à identifier (Zhao et al, 2017).

La transcription d'une TU codant pour un ou plusieurs miR va générer un long transcrit appelé le pri-miR (primary micro-RNA), qui va ensuite être pris en charge par différents complexes pour obtenir la séquence mature du micro-ARN.

b) *La voie canonique de maturation des micro-ARN*



Figure 26. Représentation schématique de l'unité transcriptionnelle monocistronique de micro-ARN

Une unité transcriptionnelle de miR contient deux séquences de miR mature complémentaires : le brin 5p et le brin 3p.

Une TU monocistronique va en réalité pouvoir générer deux miR matures : elle contient deux séquences complémentaires appelées 5p et 3p (5p pour la séquence côté 5' de la TU, 3p pour la séquence côté 3') séparées par plusieurs nucléotides (Figure 25), Le pri-miR obtenu après transcription est donc un long ARN simple brin contenant une (ou plusieurs dans le cas d'une TU polycistronique) structure tige-boucle générée par la complémentarité entre les séquences 5p et 3p. Ce pri-miR va être pris en charge dans le noyau par le complexe « microprocesseur » pour cliver les régions simple brin flanquant la structure en tige-boucle, et générer ainsi un miR précurseur, ou pré-miR. Ce complexe est constitué de la RBP (RNA Binding Protein) DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) qui va lier le pri-miR, et de la ribonucléase Drosha, responsable du clivage (Denli et al, 2004).

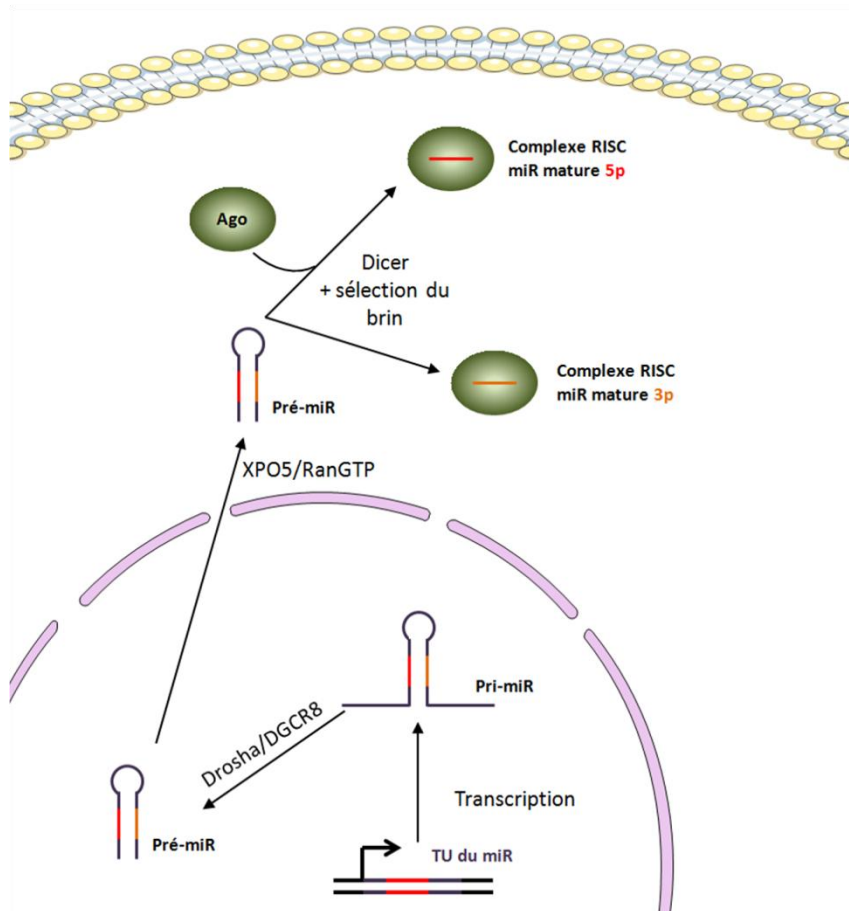


Figure 25. Etapes du processus de maturation d'un micro-ARN.

Après sa transcription, le pri-miR est clivé en pré-miR. Ce pré-miR est exporté dans le cytoplasme pour une deuxième étape de clivage, suivie de la prise en charge du miR par les protéines Argonautes (Ago). Inspiré de O'Brien et al, 2018

Le pré-miR va ensuite être exporté du noyau grâce à un complexe Exportine 5 (XPO5)/RanGTP, pour subir un dernier clivage dans le cytoplasme (Kim, 2004). La RNase/endonucléase Dicer va cliver la boucle du pré-miR, donnant un complexe double brin de deux miR matures potentiels. Le duplex va ensuite être pris en charge par les protéines de la famille Argonaute (AGO 1 à 4), pour former le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Au sein de ce complexe, le duplex va être séparé et un des deux brins (le brin « passager ») va être dégradé, tandis que l'autre brin, toujours au sein du complexe RISC, va pouvoir aller réguler l'expression de ses cibles (O'Brien et al, 2018). La sélection du brin ne se fait pas au hasard et est biaisée par les propriétés thermodynamiques de chaque brin (Khvorova et al, 2003). Un schéma résumant les étapes de maturation des micro-ARN est proposé figure 26.

c) Mécanismes de la régulation de l'expression protéique par les micro-ARN

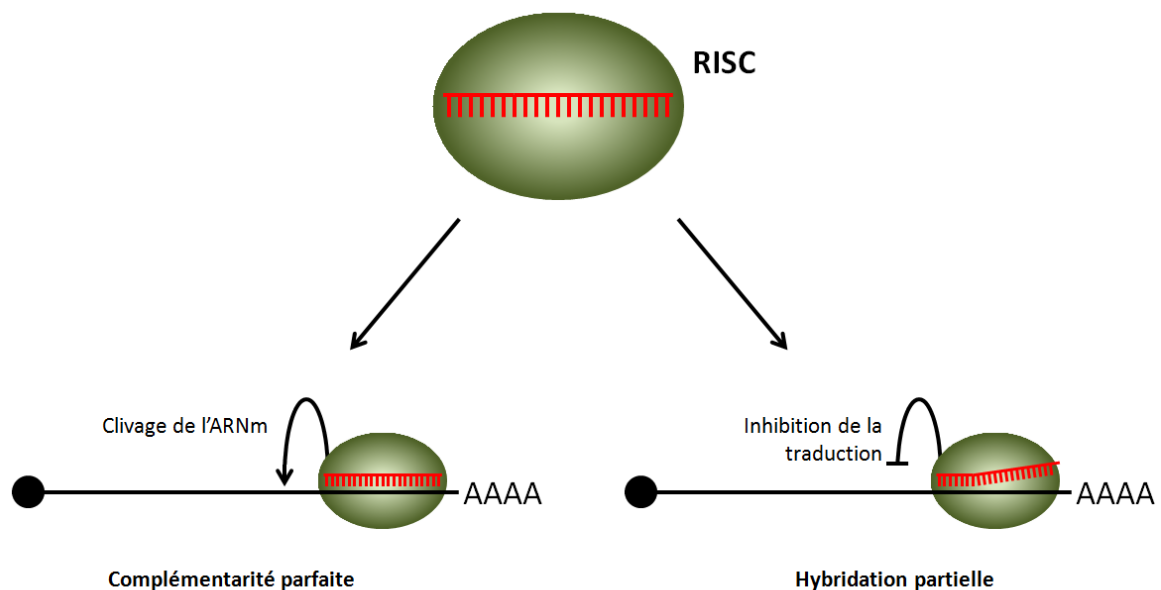


Figure 27. Inhibition de l'expression des ARNm cibles par le micro-ARN

Selon le niveau de complémentarité entre la séquence du miR mature et celle de l'ARNm cible, l'interaction du miR avec sa cible va induire soit son clivage (gauche) soit l'inhibition de sa traduction (droite).

Les micro-ARN régulent l'expression de leurs ARNm cible grâce à une complémentarité entre leur séquence et des séquences généralement situées région 3'-UTR (région 3' non traduite) des ARNm (on les retrouve plus rarement en 5'-UTR et dans la séquence codante). L'adressage du miR à sa cible se fait grâce à sa séquence seed : une séquence de 7 nucléotides située en 5' et dont la séquence complémentaire se trouve dans les éléments de réponse aux miR (MRE) de la région 3'-UTR de sa cible. Après liaison de la séquence seed sur l'ARNm, c'est l'hybridation du reste du miR qui va déterminer la méthode d'inhibition de l'expression du messager cible : si l'hybridation se fait entièrement, la protéine AGO2 va cliver l'ARNm et amener à sa dégradation (Jo et al, 2015), en revanche si l'hybridation n'est que partielle, d'autres protéines vont être recrutées au niveau du complexe RISC pour i) inhiber la traduction en déstabilisant l'interaction du messager avec la Poly(A) Binding Protein et ii) favoriser à long terme la dégradation du messager en éliminant la coiffe en 5' (O'Brien et al, 2018) (Figure 27).

Par ailleurs, au delà du rôle « classique » des miR dans la régulation de l'expression protéique, des travaux suggèrent désormais un rôle possible pour les miR ou d'autres acteurs de l'interférence à

l'ARN dans la régulation de la transcription (Salmanidis et al, 2014), ainsi que dans l'activation de la traduction (Ørom et al, 2008 et Truesdell et al, 2012).

B. Micro-ARN et cancer

Des modèles prédictifs visant à identifier les cibles des miR parmi le génome humain estiment à plus de 90% la part des ARNm dont l'expression est sous le contrôle des miR. Le transcriptome des miR peut donc dramatiquement influencer le protéome des cellules, et à ce titre il semble pertinent de s'intéresser à l'expression et aux fonctions des miR dans le contexte de la transformation des cellules.

a) Dérégulation de l'expression des micro-ARN dans les cancers

Un des premiers travaux à s'intéresser à l'expression des micro-ARN dans les cancers par rapport aux tissus sains a montré une dérégulation de l'expression des miR dans les cancers (Lu et al, 2005). Plus précisément, l'expression des miR est globalement diminuée dans les cancers par rapport aux tissus sains, et une faible expression des miR semble corrélée à un stade de différenciation très peu avancé.

Une première explication pour la variation globale du profil d'expression des miR dans les cancers peut être la dérégulation des acteurs de la biogenèse des miR. En effet, l'utilisation de plusieurs modèles murins a permis de montrer que l'haploinsuffisance du gène codant pour l'endonucléase Dicer favorise la tumorigenèse *in vivo* (Kumar et al, 2009 et Lambertz et al, 2011), et l'inactivation génétique *in cellulo* de Droscha, DGCR8, ou Dicer, et donc le dysfonctionnement du processus de maturation des miR, favorise la prolifération de lignées cancéreuses ainsi que leur capacité à générer un cancer chez la souris (Kumar et al, 2007). De plus, des dérégulations de l'expression des différents acteurs de la voie de maturation des miR ont été rapportées dans de nombreux cancers, souvent associées à un mauvais pronostic, et générant dans les cancers un profil de microARN altéré (AMP) (Hata et Kashima, 2016).

Cependant, au-delà des variations d'expression retrouvées entre tissu cancéreux et tissu sain, on retrouve également des profils d'expression des miR différents entre les cancers, et même entre des cancers similaires avec un profil de mutations différent (Lu et al, 2005). L'expression de chaque miR doit donc pouvoir être modulée dans les cancers.

Le premier lien établi entre la dérégulation de l'expression d'un miR et l'établissement d'un cancer s'est fait dans la leucémie lymphoïde chronique de type B (LLC-B), une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération anormale des lymphocytes B : un cluster contenant les micro-ARN 15a et 16-1 a été identifié dans une région chromosomique délétée dans la majorité des cas de LLC-B (13q14), et l'expression de ces deux miR est très souvent diminuée chez les patients présentant cette délétion (Calin et al, 2002). Des anomalies chromosomiques affectant les régions codant pour les miR pourraient donc expliquer leurs variations d'expression dans les cancers. En concordance avec cette hypothèse, Calin et al ont montré en 2004 qu'une majorité des régions codant pour les miR étaient localisées dans des régions chromosomiques considérées comme fragiles ou souvent modifiées (perte d'hétérozygotie, amplification, cassure) dans les cancers (Calin et al, 2004). Par la suite, plusieurs travaux ont effectivement montré la modification de régions codant pour des miR dans différents cancers (Zhang et al, 2007, Williams et al, 2017).

L'expression des miR dont la séquence est intacte peut également être modulée par des facteurs de transcription ou des modifications épigénétiques. Un des principaux facteurs de transcription décrit comme essentiel dans la régulation des miR est le suppresseur de tumeur p53, qui peut inhiber ou

favoriser la transcription de plusieurs miR (Pichiori et al, 2010 et Fletcher-Jones et Ashish, 2012). P53 étant un suppresseur de tumeur très souvent délété ou inactivé dans les cancers, ce qui peut affecter l'expression de ses cibles, dont les miR. La variation d'expression des miR cibles de p53 est notamment un aspect essentiel de la biologie du myélome multiple (Abdi et al, 2017). L'oncogène c-myc peut également réguler la transcription de plusieurs miR (Jackstadt et Hermeking, 2015). Enfin, Saito et al ont montré en 2006 que l'expression de certains miR pouvait être affectée par un traitement par des agents déméthylants (Saito et al, 2006), et par la suite les modifications épigénétiques ont été montrées comme pouvant contribuer à la variation de l'expression des miR dans les cancers, et par conséquent à leur rôle dans la tumorigenèse et la progression de la maladie (Lujambio et al, 2008, Donzelli et al, 2015, Chang et al, 2011).

b) Rôle des micro-ARN dans la tumorigenèse

Nous avons vu que l'expression des miR est globalement diminuée dans les cancers, ce qui semblerait indiquer un rôle de suppresseur de tumeur pour les miR. Cependant, ce propos a été nuancé au cours des années, avec plusieurs éléments de la littérature montrant au contraire la surexpression de certains miR dans les cancers, et leur rôle pro-tumoral (Zhang et al, 2007). On distingue donc désormais les miR suppresseurs de tumeur et les miR oncogéniques ou oncomiR, et nous allons ici présenter certains des miR les mieux décrits de chaque catégorie, ainsi que leurs rôles dans le développement et la progression des cancers.

Comme nous l'avons vu précédemment, le premier travail montrant un lien entre micro-ARN et cancer concernait les miR15a/16-1, qui ont par la suite été établis comme des miR suppresseurs de tumeur ; la partie IV. C de cette introduction leur sera consacrée, aussi nous n'allons pas ici détailler leurs fonctions. Une autre famille de miR dont les fonctions de suppression de tumeur ont été abondamment décrites est la famille Let-7 : l'inhibition de ces miR *in vivo* favorise la tumorigenèse dans un modèle murin de cancer du poumon, alors que leur surexpression inhibe la progression du cancer du poumon après xénogreffe (Trang et al, 2010) ; par ailleurs, une faible expression de Let-7 est associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer du poumon (Takamizawa et al, 2004). Parmi les cibles de Let-7 pouvant expliquer son rôle de suppresseur de tumeur, on peut citer les régulateurs positifs du cycle cellulaire CDC25A et CDK6 (Yang et al, 2015), ainsi que les oncogènes Ras et Myc (Sampson et al, 2007, Johnson et al, 2005).

Parmi les oncomiR, le miR-155 a montré un rôle oncogénique dans de nombreux cancers (Svoronov et al, 2016). La surexpression du miR-155 dans les tissus lymphoïdes induit chez la souris l'apparition d'un lymphome qui peut être éradiqué en inhibant l'expression du miR155 (Babar et al, 2012). Un rôle pour le miR-155 dans la transformation des cellules par le récepteur muté FLT3-ITD sera également décrit plus loin dans cette introduction. En ce qui concerne les tumeurs solides, le miR-155 favorise la résistance à la chimiothérapie dans le cancer du sein et du poumon (Yu et al, 2015, Van Roosbroek et al, 2017), et induit du stress oxydatif en aval de Ras dans le cancer du pancréas (Wang et al, 2015). Un rôle dans l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse a également été décrit pour le miR-155 dans le cancer du sein (Kong et al, 2014 et Johansson et al, 2013). Le miR-21, surexprimé dans de nombreux cancers (Feng et Tsao, 2016), joue également un rôle pro-tumoral : plusieurs de ses cibles sont des suppresseurs de tumeur connus (tels que PTEN ou les antagonistes de Ras Spry 1 et 2), et sa surexpression conditionnelle chez la souris induit l'apparition d'un lymphome (Medina et al, 2010). De plus, miR21 promeut le potentiel d'invasion des

cellules cancéreuses (Gabriely et al, 2008, Zhu et al, 2008), et la résistance à la chimiothérapie (Feng et Tsao, 2016).

Cependant, chaque miR possédant un éventail très large de cibles potentielles, il arrive qu'un miR puisse selon le contexte cellulaire jouer un rôle pro ou anti-tumoral. C'est notamment le cas du miR-125b, qui favorise le blocage de différenciation dans les LAM ainsi que le développement de la maladie *in vivo* (Liu et al, 2017, Hu et al, Juillet 2017), mais inhibe la progression du glioblastome en ciblant CDC25A et CDK6 (Shi et al, 2010). Le miR-155 peut également selon le contexte jouer un rôle de tumeur suppresseur, par exemple en ciblant la cycline D1 dans le cancer de l'ovaire, ou l'oncogène SKI dans le mélanome (Svoronos et al, 2016). Le contexte cellulaire semble donc crucial pour déterminer la fonction d'un miR, et une identification la plus exhaustive possible des cibles de chaque miR pourra permettre de prédire leur rôle dans les différents cancers.

c) *Les micro-ARN en clinique*

Les rôles que nous venons de décrire pour les miR dans la progression du cancer et la résistance au traitement, ou au contraire dans la suppression de tumeur, ainsi que leur capacité à cibler tout un réseau de protéines en font des cibles ou des outils thérapeutiques au potentiel très intéressant (Ivkovic et al, 2017). De nombreuses études ont tenté de mettre au point des systèmes permettant d'administrer *in vivo* des mimics (miR de synthèse permettant par exemple la surexpression d'un miR suppresseur de tumeur) ou des anti-miR (séquences d'ARN complémentaires du miR à inhiber) de façon ciblée et stable (l'ARN étant très sensible aux nucléases) (Drusco et Croce, 2017). A ce jour, le seul essai clinique enregistré pour un mimic est le MIRX34, un mimic du miR-34 administré grâce à une particule liposomale chez des patients atteints de différents cancers, la phase I a été menée à bout mais n'a jamais conduit à une phase II à cause de toxicités trop importantes (NCT01829971). Le seul essai clinique toujours actuellement en cours est une phase I testant la toxicité d'un anti-miR-155, le MRG-106, chez les patients atteints de plusieurs hémopathies malignes (NCT02580552), mais il y a encore bien du chemin à parcourir pour que les micro-ARN puissent un jour être utilisés comme outils thérapeutiques.

Un autre rôle potentiel pour les micro-ARN en oncologie est celle de biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi de la réponse au traitement. Ce rôle est rendu possible par la découverte en 2008 de la présence de miR exprimés dans le sang et résistants à la dégradation par les RNase chez des patients ou des sujets sains, avec des profils d'expression reproductibles et différents entre les sujets sains et les patients atteints de cancer du poumon (Chen et al, 2008). Ces miR circulants représenteraient des marqueurs cliniques particulièrement intéressants dans la mesure où ils peuvent être détectés grâce à une simple prise de sang, peu invasive et contraignante pour les patients. Dans le cancer du poumon, une signature de 13 miR circulants a été validée sur une large cohorte de patients comme pouvant permettre la détection de la maladie chez les individus à haut risque (Montani et al, 2015). Des études ont également été menées dans d'autres tumeurs solides : cancer du sein, de la prostate, et cancer colorectal, pour déterminer des signatures caractéristiques permettant un diagnostic plus précoce (Gai et Wang, 2016). Au-delà du diagnostic, les miR circulants pourraient également permettre de déterminer le grade de la maladie, ainsi que faire office de biomarqueurs pour déterminer un pronostic et prédire la réponse au traitement anti-cancéreux (Hamam et al, 2017).

d) *Micro-ARN et LAM*

Au vu du rôle essentiel des miR dans les cancers révélé ces dernières années, il est tout naturel de s'intéresser à l'expression et à la fonction des miR dans la LAM. De nombreuses études ont montré des dérégulations de l'expression de micro-ARN dans différents sous-types de LAM, et nous avons résumé dans le tableau 11 les miR pour lesquels des données cliniques indiquent une variation significative de leur expression, et le rôle dans la leucémogénèse ou l'impact sur le pronostic est connu. Il est très intéressant de constater qu'un même miR peut avoir des rôles opposés (oncomiR ou suppresseur de tumeur) selon le sous-type de leucémie étudié. On peut ici prendre en exemple le miR-22, qui est surexprimé dans les syndromes myélodysplasiques et les LAM qui en découlent, et joue le rôle d'oncogène dans ces maladies, alors que son expression est diminuée dans les LAM *de novo*, où sa réexpression inhibe la prolifération des cellules leucémiques et favorise la différenciation (Wallace et O'Connell, 2017). Le miR-9 peut également être surexprimé ou sous-exprimé selon les sous-types de LAM, ce qui se traduit respectivement par un rôle d'oncomiR ou de suppresseur de tumeur.

Cependant, un rôle ambivalent des miR dans les LAM peut aussi être retrouvé pour ceux dont les variations connues d'expression ne vont que dans un sens. Par exemple, le miR-126, connu pour être surexprimé dans plusieurs modèles de LAM, semble jouer un double rôle dans la leucémogénèse, car tant sa surexpression que son invalidation chez la souris peuvent favoriser le développement d'une LAM dans le contexte (Li et al, 2015). De même, le miR-155 est surexprimé à la fois dans les LAM FLT3-ITD et les LAM avec des réarrangement de MLL, mais si son rôle d'oncomiR est bien décrit dans les LAM FLT3-ITD (Gerloff et al, 2015, Wallace et al, 2017), il semblerait que dans les LAM avec réarrangement de MLL, l'expression du miR-155 n'influe pas le processus de leucémogénèse (Schneider et al, 2016) ; une étude à même montré un rôle de suppresseur de tumeur pour miR-155 dans les LAM FLT3 WT où sa surexpression induit l'apoptose des cellules leucémiques ainsi qu'une différenciation de type granulo-monocytaire (Palma et al, 2014).

Ces effets variables de l'expression des miR peuvent s'expliquer notamment par la grande variété de leurs cibles, dont l'importance varie selon le contexte leucémique, mais également par des niveaux d'expression variables selon les sous-types de LAM : il a été montré que des niveaux intermédiaires du miR-155 allaient agir de façon oncogénique dans les LAM, alors que des niveaux très élevés interfèrent avec la leucémogénèse (Narayan et al, 2017). Les niveaux d'expression intermédiaires correspondent dans cette étude au niveau de miR-155 observés dans la cohorte de patients utilisée par les auteurs. De même, le miR-125b peut selon son niveau d'expression promouvoir des hémopathies malignes de type myéloïde ou lymphoïde (So et al, 2014).

Variation de l'expression	Micro-ARN	Sous-type de LAM	Mécanisme de dérégulation de l'expression	Rôle du miR
Sur-expression	miR-155	- Caryotype normal - Non renseigné	-Régulation par STAT5 et NF-κB en aval de FLT3-ITD - Surexprimé en aval des gènes de fusion MLL	Favorise la prolifération et la survie
	miR-22	Issue d'un SMD	Surexprimé après perte de PU.1	Favorise la prolifération et la survie, inhibe la différenciation

	miR-9	Transcrits de fusion de MLL	Transcrit par les transcrits de fusion MLL	Favorise la leucémogénèse et la survie
	Cluster miR-17-92	Transcrits de fusion de MLL	Amplification, régulation transcriptionnelle par Myc et les transcrits de fusion MLL	Favorise la leucémogénèse, bloque la différenciation
	miR-125b	t(2;11)(p21;q23) LAM issues d'un SMD	Surexprimé via la translocation t(2;11)	Favorise la prolifération et l'auto-renouvellement, sa surexpression induit une LAM chez la souris
	miR-126	t(8 ;21), CSL des LAM à caryotype normal	Déméthylation du promoteur (t(8;21))	Favorise la prolifération et la résistance, bloque la différenciation
	miR-378	FAB-M2, et t(8 ;21)	-	Potentiellement corrélé à un mauvais pronostic (Qian et al, 2013)
	miR-196b	Transcrits de fusion de MLL	Transcrit par les transcrits de fusion MLL	Favorise la prolifération et la survie, bloque la différenciation
	miR-24	t(8;21)	Régulation transcriptionnelle par AML1-ETO et RUNX1 muté	Activation de la voie MAPK, favorise la prolifération, bloque la différenciation (Zaidi et al, 2009)
	miR-216b	Plusieurs types	-	Associé à un mauvais pronostic chez les patients à caryotype normal (Zhang et al, Avril 2018)
Sous-expression	miR-22	<i>de novo</i>	Répression épigénétique via Tet1	Inhibe la prolifération, favorise la différenciation
	miR-9	t(8 ;21), EVI1	Promoteur hyperméthylé par EVI1	Inhibe la prolifération, favorise la différenciation monocytaire
	miR-29b	Plusieurs types	Réprimé par Myc et NFκB, délétion de la région codante, réprimé après perte de <i>CEBPA</i>	Inhibe la prolifération, favorise l'apoptose
	miR-146a	Plusieurs types, dont LAM issue d'un SMD	Délétion dans les SMD	Inhibe la prolifération et la survie, inhibe NF-κB
	miR-223	Plusieurs types, dont t(8;21)	Réprimé par E2F1 et AML1/ETO	Inhibe la prolifération, favorise l'apoptose et la différenciation granulocytaire
	miR-424	Caryotype normal, NPM1 muté	-	Sensibilité à l'apoptose induite par le TNF-related apoptosis inducing ligand (Sun et al, 2016)

Tableau 11. Dérégulation de l'expression des miR dans les LAM

Adapté de Wallace et O'Connell, 2017, sont listés ici les miR pour lesquels des données indiquent une dérégulation de leur expression, et une fonction et/ou un impact sur le pronostic est connu. SMD = syndrome myélodysplasique

D'un point de vue de l'utilisation des miR en clinique dans les LAM, si de nombreux miR pourraient constituer des cibles thérapeutiques intéressantes, les avancées dans la LAM comme dans les autres cancers sont toujours freinées par la nécessité de mettre au point des méthodes d'administration des oligonucléotides chez les patients qui soient ciblées et peu toxiques. Les LAM n'ont pas été incluses dans l'essai de phase I sur l'anti-miR-155 dans les hémopathies malignes (NCT02580552), il n'y a donc pas d'essai en cours dans les LAM impliquant un mimic ou un anti-miR. En revanche, des drogues modulant l'expression des miR peuvent s'avérer des stratégies alternatives intéressantes, ainsi, le MLN4924 (pevonedistat), un inhibiteur de NEDD8 dont l'action conduit à l'inhibition de la voie NF- κ B, peut inhiber l'expression du miR-155 en aval de FLT3-ITD, ce qui participe à ses effets anti-leucémiques (Khalife et al, 2015). Ce composé est actuellement testé en essai clinique de phase 3 en association avec l'azacitidine dans les LAM (NCT03268954). Trouver des moyens alternatifs de cibler les voies oncogéniques impliquant les miR semble donc indispensable tant qu'il ne sera pas possible de cibler directement les miR, et pourrait permettre de mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques permettant de sensibiliser les LAM aux traitements classiques, car les miR y ont également été impliqués dans la résistance à la chimiothérapie (Wallace et O'Connell, 2017).

Ici encore, l'aspect le plus prometteur pour l'utilisation des miR en clinique est leur fonction potentielle de marqueurs diagnostiques ou pronostiques. En effet, les différents sous-types de LAM ont des profils d'expression de micro-ARN qui leur sont propres (Marcucci et al, 2011, Garzon et al, 2008), et plusieurs miR ont vu leur niveau d'expression associé à une valeur pronostique dans les LAM (Zhang et al, 2018, Xu et al, 2015). De plus, un travail de de Leeuw et al a montré que le profil d'expression de miR d'une leucémie aiguë pouvait permettre de déterminer son lignage (myéloïde ou lymphoïde), ce qui pourrait permettre la classification des leucémies aiguës de lignée ambiguë et faciliter la prise en charge de ces patients (De Leeuw et al, 2013). Il a également été montré que le profil des miR permettait d'identifier, voire de prédire, la maladie résiduelle minimale après chimiothérapie, ainsi que la détection de la maladie dans le sang (Koutova et al, 2015), ce qui constituerait un outil inestimable dans le suivi des patients. Les différents travaux réalisés sur la valeur pronostique et diagnostique des miR dans les LAM ne donnent cependant pas toujours des résultats cohérents entre eux, il y a donc un véritable approfondissement de la connaissance à effectuer dans ce domaine pour pouvoir un jour voir les micro-ARN figurer à côté des anomalies cytogénétiques et des mutations dans les classifications et les recommandations cliniques de prise en charge des LAM (Wallace et O'Connell, 2017).

C. Le micro-ARN 16 (miR-16)

a) Les clusters miR-15/16

Le miR-16 a été découvert en 2001 et est conservé dans plusieurs espèces vertébrées (Lagos-Quintana et al, 2001, Yue et al, 2001). Il existe dans le génome humain deux séquences codant pour le miR-16 : la première située au niveau du chromosome 13q14 dans la séquence du long ARN non codant DLEU2 (Deleted in Leukemia 2), appelée miR-16-1, et la seconde située sur le chromosome 4 dans la séquence du gène SMC4 (Structural Maintenance of Chromosomes 4), appelée miR-16-2. MiR-16-1 et 2 ont des séquences matures identiques et seront donc regroupés sous l'appellation miR-16 (Source : site miRBase, Kozomara et al, 2019). Les deux séquences de miR-16 existent dans un cluster qu'elles partagent avec le miR-15 : le miR-16-1 existe dans le même cluster que le miR-15a, et le miR-16-2 est en cluster avec le miR-15b (Liu et al, 2019 et Sullivan et al, 2015).

"SEED"

15a: UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG
 15b: UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
 16: UAGCAGCACGUAUUUAUUGGCG
 195: UAGCAGCACAGAAUAUUGGC
 497: CAGCAGCACACUGUGGUUUGUA

Figure 28. Séquences des miR matures membres de la famille miR-15.

Séquences matures des miR-15a/15b/16/195/497. La région surlignée en bleu correspond à la séquence "seed", commune aux miR de cette famille. Issu de Porello et al, 2011.

Contrairement au miR-16-1 et 2, les miR-15a et b présentent de petites différences entre leurs séquences matures (Figure 29), il est donc possible de les étudier séparément. Les miR-15 et 16 appartiennent à la famille du miR-15, qui regroupe 6 micro-ARN (miR-15a et b, miR-16-1 et 2, miR-195, et miR-497) possédant la même séquence seed (et donc probablement les mêmes ARNm cibles), ainsi qu'une certaine homologie de leur séquence mature (Figure 29).

b) Cibles et fonctions biologiques principales

D'après le logiciel TargetScan (Agarwal et al, 2015), chez l'humain plus de 1500 transcrits possèdent dans leur séquence un site reconnu par la famille miR-15. Parmi toutes ces cibles potentielles, plusieurs ont été vérifiées expérimentalement, et semblent principalement réguler la prolifération cellulaire et l'apoptose, ce que confirme une étude réalisée dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) proposant une signature de gènes régulés par le miR-15/16 où sont fortement représentés des gènes du cycle cellulaire et de l'apoptose (Calin et al, 2008).

La première cible identifiée de miR-16 impliquée dans le cycle cellulaire est la phosphatase CDC25A (Pothof et al, 2009) : après irradiation des cellules par les UV, le miR-16 est surexprimé et régule négativement CDC25A, ce qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages UV. Un travail de Liu et al a montré plus tard que la surexpression du miR-16 induisait un arrêt des cellules en phase G1, et que les miR de la famille miR-15 ciblaient plusieurs gènes impliqués dans la transition G1/S, à savoir les cyclines D1, D3, et E1, et la kinase CDK6 (Liu et al, 2008). Par la suite, la régulation des cyclines D1 (Cai et al, 2012 et Huang et al, 2015) et E1 (Zubillaga-Guerrero et al, 2015 et Guo et al, 2015), et de CDK6 (Tian et al, 2017) par le miR-16 a été confirmée dans plusieurs modèles. Par ailleurs, il a été récemment montré que le miR-16 pouvait cibler l'ARNm de MEK1 (MAP/ERK Kinase 1), une protéine de la voie des MAPK, pour inhiber la prolifération de cellules cancéreuses (Abraham et al, 2017 et Wang et al, 2018).

En ce qui concerne la régulation de l'apoptose, la cible principale du miR-16 est la protéine anti-apoptotique Bcl2. En effet, il a été montré en 2005 que le miR-15/16 cible directement l'ARNm de Bcl2 et induit l'apoptose dans des cellules de LLC (Cimmino et al, 2005), et il est maintenant admis que la surexpression de Bcl2 causée par la délétion du miR-16 est un aspect essentiel de la biologie des LLC (Pekarsky et al, 2018). Le miR-16 peut également cibler une autre protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl2, Mcl-1 (Myeloid leukemia Cell differentiation 1) (Sampath et al, 2012 et Abraham et al, 2017), ce qui, comme nous le verrons par la suite, peut s'avérer très intéressant dans un contexte de résistance des cellules leucémiques aux inhibiteurs de Bcl2. Le miR-15a/16 cible également l'ARNm de BMI-1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus Integration site1), une protéine anti-apoptotique impliquée dans la résistance des cellules de cancer du sein à la chimiothérapie ; la surexpression de miR-15a ou miR-16 dans ces cellules induit une apoptose

dépendant de la mitochondrie (Patel et al, 2016). Enfin, le miR-16 contrôle le développement des muscles squelettiques en régulant les protéines Bcl2 et Foxo1 et en promouvant l'apoptose dans les myoblastes (Jia et al, 2017).

Une fonction moins décrite du miR-16, mais néanmoins intéressante dans le contexte de cette thèse, est son rôle de régulateur de facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse. Tout d'abord, le miR-15a/16 régule directement l'ARNm du facteur de transcription PU.1 (Moon et al, 2014), que nous avons précédemment présenté comme essentiel à la granulo-monopoïèse. De plus, le miR-16 a été impliqué, avec le miR-155, dans la perturbation du fonctionnement des lymphocytes B chez les personnes âgées en ciblant un facteur de transcription essentiel à la commutation isotypique (Frasca et al, 2015), ainsi que dans la maturation des lymphocytes NK, où son expression permet d'inhiber celle du facteur de transcription Myb, essentiellement exprimé dans les NK immatures (Sullivan et al, 2015). Par ailleurs, la surexpression du miR-16 est une étape essentielle à la restauration de la différenciation des cellules leucémiques par l'acide trans-rétinoïque (Gao et al, 2011).

c) Fonctions du micro-ARN 16 dans les cancers

Au vu de ses cibles et de son rôle pro-apoptotique, pro-différenciant, et d'inhibition de la prolifération, le miR-16 est la définition même d'un miR suppresseur de tumeur. La délétion du cluster miR-15b/16-2 chez la souris cause d'ailleurs l'apparition spontanée d'une hémopathie maligne touchant les lymphocytes B (Lovat et al, 2015).

Parmi les cibles de miR-16 impliquées dans le développement des cancers répertoriées par Liu et al (Tableau 12), on retrouve d'abord les cyclines et protéines pro-apoptotiques décrites ci-dessus, qui médient la prolifération et l'échappement à l'apoptose des cellules cancéreuses, et participent donc également à la résistance aux traitements. La réexpression du miR-16 dans certaines cellules cancéreuses permet d'ailleurs de les sensibiliser à la chimiothérapie (Xia et al, 2008 et Krell et al, 2018). Une autre cible essentielle du miR-16 dans le contexte de la résistance à la chimiothérapie est la kinase Chk1 : en réponse au stress génotoxique, le facteur de transcription p53 active la transcription du miR-16, et la répression de Chk1 par le miR-16 permet de sensibiliser des cellules cancéreuses à un traitement génotoxique (Lezina et al, 2013 et Pouliot et al, 2012).

Cependant, le miR-16 semble intervenir dans d'autres aspects peut-être moins attendus de la tumorigenèse. En effet, il semblerait tout d'abord que le miR-16 cible des protéines impliquées dans l'angiogenèse : plusieurs travaux ont montré que le miR-16 avait pour cible directe l'ARNm du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF-A dans le chondrosarcome (Chen et al, Janvier 2019), le myélome multiple (Sun et al, 2013), ainsi que le lymphome anaplasique à grandes cellules en réponse à l'hypoxie (Dejean et al, 2011), et la surexpression du miR-16 inhibe l'angiogenèse dans ces modèles. Une répression du récepteur au VEGF VEGFR2 par le miR-16 a également été décrite dans le cancer colorectal (Yang et al, 2016). Enfin, le miR-16 peut également inhiber les capacités de migration et d'invasion des cellules cancéreuses, en ciblant des protéines telles que NF- κ B1 (Yang et al, Mars 2014) ou la signalisation en aval du TGF- β (Jin et al, 2018). Le rôle du miR-16 n'est donc pas cantonné à la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire, il s'agit d'un suppresseur de tumeur qui est situé au cœur de voies de signalisations régulant presque toutes les caractéristiques du cancer.

Cible	Cancer	Fonction
Cycline D1/2	LLC, LAM, Cancer du sein, du poumon, et du nasopharynx	Prolifération, apoptose, résistance à la chimiothérapie
Cycline E1	LLC, Cancer du sein, du poumon, et du nasopharynx	Prolifération, apoptose, résistance à la chimiothérapie
Mcl-1	LLC, LAM	Apoptose
RPS6KB1	Cancer du sein	Prolifération, apoptose
MEK1	Adénome hypophysaire	Prolifération, apoptose
WT1	LAM	Prolifération
FEAT	Lignée A549 (modèle de cancer du poumon)	Apoptose
BMI-1	LMC, Glioblastome, Cancer de l'ovaire, du sein, de l'estomac, et du pancréas	Prolifération, apoptose, résistance, angiogenèse, migration, invasion
Bcl-2	LLC, LAM, Cancer du sein, du poumon, et de l'estomac, Gliome	Apoptose, résistance à la chimiothérapie
Sox5/Smad3/Twist1	Cancer du poumon, du sein, de la prostate, et de l'estomac	Migration et invasion
TGF- β 1	Cancer du poumon et de la prostate	Migration et invasion
NK- κ B1	Gliome	Invasion
YAP1, SALL4, FGF-2, FGFR1	Cholangiocarcinome, neurogliome, cancer du nasopharynx	Migration et invasion
STAT3, AEGF	Cancer du sein	Prolifération, angiogenèse
VEGF-A/C	Myélome multiple, cancer de la prostate, glioblastome, Lymphome anaplasique à grandes cellules	Angiogenèse
Akt/ERK	LAM	Apoptose

Tableau 12. Cibles du micro-ARN 16 et leur implication dans le développement des cancers

Adapté de Liu et al, 2019

d) Dérégulations de l'expression du micro-ARN 16 dans les cancers

Nous avons vu plus haut dans cette introduction que l'expression du miR-16 peut être supprimée par la délétion de la région chromosomique 13q14, comportant le cluster miR-15a/16-1, dans les leucémies lymphoïdes chroniques (Lerner et al, 2009). Des mutations ponctuelles dans la séquence du pri-miR-15a/16-1 peuvent également affecter son expression dans les LLC (Calin et al, 2005).

L'expression de miR-15a/16-1 dans les cancers peut également être modulée par des modifications épigénétiques sur son promoteur : dans le cancer du poumon l'inhibition de l'expression de miR-15a/16-1 est médiée par la désacétylation de son promoteur, et l'inhibition de HDAC3 restaure l'expression de miR-15a/16-1, qui réduit la prolifération des cellules cancéreuses (Chen et al, 2013). Le promoteur du gène cluster DLEU2 est également hyperméthylé dans certaines LAM pédiatriques, mais sans que cela influe sur le niveau d'expression du miR-15a ou miR-16-1, ce qui suggère l'existence de mécanismes de régulations de l'expression de ces miR indépendamment de leur gène cluster (Moreno et al, 2014).

L'expression du miR-16 est également sous le contrôle de plusieurs oncogènes, et notamment Myc, qui peut selon le contexte la réprimer (Jiang et al, 2015 et Xue et al, 2015), ou bien l'activer pour induire l'apoptose (Adams et al, 2016). La répression de l'expression de miR-15/16 par Myc en réponse à l'hypoxie favorise l'angiogenèse et la formation de métastases par les cellules de cancer

colorectal (Xue et al, 2015). Dans les cancers du sein surexprimant l'oncogène HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), connus pour résister au traitement par le tamoxifène, Cittelly et al ont montré qu'une forme mutée de HER2 pouvait réprimer l'expression de miR-15/16, ce qui participe à la résistance des cellules cancéreuses *via* la surexpression de Bcl2 (Cittelly et al, 2010). Le facteur de transcription STAT5 a également été identifié comme régulateur négatif du miR-16 dans un modèle de syndrome myéloprolifératif, où il réprime l'activité du promoteur de SMC4 et donc l'expression de miR-15b/16-2 (Li et al, 2010). Enfin, Yang et al ont montré qu'une hyperglycémie chez les patients atteints de cancer colorectal était à l'origine d'une répression de l'expression de miR-16, qui favorise la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (Yang et al, 2016).

Variation d'expression	Cancer	Impact clinique	Références
Surexpression	Cancer de l'estomac	Corrélée à un meilleur pronostic	Ren et al, 2016
	Adénocarcinome colorectal	Corrélée à une survie globale plus faible	Diamantopoulos et al, 2017
	Polycythémia Vera	Non renseigné	Guglielmelli et al, 2011
	LAL-T	Associée à un meilleur taux de survie globale	Tong et al, 2014
Sous-expression	LLC	Délétion 13q14 associée à un bon pronostic	Humplicova et al, 2013
	Cancer de la prostate	Associée à un stade plus avancé Sous-expression dans le sang corrélée à un stade avancé et des métastases	Bonci et al, 2008 Zidan et al, 2018
	Cancer du poumon	Faible expression associée à un meilleur pronostic	Bandi et al, 2009 Chen et al, 2013 Navarro et al, 2011
	Myélome multiple	Potentiel marqueur diagnostique	Li et al, Novembre 2015 Sun et al, 2013
	Cancer colorectal	Associée à un mauvais pronostic	Xiao et al, 2014
	Mélanome	Sous-expression dans le sang associée à un mauvais pronostic	Guo et al, 2016
	Adénome hypophysaire	Associée à des tumeurs de plus grande taille	Bottoni et al, 2015

Tableau 13. Dérégulation de l'expression du micro-ARN 16 dans les cancers

Sont listés ici les cancers où une modification significative de l'expression du miR-16 a été observée au sein de cellules de patients, ou dans le sang des patients si cette modification est associée à un impact clinique significatif

Vert : impact positif de la variation d'expression Rouge : impact négatif

Tous ces travaux montrent que la répression de l'expression du miR-16 semble favoriser le développement tumoral, ce qui est cohérent avec ses fonctions de suppresseur de tumeur décrites dans la partie précédente. On s'attendrait donc à une diminution globale de l'expression du miR-16 dans les cancers, et à une association de sa faible expression avec un mauvais pronostic. Cependant, comme le montrent les données compilées dans le tableau 13, il semblerait que ce ne soit pas toujours le cas, et qu'une forte expression du miR-16 puisse être associée à un mauvais pronostic. Ces résultats ont déjà amené la communauté scientifique à se poser la question d'un rôle oncogénique pour le miR-16, mais jusqu'ici aucun mécanisme précis n'a été identifié (Huang E et al, 2015). Néanmoins, on peut voir que plusieurs études sur le même cancer donnent des résultats différents, ainsi Diamantopoulos et al associent une forte expression du miR-16 avec un mauvais pronostic dans le cancer colorectal, alors que pour Xiao et al, c'est au contraire une expression plus

faible du miR-16 qui indiquerait un pronostic défavorable, et ce sur des cohortes de patients de tailles similaires (environ 150). Il semblerait donc que des études plus poussées ou plus homogènes soient nécessaires pour mieux comprendre l'influence des variations d'expression du miR-16 sur le pronostic de certains cancers.

e) *Micro-ARN-16 et hémopathies malignes*

Comme nous l'avons vu précédemment, la découverte de la délétion du cluster du miR-15a/16-1 dans la LLC en 2002 est le premier lien établi entre micro-ARN et cancer (Calin et al, 2002). Depuis, la caractérisation fonctionnelle du miR-16 a permis d'établir son importance dans la biologie de cette maladie (Pekarsky et al, 2018). En effet, le miR-15/16 a notamment pour cible la protéine anti-apoptotique Bcl2, qui est surexprimée dans la LLC (Cimmino et al, 2005), et la délétion de miR-15a/16-1 semble être à l'origine de cette surexpression dans la majorité des LLC, certains cas présentant également une mutation ponctuelle à l'origine d'une perte de fonction et d'expression du miR-15/16 (Calin et al, 2005). Des modèles murins ont confirmé que la délétion du cluster miR-15a/16-1 pouvait à elle seule causer une LLC, et le phénotype est plus sévère quand la délétion comprend des régions autour du cluster miR-15a/16-1, et pas seulement la région codant pour les miR, indiquant l'importance potentielle des régions avoisinantes sur le chromosome 13q14 pour le développement de la maladie (Klein et al, 2010). De façon intéressante, la délétion du cluster miR-15b/16-2, pour lequel aucune modification de l'expression n'a été rapportée dans les LLC, a les mêmes effets dans la souris (Lovat et al, 2015). Au vu du rôle potentiel de suppresseur de tumeur du miR-15/16 dans les LLC, il semblerait intéressant de pouvoir le réexprimer chez les patients, d'autant plus que des essais dans la souris ont montré que l'expression ectopique de miR-15a ou miR-16 par administration de mimic ou de vecteurs lentiviraux permettait de faire régresser la maladie *in vivo* (Kasar et al, 2012 et Cutrona et al, 2017). Cependant, nous avons vu que l'administration de mimics chez le patient n'est à l'heure actuelle pas une stratégie thérapeutique suffisamment maîtrisée. De plus, la cible du miR-16, Bcl2, fait l'objet d'une thérapie ciblée dans les LLC, avec un inhibiteur pharmacologique spécifique, le venetoclax, approuvé chez les patients atteints de LLC après une première ligne de traitement ou en première ligne dans les LLC porteuses d'une mutation ou d'une délétion de TP53, suite à un essai clinique montrant une amélioration de la survie globale et de la survie sans progression de la maladie (NCT02005471).

Le rôle du miR-16 dans les LAM a moins été décrit que dans les LLC, néanmoins quelques travaux illustrent son importance dans la biologie de cette maladie. La première étude, réalisée par Gao et al, montre que la surexpression du miR-15/16 dans deux lignées leucémiques (HL-60 et K562) inhibe la prolifération des cellules en réprimant de façon indirecte l'expression de l'oncogène Wilm's Tumor 1 (WT1) (Gao et al, 2011). Un autre travail paru la même année décrit un rôle pour le miR-16 dans la levée du blocage de différenciation des cellules leucémiques : les auteurs montrent que le traitement de lignées et cellules primaires leucémiques par l'acide tout trans-rétinoïque induit une surexpression de miR-15a/16-1 qui est nécessaire à la différenciation induite par ce traitement (Gao et al, 2011) ; le miR-16 est donc impliqué dans la prolifération et le blocage de différenciation des cellules leucémiques, les deux caractéristiques essentielles de la LAM. Par la suite, Kim et al ont montré que l'expression du miR-16 était réprimée par le récepteur oncogénique muté FLT3-ITD, et ont identifié la kinase Pim1, essentielle à de nombreuses voies de signalisation oncogénique en aval de FLT3-ITD, comme cible potentielle du miR-16 en aval de FLT3-ITD (Kim et al, 2012). Enfin, la répression de l'expression du miR-16 en aval du récepteur de la chimiokine CXCR4 a été montrée comme essentielle pour la survie des cellules leucémique, et la surexpression du miR-16 induit une

apoptose médiée par Bcl2 (Abraham et al, 2017). Bcl2 a d'ailleurs été identifié comme une cible thérapeutique intéressante dans les LAM, et son inhibiteur, le venetoclax, a bénéficié en 2018 d'une approbation accélérée par la FDA en première ligne de traitement en combinaison avec l'azacitidine ou la cytarabine à faible dose chez les patients âgés non éligibles à la chimiothérapie intensive, suite à des essais cliniques aux résultats impressionnants en termes d'amélioration de la survie des patients (DiNardo et al, 2018 et Lin et al, 2016). Il est intéressant de noter que le venetoclax est actuellement testé en essai clinique, en combinaison avec un inhibiteur de FLT3, chez les patients mutés pour FLT3 en rechute, ou réfractaires au traitement (NCT03735875), et que l'activité du récepteur FLT3-ITD semble être un facteur de résistance au venetoclax (Raghuvver et al, 2017). Par ailleurs, une des sources de résistance des cellules leucémiques au venetoclax est l'expression d'une protéine de la famille de Bcl2, Mcl-1 (Boset et al, 2017), et la mise au point de traitements combinant le venetoclax avec un inhibiteur de Mcl-1 pour pallier à cette résistance est actuellement en cours dans la LAM (NCT03672695), alors qu'une étude pré-clinique a montré que l'inhibition de Mcl-1 sensibilise les cellules leucémiques au traitement par le venetoclax (Ramsey et al, 2018). L'ARNm de Mcl-1 étant également une cible du miR-16, il semblerait que les voies de signalisation impliquant ce micro-ARN soient essentielles dans la biologie des LAM, et qu'une compréhension la plus détaillée possible de ces voies soit indispensable pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces contre cette maladie.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Contexte : Les patients présentant une Duplication Interne en Tandem dans le récepteur FLT3 (FLT3-ITD) représentent environ 25% des cas de Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM), et ont un mauvais pronostic en termes de survie par rapport aux patients portant le récepteur sauvage. En effet, les LAM FLT3-ITD ont tendance à rechuter après les traitements conventionnels. Il est donc nécessaire d'étudier plus en détail la biologie de ce sous-type de LAM, afin de déterminer de meilleurs moyens de cibler ces cellules.

Notre équipe a précédemment identifié CDC25A comme un acteur indispensable dans la prolifération et le blocage de différenciation de ces cellules, deux caractéristiques principales de la LAM. Ils ont dans la même étude mis en évidence un contrôle strict du niveau de CDC25A par le récepteur muté, contrôle impliquant le facteur de transcription STAT5 (Bertoli et al, 2015).

Nous avons décidé d'étudier le rôle du suppresseur de tumeur microARN-16 (miR-16) dans la régulation de CDC25A par FLT3-ITD, dans la mesure où il a été montré dans d'autres modèles que miR16 était i) capable d'invalider l'expression de CDC25A (Pothof et al, 2009) et ii) inhibé par STAT5 et FLT3-ITD respectivement dans les syndromes myéloprolifératifs (Li et al, 2010) et un modèle murin (Kim et al, 2012).

Hypothèse : Le miR-16 est un régulateur négatif de CDC25A en aval de la voie FLT3-ITD/STAT5, et par conséquent un acteur important de la biologie des LAM FLT3-ITD.

Objectifs :

- 1) Décrypter la voie de signalisation en aval de FLT3-ITD permettant la régulation du niveau de CDC25A.
- 2) Etudier les fonctions de miR-16 dans deux aspects clés de la biologie des LAM : la prolifération et la différenciation cellulaire.

RESULTATS

I. Résumé des méthodes utilisées

Les matériels et méthodes utilisés lors de ce travail de thèse sont détaillés dans le manuscrit en annexe, nous allons simplement ici résumer certains éléments pouvant faciliter la compréhension des résultats.

A. Modèles d'étude

La grande majorité de ce travail a été réalisé sur des lignées cellulaires dérivées de cellules leucémiques. Nous avons tout d'abord utilisé deux lignées leucémiques exprimant le récepteur FLT3-ITD :

- MV411 : lignée issue d'une LAM monoblastique (FAB M5), homozygote pour la mutation FLT3-ITD et portant une translocation t(4;11)(q21;q23) (réarrangement de *MLL* avec le gène *AF4*),
- MOLM14 : lignée issue d'une LAM monoblastique (FAB M5), hétérozygote pour la mutation FLT3-ITD (deux allèles sur trois, trisomie du chromosome 13) et portant une translocation t(9;11) (réarrangement de *MLL* avec le gène *AF9*),

La lignée MOLM14-TKD, lignée établie à partir de la lignée MOLM14 et exprimant une construction FLT3-ITD mutée sur son résidu D835 (D835Y) (Larrue et al, 2015, Bertoli et al, 2015), nous a permis de travailler sur un modèle résistant aux inhibiteurs de FLT3.

Par ailleurs, nous avons travaillé sur trois lignées leucémiques exprimant soit la forme sauvage du récepteur (OCI-AML3 : lignée issue d'une LAM myélomonocytaire (FAB M4), et HL-60 : lignée issue d'une leucémie promyélocytaire (FAB M3)), soit n'exprimant pas du tout le récepteur (HEL : lignée issue d'une érythroleucémie (FAB M6)), ce qui nous a permis de contrôler que les mécanismes que nous présentons ici sont bien spécifiques à la signalisation induite par FLT3-ITD.

Enfin, les lignées étant de par leur immortalisation des modèles artificiels, nous avons également réalisé certaines expériences sur des cellules primaires de LAM, exprimant ou non le récepteur muté, provenant de la cytothèque du CHU de Toulouse. Les cellules primaires ne pouvant pas être cultivées plus d'un ou deux jours de façon classique en suspension, leur prolifération a été quantifiée en évaluant la capacité de ces cellules à former des colonies dans un milieu semi-solide. Les caractéristiques des patients dont un échantillon de cellules leucémiques a été utilisé pour ce travail sont listées dans le tableau 2 du manuscrit en annexe.

B. Modulation et quantification de l'expression des micro-ARN

Pour moduler le niveau de miR-16 dans la cellule nous avons utilisé deux approches : nous avons transfecté dans nos cellules soit un anti-miR-16, une séquence d'ARN venant s'hybrider avec le miR-16 pour inhiber ses fonctions et à terme amener à sa dégradation, soit le pré-miR-16, qui sera pris en charge par Dicer et les protéines Argonautes pour donner le miR-16 mature (TaqMan).

La quantification du niveau de miR-16 dans les cellules a été réalisée avec une technique de RT-qPCR (Transcription réverse suivie d'une PCR –Polymerase Chain Reaction- quantitative) permettant d'amplifier uniquement la séquence mature du miR et non ses précurseurs (Schmittgen et al, 2008).

C. Etude de la différenciation

Afin de suivre la différenciation dans la voie granulo-monocytaire de nos cellules leucémiques, nous avons utilisé trois marqueurs en cytométrie en flux :

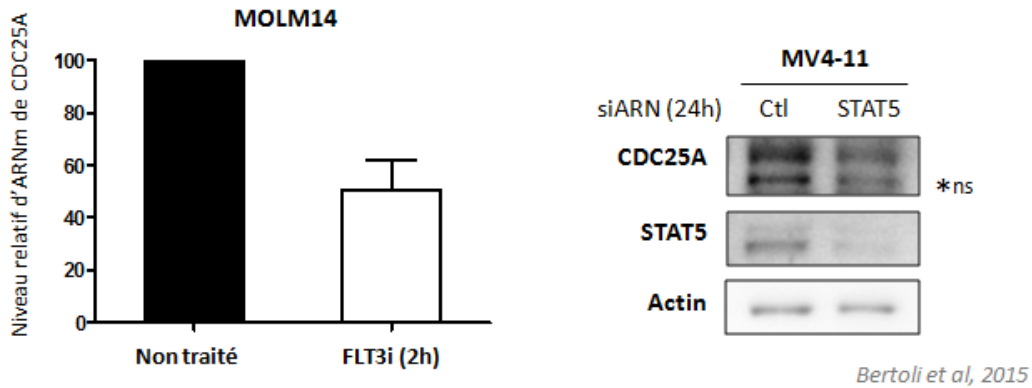
- CD11b : marqueur précoce de la différenciation, retrouvé chez les précurseurs des granulocytes et des monocytes,
- CD14 : marqueur tardif de différenciation, spécifique aux monocytes,
- CD15 : marqueur tardif de différenciation, spécifique aux granulocytes.

II. Résultats principaux

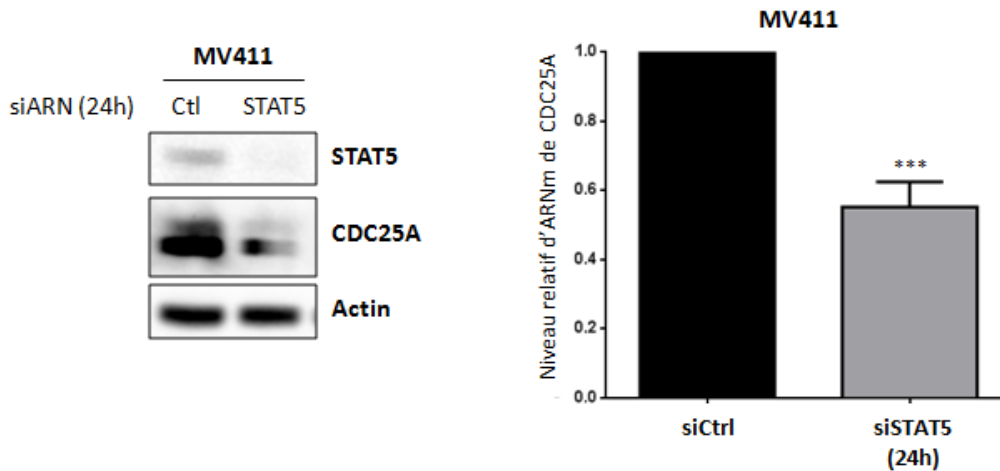
A. Régulation de CDC25A en aval de FLT3-ITD

a) *FLT3-ITD* régule le niveau d'ARNm de *CDC25A* via *STAT5*

A.



B.



C.

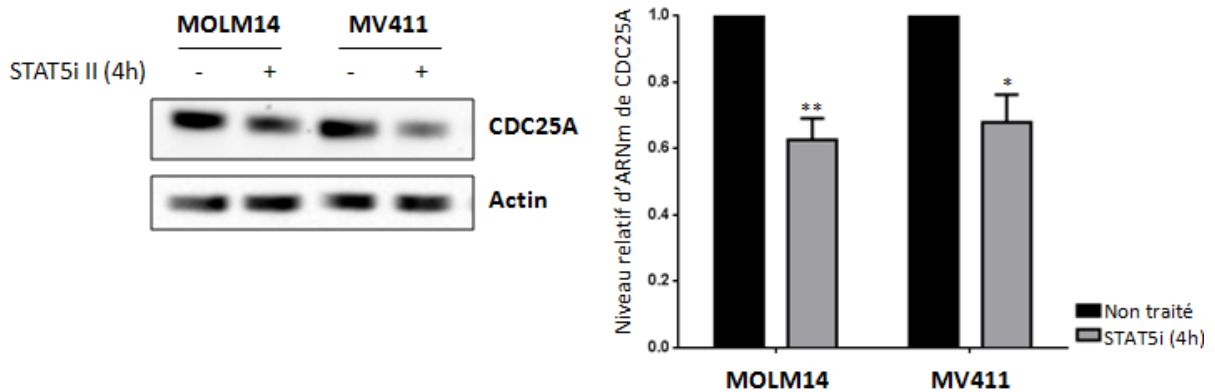


Figure 29. STAT5 régule le niveau d'ARNm de CDC25A en aval de FLT3-ITD

A. Résultats de Bertoli et al, 2015 : Analyse du niveau d'ARNm de CDC25A après inhibition de FLT3 dans une lignée leucémique FLT3-ITD (panneau de gauche), et analyse du niveau protéique de CDC25A après invalidation de STAT5 dans une lignée leucémique FLT3-ITD (panneau de gauche). B. Analyse du niveau de protéine (gauche) et d'ARNm (droite) de CDC25A après invalidation génétique de STAT5 dans la lignée MOLM14. C. Analyse du niveau de protéine (gauche) et d'ARNm (droite) de CDC25A après inhibition pharmacologique de STAT5 dans les lignées MOLM14 et MV411.

Notre équipe a précédemment identifié CDC25A comme cible de la signalisation de FLT3-ITD. Plus précisément, ils ont montré que l'inhibition de FLT3 induisait une diminution rapide (2h) de l'expression de CDC25A au niveau de la protéine et de l'ARN, et que la régulation de l'expression protéique de CDC25A en aval de FLT3-ITD était médiée par le facteur de transcription STAT5 (Bertoli et al, 2015, et Figure 29.A). Nous avons donc commencé par vérifier si l'invalidation de STAT5 dans nos lignées leucémiques FLT3-ITD affectait également le niveau d'ARNm de CDC25A, et en effet l'invalidation de STAT5 par siARN réduit de moitié le niveau d'ARNm de CDC25A dans la lignée MV411 (Figure 29.B). Nous avons également confirmé ce résultat grâce à un inhibiteur pharmacologique de STAT5, qui réduit le niveau d'ARNm de CDC25A dès 4h de traitement dans les cellules MOLM14 et MV411 (Figure 29.C). Ces résultats suggèrent que STAT5 régule soit la transcription soit la stabilité de l'ARNm de CDC25A en aval de FLT3-ITD.

b) *STAT5 est un régulateur transcriptionnel direct de CDC25A*

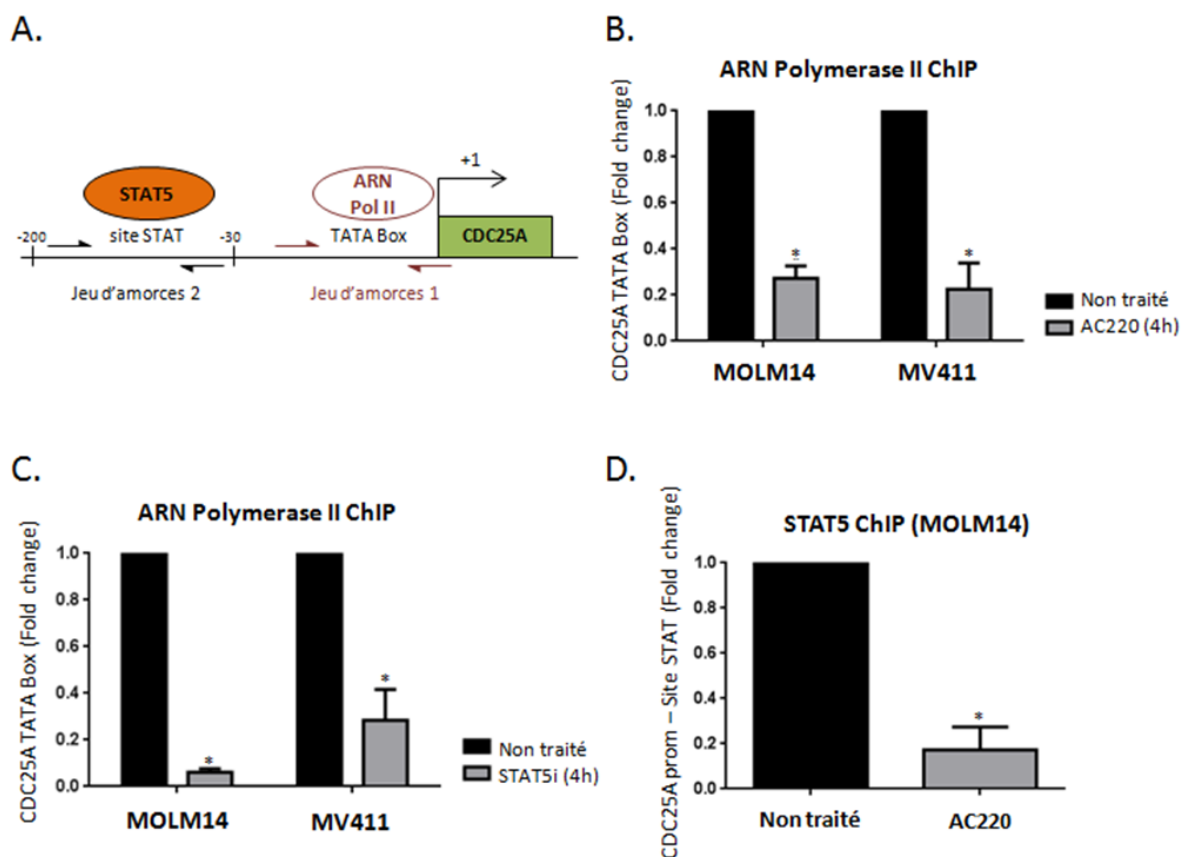


Figure 30. STAT5 est un régulateur transcriptionnel direct de CDC25A en aval de FLT3-ITD

A. Design des couples d'amorces utilisés pour amplifier deux régions du promoteur de CDC25A. B. Détection de la TATA Box du promoteur de CDC25A avec le jeu d'amorces 1 après une ChIP dirigée contre l'ARN Pol II dans les cellules MOLM14 et MV411 traitées à l'AC220. C. Détection de la TATA Box du promoteur de CDC25A avec le jeu d'amorces 1 après une ChIP dirigée contre l'ARN Pol II dans les cellules MOLM14 et MV411 traitée avec un inhibiteur de STAT5. D. Détection du site consensus STAT5 dans le promoteur de CDC25A avec le jeu d'amorces 2 après une ChIP dirigée contre STAT5 A et B dans les cellules MOLM14 traitée avec l'AC220.

STAT5 étant un facteur de transcription, notre première hypothèse était qu'il régule directement l'activité du promoteur de CDC25A. Afin de quantifier cette activité, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) avec un anticorps dirigé contre l'ARN Polymérase II. L'inhibition de FLT3 par l'AC220 (Quizartinib) dans les lignées MOLM14 et MV411

induit une diminution de l'interaction de l'ARN Pol II avec la TATA Box du promoteur de CDC25A, ce qui traduit une activité plus faible du promoteur (Figure 30.B), suggérant que FLT3-ITD module la transcription de CDC25A. Des résultats similaires ont été obtenus après inhibition de STAT5 (Figure 30.C), impliquant le facteur de transcription dans cette voie de régulation. Afin de déterminer si STAT5 peut réguler directement la transcription de CDC25A, nous avons réalisé des expériences de ChIP avec des anticorps dirigés contre STAT5 A et B et étudié l'interaction de STAT5 avec une région du promoteur proximal de CDC25A contenant un site consensus reconnu par les facteurs STAT (Figure 30.A, Barré et al, 2005). Nous avons de cette manière mis en évidence le fait que STAT5 est bien présent au niveau de cette région du promoteur de CDC25A dans nos cellules leucémiques, et que cette interaction est perturbée par l'inhibition de FLT3-ITD (Figure 30.D), ce qui identifie pour la première fois STAT5 comme un régulateur transcriptionnel direct de CDC25A, et montre que cette régulation est contrôlée par FLT3-ITD dans les cellules leucémiques.

c) FLT3-ITD réprime l'expression du micro-ARN-16 via STAT5

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de cette thèse, l'expression de CDC25A peut être régulée à de multiples niveaux, de sa transcription à la dégradation de sa protéine, nous avons donc supposé que son niveau dans les cellules FLT3-ITD pouvait également être soumis à plusieurs modes de régulation. Bertoli et al ayant montré que FLT3-ITD n'affectait pas la stabilité de la protéine, mais sa synthèse, nous avons dirigé notre attention vers les micro-ARN, des régulateurs de la traduction et de la stabilité des ARNm. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au miR-15/16, un régulateur connu de l'ARNm de CDC25A (Pothof et al, 2009), dont l'expression peut-être réprimée par STAT5 (Li et al, 2010), et FLT3-ITD dans le cas du miR-16 (Kim et al, 2012). Nous avons donc émis l'hypothèse que FLT3-ITD réprime l'expression du miR-15/16 via STAT5 pour permettre l'expression de CDC25A.

Nous avons commencé par quantifier le niveau de miR-16, miR-15a, et miR-15b dans nos cellules après un traitement court à l'AC220, et avons constaté que l'inhibition de FLT3 induit une augmentation du niveau de miR-16, traduisant une répression du miR-16 par FLT3-ITD (Figure 31. A). Étonnamment, le niveau de miR-15a ou b ne varie pas en réponse à l'AC220 (Figure 31.A), ce qui suggère une régulation différentielle du miR-16 et du miR-15 par FLT3-ITD plutôt qu'une régulation de tout le cluster. Il est intéressant de constater que les résultats obtenus dans des échantillons primaires d'une petite cohorte de patients indiquent que les patients exprimant FLT3-ITD ont un niveau de miR-16 significativement moins élevé que les patients exprimant le récepteur sauvage (Figure 31.B), suggérant que la répression de l'expression de miR-16 par FLT3-ITD peut être retrouvée chez les patients.

Nous avons ensuite vérifié que STAT5 contrôlait également l'expression du miR-16 dans nos cellules, et en effet l'inactivation de STAT5 par siARN induit une hausse du niveau de miR-16 (Figure 31.C). Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique des deux autres voies de signalisation principales en aval de FLT3-ITD (ERK et PI3K/Akt) n'a pas d'effet sur le niveau de miR-16 (Figure 31.D), suggérant que la régulation du miR-16 par FLT3-ITD est médiée par STAT5, ce qui est cohérent avec le travail de Bertoli et al, montrant que seule la voie STAT5 est impliquée dans la régulation de CDC25A par FLT3-ITD.

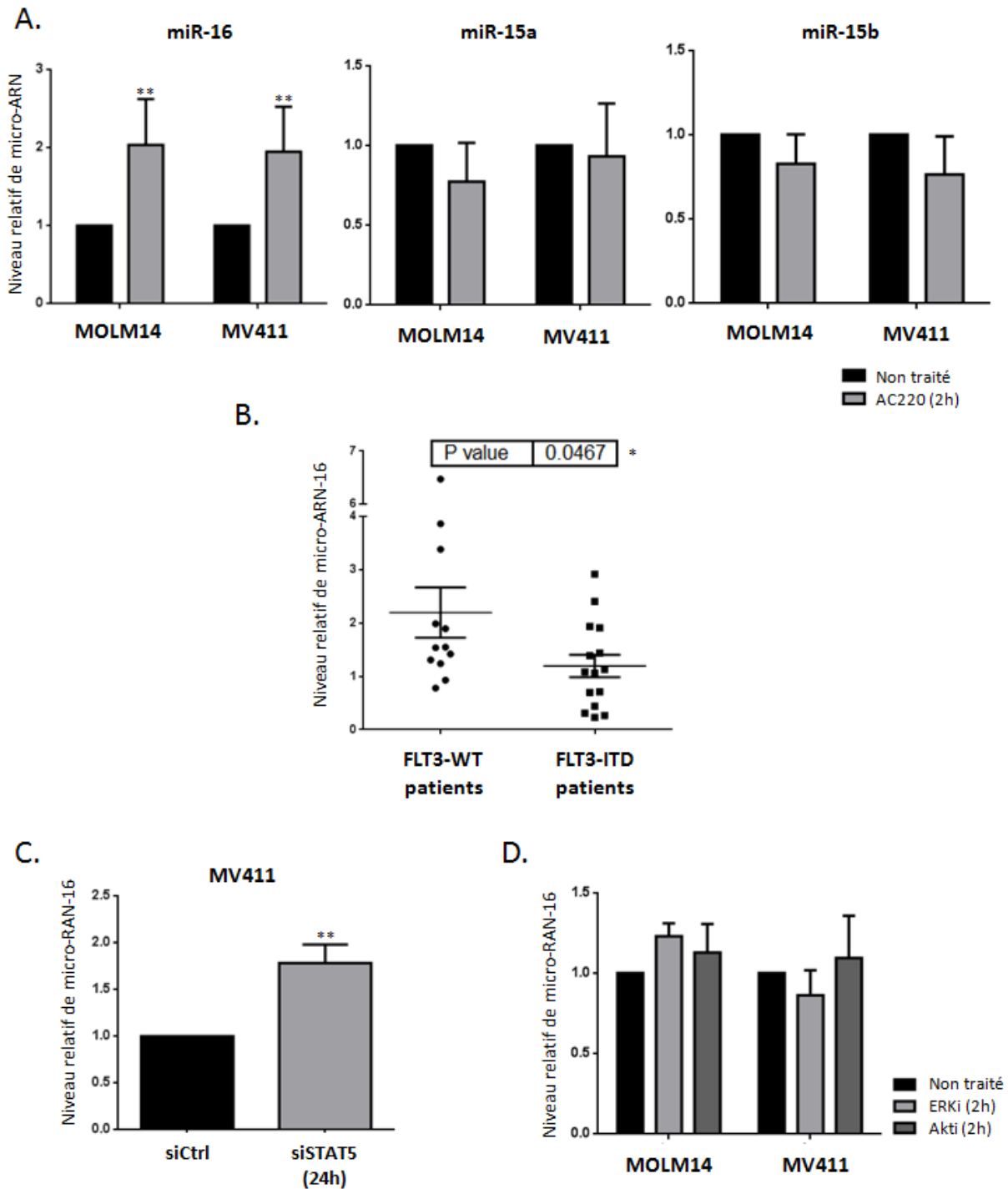


Figure 31. FLT3-ITD réprime l'expression du micro-ARN-16 via STAT5

A. Analyse du niveau de miR-16, 15a, ou 15b, dans les lignées MOLM14 et MV411 traitées à l'AC220. B. Analyse du niveau de miR-16 dans des cellules primaires de patients exprimant FLT3-WT ou FLT3-ITD. C. Analyse du niveau de miR-16 dans la lignée MV411 après invalidation de STAT5. D. Analyse du niveau de miR-16 dans les lignées MOLM14 et MV411 traitées avec un inhibiteur de ERK ou de Akt.

d) *Le micro-ARN 16 : régulateur clé de CDC25A en aval de FLT3-ITD*

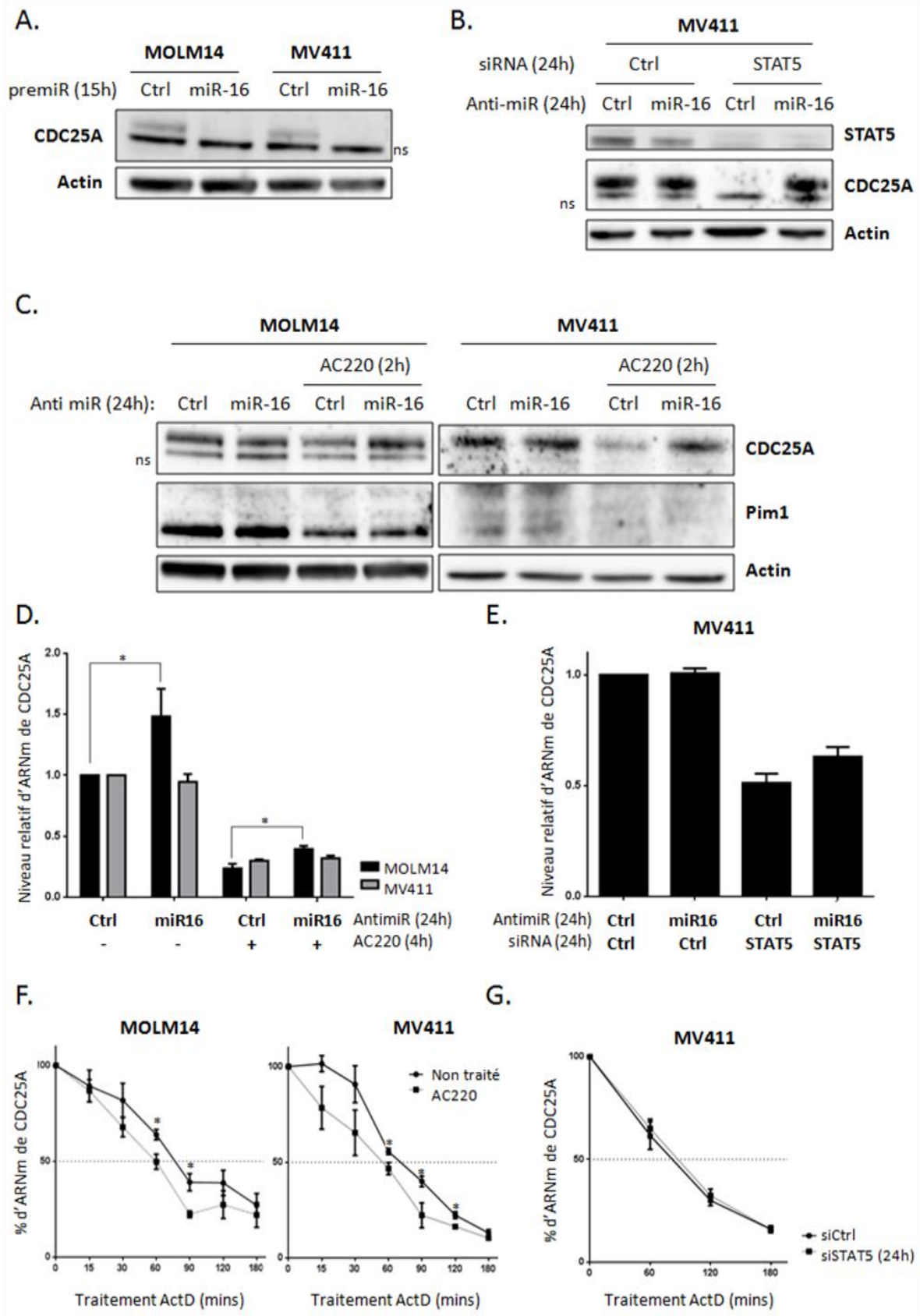


Figure 32. Le micro-ARN-16 est un régulateur du niveau protéique de CDC25A en aval de FLT3-ITD

A. Analyse du niveau de CDC25A après surexpression du miR-16 dans les lignées MOLM14 et MV411. B. Restauration du niveau de CDC25A par l'inhibition du miR-16 après invalidation de STAT5 dans la lignée MV411 ou B. traitement à l'AC220 dans les lignées MOLM14 et MV411. D. Restauration du niveau d'ARNm de CDC25A par l'inhibition du miR-16 après traitement à l'AC220 dans les lignées MOLM14 et MV411 ou E. invalidation de STAT5 dans la lignée MV411. F. Analyse de la stabilité de l'ARNm de CDC25A par ActD chase après traitement à l'AC220 dans les lignées MOLM14 et MV411 ou G. invalidation de STAT5 dans la lignée MV411.

Nous avons ensuite étudié la régulation de CDC25A par le miR-16 dans notre modèle. La surexpression du pré-miR-16 dans nos cellules induit une diminution drastique du niveau protéique de CDC25A (Figure 32.A), confirmant qu'il s'agit bien d'une cible du miR-16. Nous avons ensuite montré que l'inhibition du miR-16 par interférence à l'ARN permettait de restaurer complètement l'expression de CDC25A en conditions d'invalidation génétique de STAT5 (Figure 32. B) ou d'inhibition pharmacologique de FLT3 (Figure 3.C), ce qui confirme notre hypothèse d'une régulation négative de CDC25A par le miR-16 levée par la signalisation FLT3-ITD/STAT5.

Afin de préciser le mode de régulation de CDC25A par le miR-16, nous avons réalisé ces expériences de sauvetage de l'expression de CDC25A en observant cette fois non pas le niveau protéique de CDC25A mais le niveau de son ARNm. L'inhibition de miR-16 permet de restaurer très modérément le niveau d'ARNm de CDC25A en conditions d'inhibition de FLT3 (Figure 32.D), mais n'a pas d'effet en réponse à l'invalidation de STAT5 (Figure 32.E). De plus, la mesure de la stabilité de l'ARNm de CDC25A par une expérience d'Actinomycine D (ActD) chase (mesure de la dégradation de l'ARNm après inhibition de la transcription par l'ActD) indique que l'inhibition de FLT3 n'a qu'un faible effet sur la demi-vie de l'ARNm de CDC25A (Figure 32.F), et que l'invalidation de STAT5 ne l'affecte pas (Figure 32.G). Ces résultats suggèrent que la régulation de CDC25A par le miR-16 passerait plutôt par une inhibition de la traduction que par la dégradation de son ARNm.

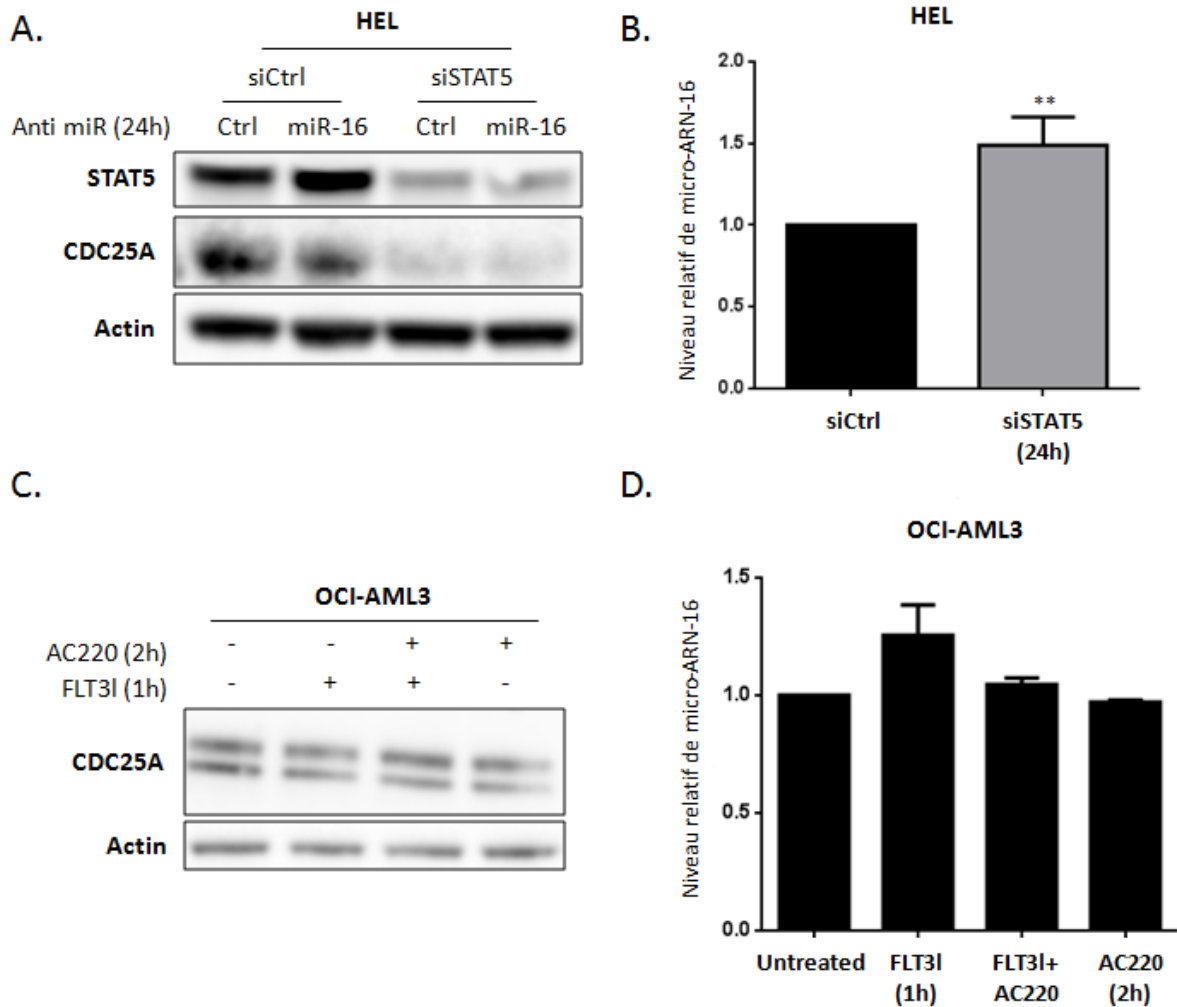


Figure 33. L'axe FLT3/STAT5/miR-16/CDC25A semble spécifique aux cellules leucémiques FLT3-ITD.

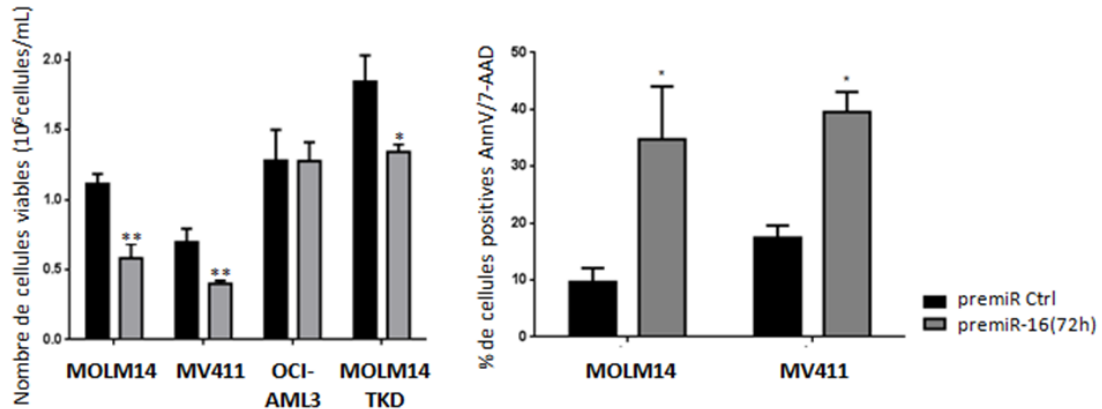
A. Restauration du niveau de CDC25A par l'inhibition du miR-16 après invalidation de STAT5 dans la lignée FLT3-Neg HEL. B. Analyse du niveau de miR-16 après invalidation de STAT5 dans la lignée HEL. C. Analyse du niveau de CDC25A ou D. de miR-16 après traitement au FLT3-ligand et/ou à l'AC220 dans la lignée FLT3-WT OCI-AML-3.

Nous nous sommes ensuite demandés si cet axe FLT3/STAT5/miR-16/CDC25A était spécifique des cellules leucémiques FLT3-ITD. Tout d'abord, nous avons étudié l'impact de l'inhibition du miR-16 dans les cellules leucémiques HEL, où une régulation traductionnelle de CDC25A par STAT5 a été mise en évidence (Gaultier et al, 2012), et avons constaté qu'inhiber le miR-16 ne permet pas de restaurer l'expression de CDC25A après invalidation de STAT5 (Figure 33.A), bien que l'invalidation de STAT5 soit à l'origine d'une augmentation modérée du niveau de miR-16 (Figure 33.B). Nous avons ensuite évalué l'impact de l'activation et de l'inhibition du récepteur FLT3 sauvage sur le niveau de CDC25A et de miR-16 dans les OCI-AML3, une lignée leucémique exprimant FLT3-WT : ni l'activation par le FL ni l'inhibition par l'AC220 n'a eu d'effet sur le niveau de CDC25A ou du miR-16, confirmant les résultats de Bertoli et al qui montrent que la régulation de CDC25A par FLT3 est spécifique de la forme ITD.

B. Importance fonctionnelle du micro-ARN-16 dans les LAM FLT3-ITD

a) *La réexpression du micro-ARN-16 dans les cellules FLT3-ITD affecte leur prolifération*

A.



B.

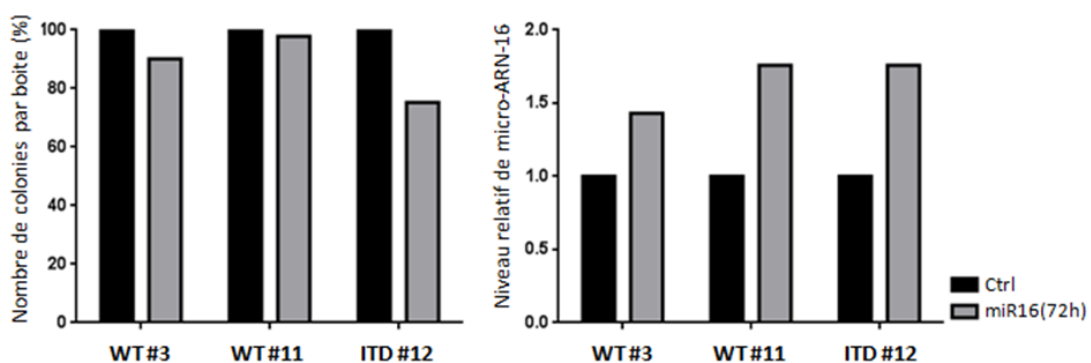


Figure 34. La surexpression du micro-ARN 16 inhibe la prolifération des lignées leucémiques et des cellules primaires FLT3-ITD

A. Comptage au bleu trypan des cellules viables après surexpression du miR-16 dans les lignées MOLM14, MV411, OCI-AML3, et MOLM14-TKD (gauche), et proportion de cellules apoptotiques après surexpression du miR-16 dans les lignées MOLM14 et MV411 (droite). B. Comptage des colonies formées par des cellules primaires de patients après surexpression du miR-16.

CDC25A est un acteur essentiel de la prolifération des cellules leucémiques FLT3-ITD (Bertoli et al, 2015), aussi nous sommes nous intéressés à l'influence de l'expression du miR-16 sur la prolifération de ces cellules. La surexpression du miR-16 inhibe la prolifération des cellules FLT3-ITD, chez qui elle induit également une apoptose importante (Figure 34.B), ainsi que des cellules MOLM14-TKD (Larrue et al, 2015), résistantes aux inhibiteurs de FLT3 de type 2 tels que l'AC220 (Figure 34.A), ce qui laisse supposer que cibler cette voie de signalisation pourrait outrepasser certaines résistances aux inhibiteurs de FLT3. Il est par ailleurs intéressant de noter que la surexpression du miR-16 n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules OCI-AML3, ce qui suggère une fois de plus une spécificité d'action du miR-16 dans les cellules FLT3-ITD.

De plus, nous avons surexprimé le miR-16 dans des cellules primaires de patients en les transduisant avec un vecteur lentiviral, et avons ensuite évalué leur potentiel clonogénique en les ensemençant dans un milieu semi-solide. Les colonies ont été comptées après 7 jours de culture. Si les deux patients exprimant le récepteur sauvage ne sont pas affectés par une augmentation modérée du niveau du miR-16, le patient FLT3-ITD voit son potentiel clonogénique diminuer d'environ 25% (Figure 34.C), ce qui suggère que l'importance de la répression de l'expression du miR-16 par FLT3-ITD observée dans les lignées se vérifierait également chez les patients, d'autres échantillons sont cependant nécessaires pour vérifier cette tendance.

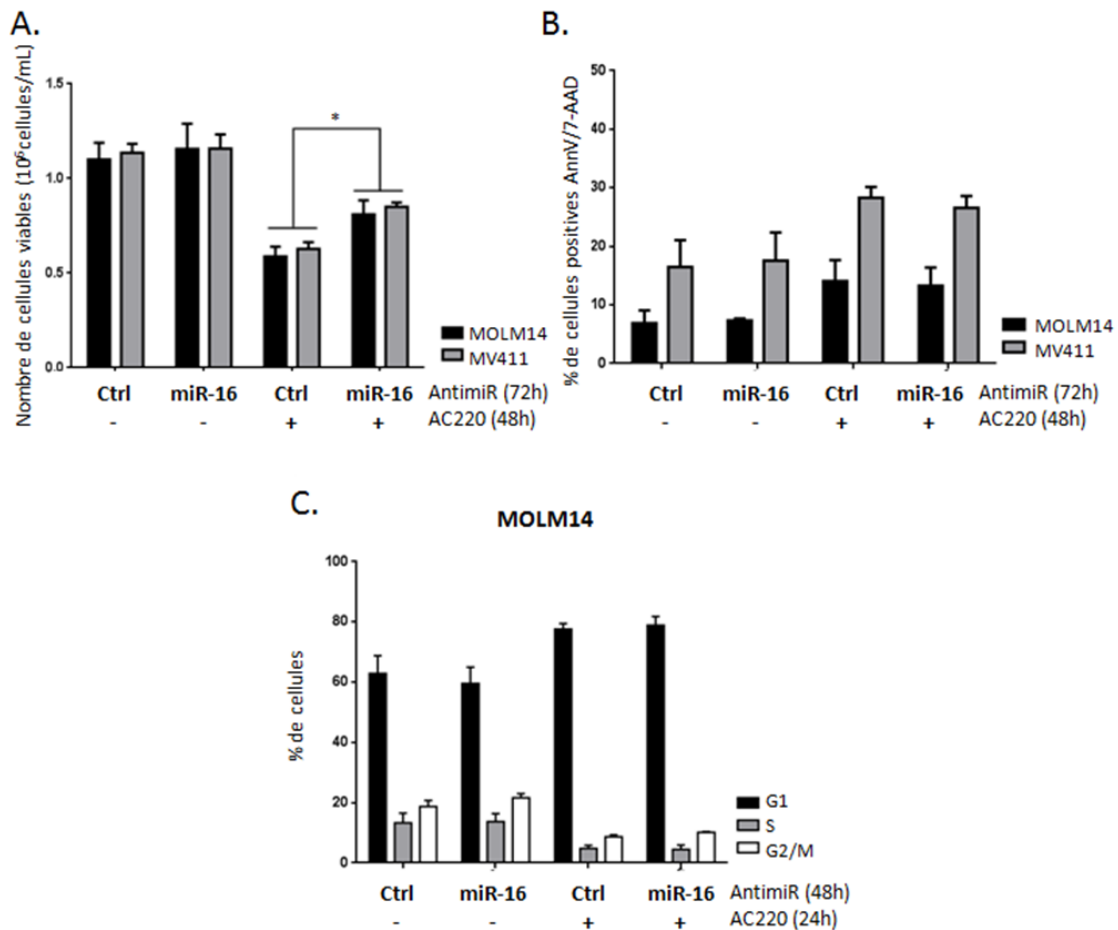


Figure 35. Le miR-16 est un acteur de la régulation de la prolifération en aval de FLT3-ITD

A. Restauration du nombre de cellules viables par l'inhibition du miR-16 après traitement à l'AC220 dans les lignées MOLM14 et MV411. B. Restauration de la proportion de cellules apoptotiques par l'inhibition du miR-16 après traitement à l'AC220 dans les lignées MOLM14 et MV411. C. Restauration de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire par l'inhibition du miR-16 après traitement à l'AC220 dans la lignée MOLM14.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle du miR-16 dans la prolifération induite par FLT3-ITD, et avons observé que son inhibition permettait de restaurer partiellement le défaut de prolifération induit par l'AC220 (Figure 35.A), indiquant que la répression de l'expression du miR-16 est une des voies par lesquelles FLT3-ITD induit la prolifération des cellules leucémiques. L'AC220 induit une augmentation de l'apoptose dans les cellules FLT3-ITD, qui n'est pas contrée par l'inhibition du miR-16 (Figure 35.B). Ceci pourrait expliquer que l'inhibition du miR-16 ne restaure que partiellement le compte de cellules, si son effet est uniquement sur la prolifération et le cycle cellulaire. Cependant, l'étude de la répartition du cycle montre que l'inhibition du miR-16 ne lève pas le blocage en G1

induit par l'AC220 (Figure 35.C), le mécanisme exact de régulation de la prolifération des cellules FLT3-ITD par le miR-16 reste donc encore à établir.

b) La surexpression du micro-ARN-16 induit la différenciation des cellules FLT3-ITD

Après la prolifération, nous nous sommes posé la question d'un potentiel rôle du miR-16 dans la différenciation des cellules leucémiques FLT3-ITD. Nous avons surexprimé le pré-miR-16 dans nos lignées cellulaires à une concentration n'induisant pas de mort cellulaire (10nM au lieu de 70nM dans les expériences précédentes) et avons observé après 72h leur état de différenciation grâce à plusieurs marqueurs en cytométrie en flux. Nous avons constaté que la surexpression du miR-16 induit une augmentation du marqueur CD11b, marqueur précoce de la différenciation granulomonocytaire, dans les lignées MOLM14 et MV411, ainsi que dans la lignée MOLM14-TKD mais pas la lignée OCI-AML3 (Figure 36.A), indiquant un début de différenciation. Afin de préciser la voie de différenciation empruntée par les cellules, nous avons également observé les marqueurs de différenciation plus tardifs CD14 et CD15. Nous avons constaté une légère augmentation du marqueur CD14 dans les lignées MOLM14 et MV411 (Figure 36.B), mais pas d'effet de la surexpression du miR-16 sur le marqueur CD15 (Figure 36.C), ce qui nous amène à conclure que la surexpression du miR-16 oriente les cellules FLT3-ITD dans une différenciation monocytaire. Cependant, nous avons observé ces marqueurs 72h après la transfection, contraints par le côté transitoire d'une expression par transfection, et il serait peut-être plus judicieux de pouvoir les observer après des temps plus long (à 5 ou 6 jours) pour obtenir des résultats plus tranchés, par exemple en transduisant le miR-16 dans un vecteur lentiviral comme nous l'avons fait pour les échantillons primaires de patients.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes de différenciation induits par le miR-16. Une de ses cibles identifiées est le facteur de transcription PU.1 (Moon et al, 2014), régulateur de la différenciation monocyttaire. Nous n'avons cependant pas observé de variation de son niveau

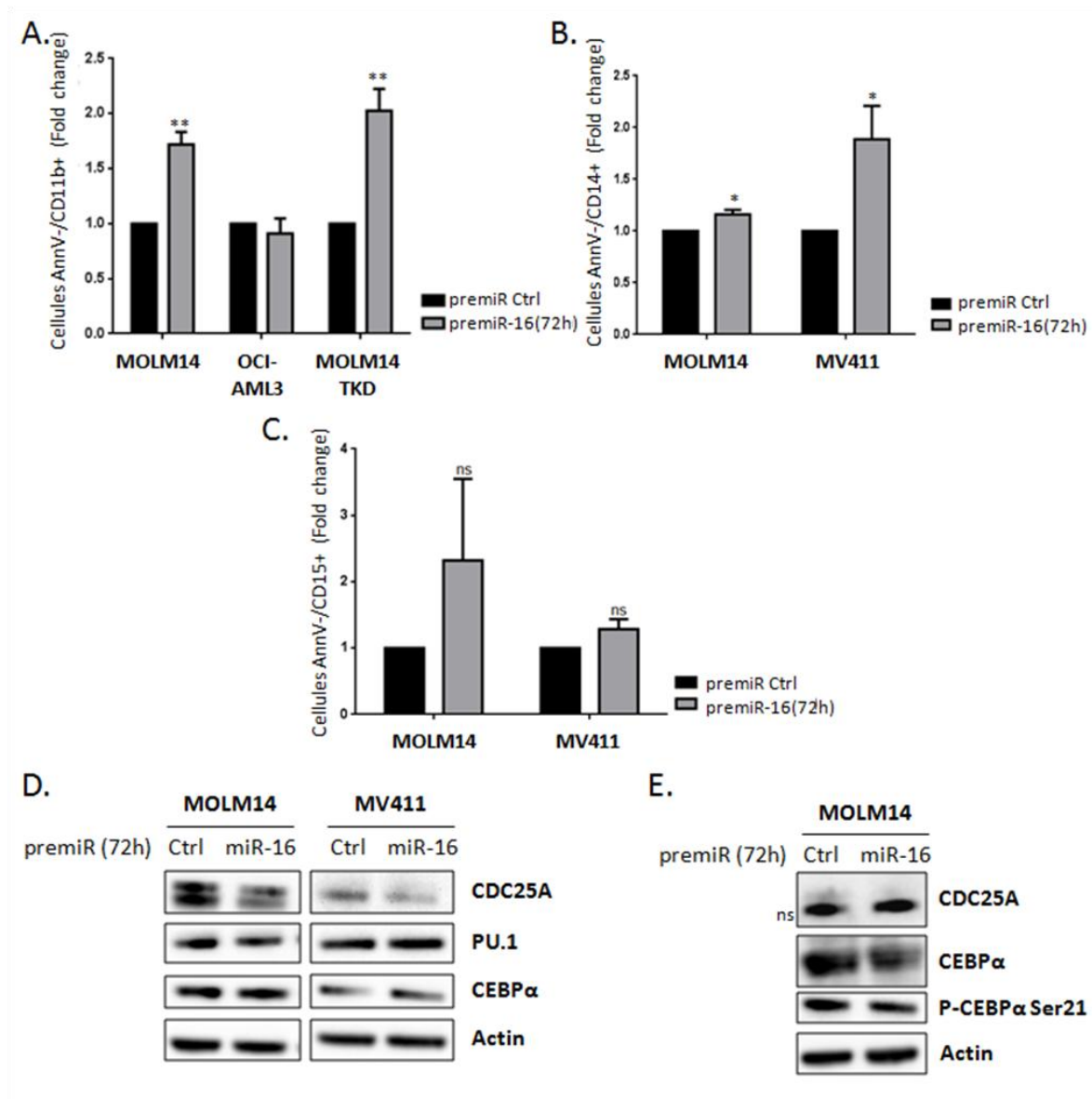


Figure 36. La surexpression du micro-ARN-16 induit la différenciation monocyttaire des cellules FLT3-ITD

A. Compte par cytométrie en flux du nombre de cellules viables positives pour CD11B B. CD14 ou C. CD15. D. Analyse du niveau de PU.1 et C/EBPα dans les lignées MOLM14 et MV411 après surexpression du miR-16. E. Analyse de la phosphorylation du résidu Ser21 de C/EBPα dans la lignée MOLM14 après surexpression du miR-16.

d'expression en réponse à la surexpression du miR-16, ni de l'autre facteur de transcription impliqué dans la granulo-monopoïèse C/EBPα (Figure 36.D). Nous n'avons pas non plus observé de variation de la phosphorylation inhibitrice sur le résidu Ser21 de C/EBPα (Figure 36.E), variation qui était pourtant observée dans la différenciation induite par l'inhibition de CDC25A (Bertoli et al, 2015). Il semblerait donc que la répression de l'expression de CDC25A ne soit pas la voie principale par laquelle le miR-16 induise la différenciation des cellules leucémiques.

III. Manuscrit

“STAT5-dependent regulation of CDC25A by miR-16 controls proliferation and differentiation in FLT3-ITD acute myeloid leukemia”

Gabrielle Sueur^{1,2}, Alison Boutet^{1,2}, Mathilde Gotanègre¹, Véronique Mansat- De Mas^{1,2,3,5}, Arnaud Besson⁴, Stéphane Manenti^{1,2,*} and Sarah Bertoli^{1,2,5,6*}.

(* equal participation; co-corresponding author)

¹Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), INSERM U1037, CNRS ERL5294, University of Toulouse, France

²Equipe labellisée La Ligue contre le Cancer 2016, Toulouse, France

³Laboratoire d'hématologie, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole

⁴ Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, UPS and CNRS, Toulouse, France.

⁵Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

⁶ Service d'hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole (IUCT-O), Toulouse, France

Abstract

We recently identified the CDC25A phosphatase as a key actor in proliferation and differentiation in acute myeloid leukemia which expresses the FLT3-ITD mutation. In this paper we demonstrate that CDC25A level is controlled by a complex STAT5/miR-16 transcription and translation pathway working downstream of this receptor. First, we established by CHIP analysis that STAT5 is directly involved in FLT3-ITD-dependent *CDC25A* gene transcription. In addition, we determined that miR-16 expression is repressed by FLT3-ITD activity, and that STAT5 participates in this repression. In accordance with these results, miR-16 expression was significantly reduced in a panel of AML primary samples carrying the FLT3-ITD mutation when compared with FLT3wt cells. The expression of a miR-16 mimic reduced CDC25A protein and mRNA levels, and RNA interference-mediated down modulation of miR-16 restored CDC25A expression in response to FLT3-ITD inhibition. Finally, decreasing miR-16 expression partially restored the proliferation of cells treated with the FLT3 inhibitor AC220, while the expression of miR-16 mimic stopped this proliferation and induced monocytic differentiation of AML cells. In summary, we identified a FLT3-ITD/STAT5/miR-16/CDC25A axis essential for AML cell proliferation and differentiation.

Le manuscrit complet est disponible en annexe, il a été soumis à la revue Haematologica le 10 Mai 2019.

IV. Résultats supplémentaires

A. Importance de Bcl2 dans le modèle FLT3-ITD

a) Régulation de l'expression de Bcl2 par FLT3-ITD

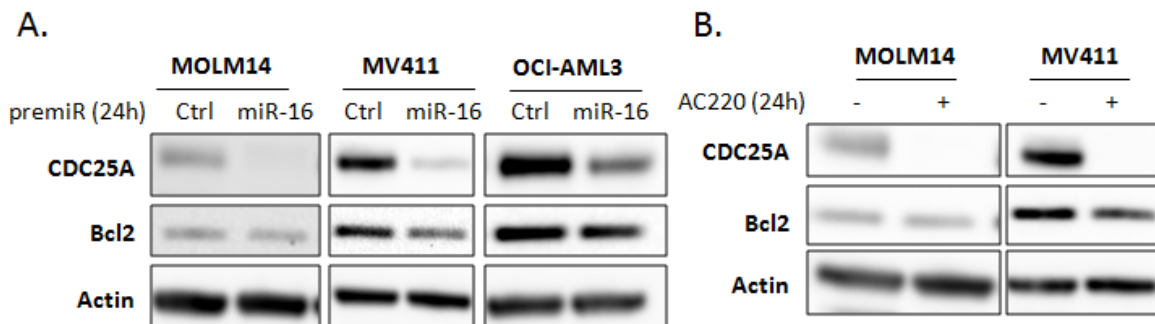


Figure 37. Régulation du niveau de Bcl2 par le micro-ARN-16 et FLT3-ITD

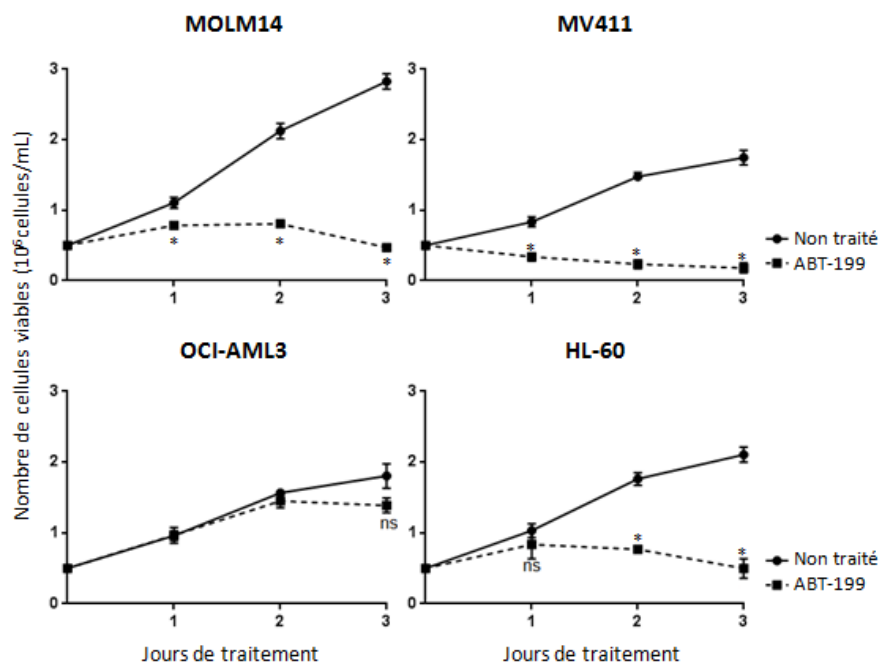
A. Analyse du niveau de Bcl2 après surexpression du miR-16 dans les lignées MOLM14, MV411, et OCI-AML3 ou B. inhibition de FLT3 dans les lignées MOLM14 et MV411.

Etant donné qu'il est peu probable que CDC25A soit la seule cible du miR-16 impliquée dans ses fonctions dans la LAM FLT3-ITD, nous avons cherché d'autres cibles du miR-16 pouvant être pertinentes dans le contexte des LAM. Le premier candidat à nous intéresser a été la protéine anti-apoptotique Bcl2, dont l'importance dans les LAM a été très récemment illustrée par l'efficacité de son inhibiteur le venetoclax chez les patients âgés en association avec l'azacitidine ou la cytarabine à faible dose (DiNardo et al, 2018 et Lin et al, 2016). Nous avons tout d'abord transfecté nos lignées leucémiques avec le pré-miR-16, et constaté que si la surexpression du miR-16 semblait induire une diminution (légère mais reproductible) de Bcl2, elle était nettement moins marquée que celle de CDC25A (Figure 37.A). Ceci peut s'expliquer par la durée de demi-vie de Bcl2 (environ 20h), nettement plus longue que celle de CDC25A. L'inhibition de FLT3 dans les lignées FLT3-ITD conduit à des résultats similaires, ce qui semblerait indiquer que la répression du miR-16 serait la seule voie de régulation de Bcl2 en aval de CDC25A, cependant il serait intéressant de répéter ces deux expériences sur des temps plus longs.

b) Impact de l'inhibition de Bcl2 dans les cellules leucémiques FLT3-ITD

Au vu de l'importance de Bcl2 dans la survie cellulaire, nous nous sommes demandé si son inhibition pouvait reproduire les effets de la surexpression du miR-16 dans les cellules leucémiques (Figure 38.A). L'inhibition de Bcl2 par l'ABT-199 (venetoclax) inhibe fortement la croissance des lignées FLT3-ITD, mais n'a pas d'effet dans notre lignée contrôle OCI-AML3, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en surexprimant le miR-16. Cependant, une autre lignée exprimant le récepteur sauvage, la lignée HL-60 a montré une sensibilité accrue à l'ABT-199, il serait donc intéressant d'évaluer sa sensibilité à la surexpression du miR-16, ces cellules n'étant pas sensibles à l'inhibition de CDC25A (Bertoli et al, 2015).

A.



B.

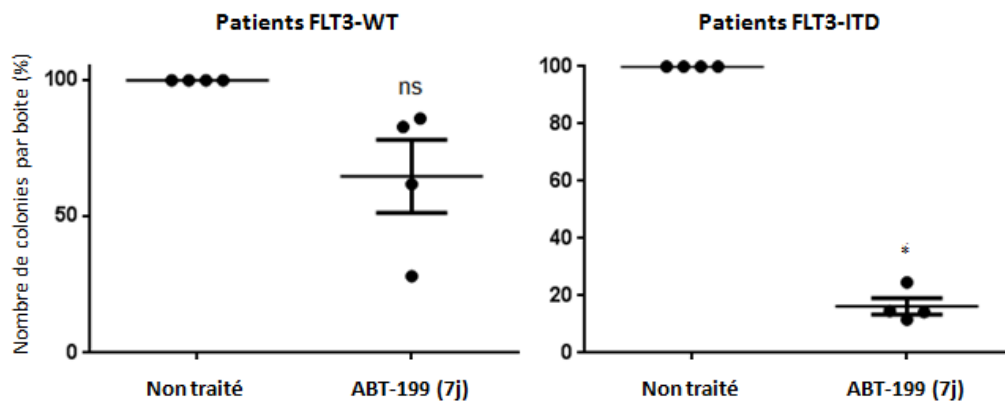


Figure 38. L'inhibition de Bcl2 réduit drastiquement la prolifération des cellules leucémiques FLT3-ITD

A. Impact d'un traitement à l'ABT-199 sur les lignées MOLM14, MV411, OCI-AML-3, et HL-60. B. Impact de l'ABT-199 sur le potentiel clonogénique de cellules primaires de patients FLT3-WT ou ITD.

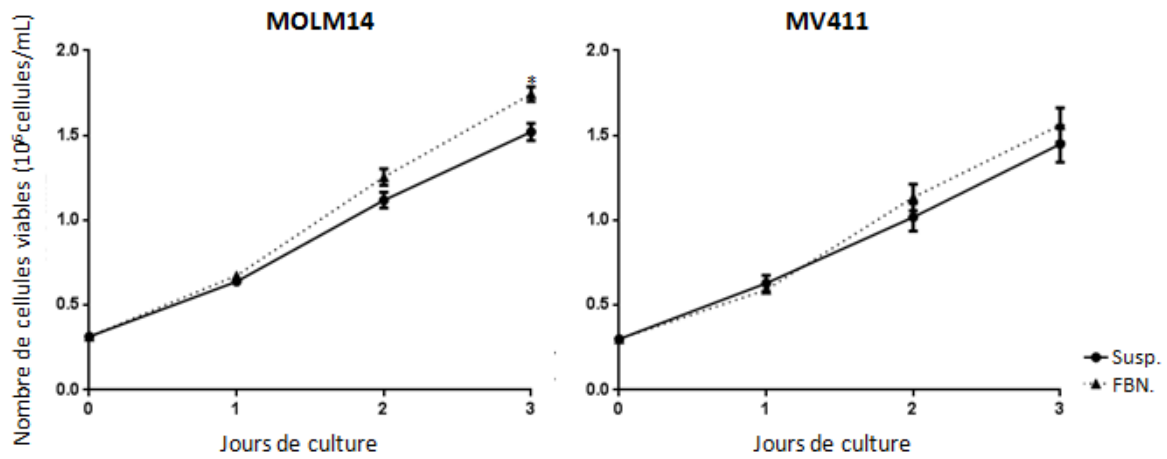
Nous avons également évalué la sensibilité de cellules primaires à l'ABT-199 en réalisant des tests de clonogénie en milieu semi-solide. Les échantillons de patients exprimant FLT3-ITD sont extrêmement sensibles à l'inhibition de Bcl2, en revanche les patients exprimant le récepteur sauvage ne présentent qu'une sensibilité modérée, voire presque nulle (Figure 38.B), ce qui illustre une importance majeure de l'activité de Bcl2 dans les leucémies FLT3-ITD.

B. Impact de l'adhésion cellulaire sur les cellules FLT3-ITD

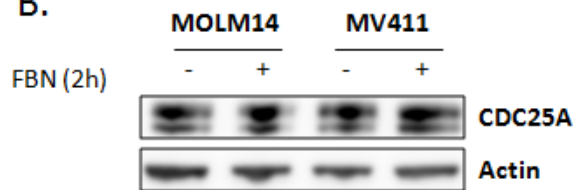
Le travail de Fernandez-Vidal et al a montré dans différentes lignées de LAM que la culture en adhésion sur de la fibronectine induisait une surexpression de CDC25A causant une hausse de la prolifération des cellules leucémiques (Fernandez-Vidal et al, 2006). Nous nous sommes donc intéressés à l'impact de la culture en adhésion sur la prolifération de nos cellules : la culture en adhésion sur fibronectine semble accélérer légèrement la croissance des MOLM14 (qui ont déjà un rythme de prolifération très soutenu), mais n'a pas d'effet visible sur les MV411 (Figure 39.A). En ce

qui concerne l'expression de CDC25A, nous n'avons pas vu d'effet de la fibronectine, que ce soit sur un temps de culture court (Figure 39.B) ou long (Figure 39.C). Nous ne pouvons donc pas ici conclure à un effet de l'interaction avec la fibronectine sur les cellules leucémiques FLT3-ITD.

A.



B.



C.

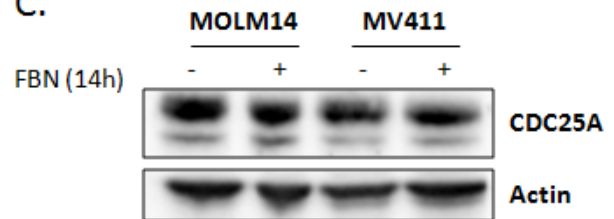


Figure 39. Impact de l'adhésion sur fibronectine sur la prolifération et le niveau de CDC25A dans les cellules FLT3-ITD
 A. Impact de la culture sur fibronectine (FBN) sur la prolifération des lignées MOLM14 (gauche) et MV411 (droite). B. Impact de la culture sur fibronectine (FBN) en temps court ou long C. sur le niveau de CDC25A dans les lignées MOLM14 et MV411.

V. Conclusion des résultats

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un mécanisme de régulation original de CDC25A en aval du récepteur oncogénique FLT3-ITD. En effet, nous avons ici pour la première fois identifié STAT5 comme régulateur transcriptionnel direct de CDC25A, en aval de FLT3-ITD, mais avons également décrit une régulation indirecte de CDC25A par STAT5, impliquant la répression de l'expression du micro-ARN-16. Cet axe de régulation semble par ailleurs spécifique aux cellules FLT3-ITD.

L'identification du miR-16 comme régulateur négatif de CDC25A dans ce modèle nous a conduits à explorer son rôle dans les LAM FLT3-ITD, et nous avons démontré que la répression de son expression par FLT3/STAT5 est nécessaire à la prolifération et au blocage de différenciation des cellules leucémiques, et ce même dans une lignée résistante aux inhibiteurs de FLT3 de type II, ce qui souligne la pertinence thérapeutique potentielle de l'inhibition de ses cibles ou de sa réexpression dans les LAM FLT3-ITD. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à sa cible Bcl2, et avons établi que son activité était nécessaire à la survie et à la croissance des lignées et cellules primaires FLT3-ITD, alors que son inhibition avait un impact bien plus faible dans les cellules FLT3-WT, ce qui pourrait suggérer que le statut de FLT3 pourrait être pris en compte chez les patients pour déterminer s'ils bénéficieraient d'un traitement utilisant le venetoclax, un inhibiteur de Bcl2 déjà utilisé aux Etats-Unis chez les patients non éligibles à la chimiothérapie intensive.

L'identification du miR-16 comme acteur clé de la biologie des LAM FLT3-ITD ouvre la porte à de nombreuses perspectives, car il possède de nombreuses cibles pertinentes dans ce modèle, et ces cibles sont autant de candidats intéressants pour une approche thérapeutique.

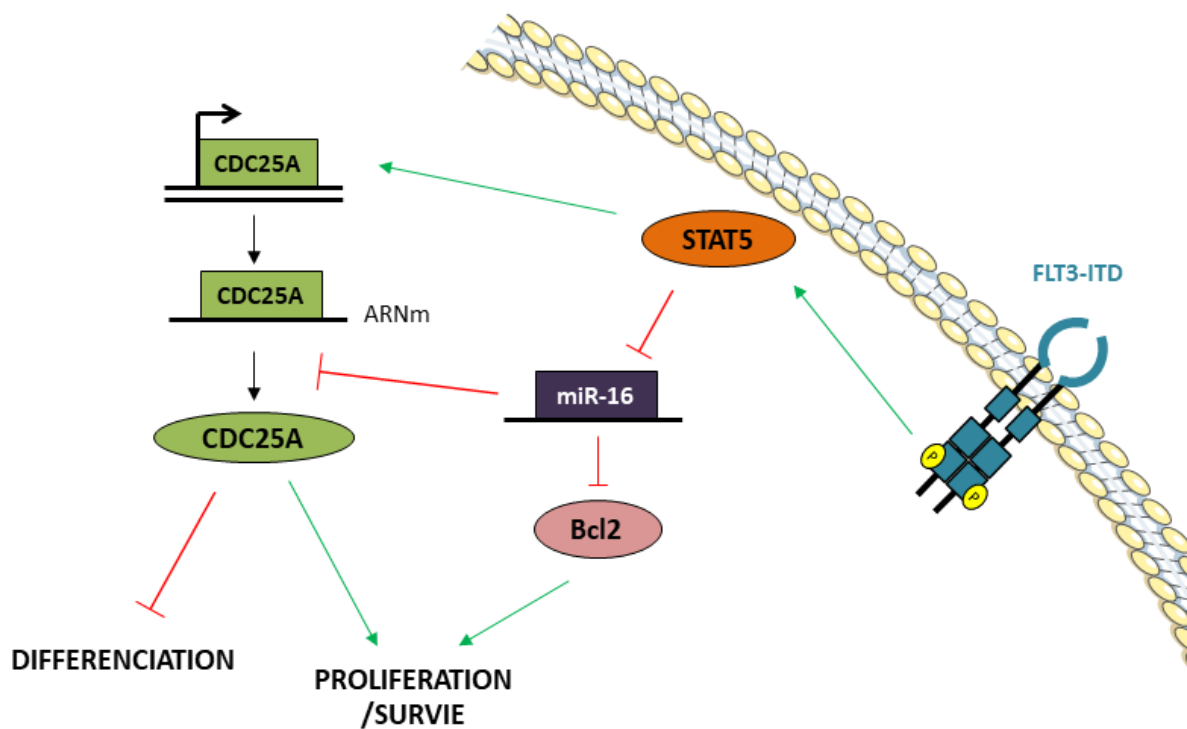


Figure 40. Résumé schématique des résultats obtenus au cours de cette thèse

FLT3-ITD contrôle l'expression de CDC25A à différents niveaux (transcription et traduction). Le miR-16 est un intermédiaire de cette voie de régulation et module la différenciation et la prolifération des cellules leucémiques, probablement via plusieurs de ses cibles.

DISCUSSION GENERALE

Lors de ce travail de thèse, nous avons étudié les mécanismes régulant l'expression et la traduction de l'ARNm de CDC25A, régulateur clé de la prolifération et de la différenciation cellulaire en aval de FLT3-ITD (Bertoli et al, 2015), dans les LAM portant la mutation FLT3-ITD.

Nous avons tout d'abord localisé le facteur de transcription STAT5 au niveau du promoteur proximal de CDC25A dans nos lignées leucémiques, et démontré que son activité est essentielle pour la transcription du gène *CDC25A* en aval du récepteur FLT3-ITD, identifiant pour la première fois STAT5 comme un régulateur transcriptionnel direct de CDC25A. Une régulation transcriptionnelle de CDC25A par le facteur STAT3 avait déjà été décrite (Barré et al, 2005) : STAT3 collabore avec c-myc, un autre régulateur transcriptionnel connu de CDC25A (Galaktionov et al, 2006), pour activer la transcription de CDC25A. L'oncogène c-myc est surexprimé dans des échantillons de patients atteints de LAM FLT3-ITD, par rapport aux patients ne portant pas la mutation (Li et al, 2014), et FLT3-ITD favorise l'expression de c-myc tout en réprimant celle de ses antagonistes (Basit et al, 2018), il serait donc intéressant de vérifier si dans notre modèle STAT5 agit seul ou nécessite la collaboration de c-myc ou d'autres facteurs de transcription pour induire la transcription de *CDC25A*. L'activité du promoteur de CDC25A peut également être réprimée par STAT3, en collaboration avec Rb en réponse au stress oxydatif (Barré et al, 2005) ou bien avec E2F1 et p21 en réponse aux dommages à l'ADN (Vigneron et al, 2006). Un rôle de répression de la transcription impliquant des modifications épigénétiques ayant déjà été décrit pour STAT5 (Li et al, 2010 et Mandal et al, 2011), nous pouvons nous demander ici si selon le contexte cellulaire, son rôle dans la transcription de CDC25A peut aussi être un rôle de répresseur plutôt que d'activateur.

Nous avons également décrit une régulation post-transcriptionnelle de CDC25A en aval de FLT3-ITD : le récepteur muté réprime l'expression du micro-ARN-16, un régulateur négatif de l'ARNm de CDC25A. Le ciblage de l'ARNm de CDC25A par le miR-16 a été décrit pour la première fois par Pothof et al en 2009, dans un contexte de réponse aux dommages à l'ADN causés par les UV. Les auteurs ont montré par expériences de rapporteur luciférase que le miR-16 pouvait lier directement l'ARNm de CDC25A *via* les deux séquences seed situées dans sa région 3'-UTR (Pothof et al, 2009). Le miR-16 a également été décrit comme régulateur négatif de l'expression de CDC25A dans le gliome (Krell et al, 2018), et nous montrons dans ce travail que la régulation négative de CDC25A par le miR-16 constitue une réponse à l'inhibition du récepteur oncogénique FLT3-ITD. Pothof et al décrivent une régulation de CDC25A par le miR-16 impliquant la répression de l'expression de son ARNm, alors que nos résultats suggèrent plutôt que le miR-16 induit par l'inhibition de FLT3-ITD régule CDC25A en inhibant sa traduction. Néanmoins des résultats non publiés obtenus au laboratoire indiquent que la forte surexpression du miR-16 dans les lignées LAM FLT3-ITD peut induire une diminution du niveau d'ARNm de CDC25A, le niveau du miR-16 ainsi que le contexte influent donc peut-être sur son mode d'action au niveau de ses ARNm cibles.

Nous avons montré que la répression de l'expression du miR-16 en aval de FLT3-ITD passe par le facteur de transcription STAT5. Une régulation de l'expression de miR-16 par STAT5 a déjà été décrite dans un modèle de syndrome myéloprolifératif (Li et al, 2010) : STAT5 réprime l'expression de miR-15b/16-2 en se liant au promoteur de leur cluster et en inhibant la transcription. La présence de STAT5 au promoteur d'un des deux clusters du miR-16 pourrait se vérifier facilement grâce à une

expérience de ChIP, cependant nous avons montré que l'inhibition de FLT3-ITD ne modulait que l'expression de miR-16, pas celle de miR-15b ni de miR-15a. Il semblerait donc que la régulation du miR-16 par FLT3-ITD/STAT5 ne passe pas par la répression de la transcription d'un des deux pri-miR-15/16, mais peut-être plutôt par la régulation de la maturation du miR-16. Kim et al ont démontré la répression de l'expression du miR-16 par FLT3-ITD en exprimant le récepteur muté dans la lignée murine FDC-P1 et comparant l'expression des micro-ARN entre les cellules FDC-P1 contrôle et FDC-P1-ITD (Kim et al, 2012), d'après leurs résultats publiés, miR-15a et b ne faisaient pas partie des miR dont l'expression est modifiée par FLT3-ITD, ce qui confirme nos résultats. A notre connaissance, un mécanisme de régulation différentielle du miR-15 et du miR-16 n'a jamais été décrit, mais des niveaux d'expression différents de miR-15a et miR-16-1 ont été décrits chez des jeunes patients atteints de LAM (Moreno et al, 2014). Il est intéressant de noter que cette étude démontre que l'expression de miR-15a/16-1 ne dépend pas de l'expression de leur gène cluster, DLEU2, renforçant une fois de plus l'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle des miR-15 et 16. Les séquences matures du miR-16-1 et 2 étant identiques, il serait intéressant de quantifier le niveau de leurs pri-miR et pré-miR respectifs, afin de déterminer si FLT3-ITD régule l'expression d'une séquence du miR-16 ou des deux, et de comprendre plus précisément à quel niveau a lieu cette régulation.

Le travail de Kim et al identifie la kinase Pim1, acteur essentiel de la signalisation oncogénique induite par FLT3-ITD, comme cible directe du miR-16 (Kim et al, 2012). Nos résultats montrent bien une diminution de Pim1 après l'inhibition de FLT3-ITD dans les lignées MOLM14 et MV411, mais cette expression n'est pas restaurée par l'inhibition du miR-16 (Figure 32.C), suggérant que la régulation de Pim1 en aval de FLT3-ITD ne dépend pas du miR-16 dans notre modèle. Ces différences de résultats pourraient s'expliquer par la différence des modèles utilisés : nous avons utilisé des lignées humaines dérivées de LAM FLT3-ITD, alors que Kim et al ont travaillé sur une lignée murine transduite avec le récepteur muté, ce qui montre bien qu'un miR ne régule pas toutes ses cibles de façon similaire selon le contexte cellulaire. De même, notre équipe a montré que l'expression de Chk1, une autre cible connue du miR-16, n'était pas affectée par l'inhibition de FLT3-ITD (Yuan et al, leukemia 2013), le miR-16 ne doit donc réguler qu'une partie de ses cibles, dont CDC25A, en aval de FLT3-ITD. Peu de choses sont encore connues sur les mécanismes qui amènent un miR à réguler préférentiellement certaines de ses cibles selon le contexte. Un article paru en 2012 a identifié une modification post-transcriptionnelle (la méthylation d'une adénosine) des ARNm fortement associée aux sites de liaison des miR (Meyer et al, 2012), la réponse à cette question se situe donc peut-être dans l'étude des modifications épigénétiques des ARNm.

La surexpression du miR-16 dans les cellules leucémiques FLT3-ITD reproduit les effets de l'inhibition de CDC25A : un arrêt de prolifération et une induction de la différenciation des cellules dans la voie monocyttaire. Les travaux montrant une induction de la différenciation par l'inhibition de FLT3-ITD (Sexauer et al, 2012, Radomska et al, 2006 et 2012) montrent plutôt une différenciation de type granulocytaire, cependant les travaux de Sexauer et al ont été réalisés sur des cellules leucémiques en co-culture avec des cellules stromales, là où nos expériences ont été réalisées en suspension, le micro-environnement joue donc très certainement un rôle dans l'orientation des cellules leucémiques dans les différentes voies de la différenciation hématopoïétique. De plus, Radomska et

al décrivent un blocage de différenciation causé par la voie ERK (Radomska et al, 2006), alors que nos travaux et ceux de Bertoli et al s'intéressent essentiellement à la signalisation en aval de STAT5, ce qui peut également expliquer la différence dans les résultats obtenus. Par ailleurs les lignées MOLM14 et MV411 que nous avons utilisées dérivent toutes deux de LAM monoblastiques, une catégorie où la mutation FLT3-ITD est souvent représentée (Muñoz et al, 2003), et sont donc déjà partiellement engagées dans la différenciation monocytaire.

D'après Radomska et al, l'inhibition de la différenciation par FLT3-ITD est due à une phosphorylation inhibitrice sur le résidu Ser21 du facteur de transcription régulateur de la différenciation granulo-monocytaire C/EBP α (Radomska et al, 2006 et 2012). L'inhibition de CDC25A induit également une diminution de cette phosphorylation inhibitrice associée à la différenciation des cellules FLT3-ITD (Bertoli et al, 2015), mais nous n'avons pas vu de variation de la phosphorylation ou du niveau de C/EBP α lors de la différenciation induite par la surexpression du miR-16. Si le miR-16 régule CDC25A en aval de FLT3-ITD, la différenciation induite par le miR-16 passe donc probablement en partie par la régulation d'une autre de ses cibles.

Nous avons vu dans l'introduction de cette thèse que le miR-16 avait pour cible plusieurs facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse (Moon et al, 2014, Frasca et al, 2015, Sullivan et al, 2015). Un candidat particulièrement intéressant parmi ces cibles est le facteur de transcription PU.1 (Moon et al, 2014), régulateur crucial de la monopoïèse, cependant aucune variation de son niveau n'a été observée en réponse à la surexpression du miR-16. Le miR-15a/16-1 est surexprimé dans les cellules leucémiques en réponse au traitement par l'agent différenciant acide tout trans-rétinoïque, et cette surexpression participe au processus de différenciation (Gao et al, 2011), cependant, aucun mécanisme expliquant le rôle du miR-16 dans la différenciation des cellules leucémiques n'a été proposé. Un autre facteur de transcription essentiel à la différenciation granulo-monocytaire est le facteur RUNX1, qui régule à la fois l'expression de PU.1 et de C/EBP α . RUNX1 est surexprimé en aval de FLT3-ITD (Hirade et al, 2016 et Behrens et al, 2017), il coopère avec le récepteur muté pour induire une LAM dans un modèle murin, et est impliqué dans le blocage de différenciation des cellules leucémiques (Behrens et al, 2017). Aucun lien fonctionnel n'a été établi entre miR-16 et RUNX1, mais le logiciel TargetScan (Agarwal et al, 2015) prédit un site de liaison des miR de la famille miR-15 dans la région 3'-UTR de l'ARNm de RUNX1, il est donc envisageable que la régulation de l'expression de RUNX1 soit un mécanisme de régulation de la différenciation par le miR-16.

Une autre cible connue du miR-16 pour laquelle un rôle dans la différenciation des cellules leucémiques a été décrit est la kinase CDK6. En effet, il a été montré que CDK6 inhibait la différenciation monocytaire des cellules leucémiques (Chen et al, 2015), et des travaux ont démontré l'importance de cette kinase dans la transformation des cellules par FLT3-ITD : son expression est activée par le récepteur muté (Lopez et al, 2016), et elle est impliquée dans une boucle de rétrocontrôle positif en régulant positivement la transcription de FLT3 et PIM1 (Uras et al, 2016). Cependant, aucun travail n'a encore identifié CDK6 comme acteur du blocage de la différenciation des cellules leucémiques en aval de FLT3-ITD, et CDK6 semble une piste intéressante pour expliquer la différenciation induite par le miR-16.

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'un site CCAAT a été identifié dans le promoteur du cluster miR-15a/16-1 (Chen et al, 2016), ce site est reconnu par les facteurs de transcription de la famille C/EBP. L'étude en question décrit une activation de la transcription de ce cluster par le facteur C/EBP

β , mais on peut imaginer que C/EBP α pourrait également activer la transcription du miR-15a/16-1 dans notre contexte, établissant une boucle d'amplification du signal pro-différenciant lors de la différenciation granulo-monocytaire.

En dehors du travail montrant que l'expression du miR-16 n'est pas corrélée à l'expression de son gène cluster DLEU2 chez les patients atteints de LAM pédiatrique (Moreno et al, 2014), très peu de choses sont encore connues sur l'expression du miR-16 dans les LAM. Nous montrons ici sur des échantillons issus d'une petite cohorte de patients que le miR-16 semble sous-exprimé chez les patients présentant la mutation FLT3-ITD. De plus nous avons montré que les cellules leucémiques FLT3-ITD sont, contrairement aux cellules FLT3-WT, très dépendantes de la répression de l'expression du miR-16 pour leur prolifération et le blocage de leur différenciation, mettant en évidence un rôle clair de suppresseur de tumeur pour le miR-16 dans les LAM FLT3-ITD.

Le rôle de suppresseur de tumeur du miR-16 a été mis en évidence dans de nombreux cancers, et en particulier dans la LLC, où la répression de son expression et la subséquente expression de l'oncogène Bcl2 est une étape essentielle du développement de la maladie (Pekarsky et al, 2018). En conséquence, des modèles murins ont été développés pour démontrer, avec succès, que la réexpression du miR-15/16 dans la LLC permettait de faire régresser la maladie (Kasar et al, 2012 et Cutrona et al, 2017). S'il était actuellement possible d'utiliser des oligonucléotides chez les patients, le miR-16 représenterait donc un agent thérapeutique de choix dans la LLC, et d'après nos résultats, la réexpression du miR-16 dans les LAM FLT3-ITD représente également une potentielle stratégie thérapeutique très intéressante. Malheureusement, au jour d'aujourd'hui l'utilisation des oligonucléotides en clinique en est encore à ses balbutiements, avec un seul essai clinique de phase I actuellement en cours pour un anti-miR (NCT02580552). Dans le cas de la LLC, l'oncogène principal dérégulé par la répression du miR-15/16 a été clairement identifié : il s'agit de la protéine anti-apoptotique Bcl2, et son inhibiteur, le venetoclax, est désormais utilisé en clinique dans le traitement de cette maladie (Pekarsky et al, 2018). Par conséquent, il nous appartient désormais d'appliquer le même raisonnement dans notre modèle, et d'identifier les cibles du miR-16 qui seraient également des cibles thérapeutiques pertinentes dans le traitement des LAM FLT3-ITD.

Un premier candidat, que nous avons déjà mentionné au cours de cette discussion, est la kinase Chk1. En effet, si l'inhibition de FLT3-ITD n'a pas d'effet sur le niveau de Chk1 (Yuan et al, 2013), des résultats non publiés obtenus au laboratoire montrent que la surexpression du miR-16 dans la lignée MOLM14 diminue drastiquement le niveau de Chk1. Cette kinase représente une cible particulièrement pertinente dans notre modèle dans la mesure où son activité favorise la résistance des cellules FLT3-ITD aux traitements génotoxiques (Yuan et al, 2013).

On peut également citer la kinase CDK6, dont nous avons déjà décrit l'importance en aval de FLT3-ITD et dans le blocage de différenciation des cellules leucémiques un peu plus haut dans la discussion de cette thèse. Un inhibiteur de CDK4/6, le palbociclib, est déjà disponible en clinique dans le traitement du cancer du sein, et est actuellement testé en essai de phase 1/2 dans les LAM présentant un réarrangement chromosomique impliquant le gène MLL (NCT02310243). En effet, CDK6 est surexprimé *via* l'activation de sa transcription par les transcrits de fusion MLL, et son expression est nécessaire au blocage de différenciation de ces cellules leucémiques (Placke et al, 2014). CDK6 étant également activée par CDC25A (Boutros et al, 2006) qui a été décrit comme un

acteur essentiel du blocage de différenciation des cellules FLT3-ITD (Bertoli et al, 2015), il serait extrêmement intéressant d'étudier l'impact du palbociclib sur la différenciation des cellules leucémiques FLT3-ITD, et de déterminer si l'utilisation du palbociclib chez ses patients pourrait représenter un bénéfice en clinique.

Enfin, si Bcl2 est un oncogène essentiel dans la LLC, son importance a également été décrite dans la LAM, notamment dans un contexte d'inhibition de l'expression du miR-16 (Abraham et al, 2017). L'utilisation du venetoclax dans le traitement de cette maladie a d'ailleurs fait l'objet de plusieurs essais cliniques, et son efficacité en combinaison avec l'azacitidine chez les patients âgés et/ou non éligibles à la chimiothérapie intensive a été telle qu'elle lui a valu une approbation accélérée par la FDA en 2018. Des résultats présentés en 2017 au congrès de l'American Society of Hematology indiquent que l'inhibition de l'activité de FLT3-ITD agit en synergie avec le venetoclax sur les cellules leucémiques (Raghuvver et al, 2017), et un essai clinique de phase 1/2 est actuellement en cours pour tester l'efficacité de la combinaison du quizartinib au venetoclax chez les patients présentant des mutations de FLT3 (NCT03735875). Nos résultats montrent une sensibilité extrêmement marquée des cellules leucémiques FLT3-ITD au venetoclax par rapport aux cellules FLT3-WT, notamment dans des tests clonogéniques réalisés avec des échantillons primaires de patients. Bcl2 apparaît donc comme une cible thérapeutique particulièrement judicieuse dans les LAM FLT3-ITD.

Un facteur récurrent de résistance aux inhibiteurs de Bcl2 est l'expression d'un autre membre de sa famille : la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Bose et al, 2017). Il a été démontré que l'inhibition pharmacologique de Mcl-1 pouvait sensibiliser les cellules leucémiques au venetoclax (Ramsey et al, 2018), et la combinaison du venetoclax avec un inhibiteur de Mcl-1 est actuellement testée en essai clinique de phase I dans la LAM (NCT03672695). Mcl-1 est d'ailleurs une cible de miR-16 décrite dans la LAM (Abraham et al, 2017), la surexpression du miR-16 dans les cellules leucémiques devrait donc pallier aux résistances obtenues en réponse à l'inhibition de Bcl2.

S'il n'est à l'heure actuelle pas possible de surexprimer directement des micro-ARN chez les patients, on peut imaginer que l'inhibition pharmacologique de leurs régulateurs négatifs peut également induire leur surexpression dans les cellules cibles. En aval de FLT3-ITD, nous avons identifié le facteur de transcription STAT5 comme régulateur négatif de l'expression du miR-16. L'importance de STAT5 dans l'hématopoïèse normale et leucémique est établie depuis longtemps (Coffer et al, 2000 et Bunting, 2007), ainsi que son rôle dans la signalisation oncogénique induite par FLT3-ITD (Gerloff et al, 2015 et Nogami et al, 2019). Plus généralement, la voie JAK/STAT fait l'objet de beaucoup d'attentions en cancérologie, et plusieurs approches ont été développées pour en cibler les acteurs principaux (Groner et al, 2017). Un essai clinique de phase II testant l'efficacité d'un inhibiteur de JAK2, le pacritinib, en combinaison avec la cytarabine ou l'azacitidine dans les LAM avait d'ailleurs débuté, mais a dû être arrêté prématurément à cause de contraintes financières (NCT02532010). Un inhibiteur de STAT5, le pimozide, utilisé dans le traitement de troubles psychotiques, a d'ailleurs montré une bonne efficacité sur les cellules de LAM FLT3-ITD, *in vitro* et *in vivo* (Nelson et al, 2012).

Le mode de régulation du miR-16 par STAT5 en aval de FLT3-ITD n'est pas encore bien défini, mais il ne semble pas s'agir de la répression transcriptionnelle directe décrite dans les syndromes myéloprolifératifs (Li et al, 2010). Auquel cas, il pourrait s'avérer intéressant de décrypter de façon encore plus précise la voie de régulation du miR-16 par STAT5, afin de déterminer si des acteurs

intermédiaires encore non identifiés pourraient également être ciblés pour ré-exprimer le miR-16 dans les cellules de LAM FLT3-ITD.

BIBLIOGRAPHIE

Abdi J, Rastgoo N, Li L, Chen W, and Chang H. Role of tumor suppressor p53 and micro-RNA interplay in multiple myeloma pathogenesis. *J Hematol Oncol*. 2017; 10: 169.

Abraham M, Klein S, Bulvik B, Wald H, Weiss ID, Olam D, Weiss L, Beider K, Eizenberg O, Wald O, Galun E, Avigdor A, Benjamini O, Nagler A, Pereg Y, Tavor S, Peled A. The CXCR4 inhibitor BL-8040 induces the apoptosis of AML blasts by downregulating ERK, BCL-2, MCL-1 and cyclin-D1 via altered miR-15a/16-1 expression. *Leukemia*. 2017 Nov;31(11):2336-2346.

Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, Vandenberghe EA, Winship PR, Reilly JT. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol*. 2000 Oct;111(1):190-5.

Adams CM, Eischen CM Histone deacetylase inhibition reveals a tumor-suppressive function of MYC-regulated miRNA in breast and lung carcinoma. *Cell Death Differ*. 2016 Aug;23(8):1312-21.

Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Astrand-Grundström I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 2001 Oct;15(4):659-69.

Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015 Aug 12;4.

Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. TargetScanHuman, prediction of micro-RNA targets. <http://www.targetscan.org>. Consulté le 18.05.2019.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000;404(5) :193–197

Al-Matouq J, Holmes T, Hammiller B, Tran N, Holmes M, Freeman SC, Hansen LA. Accumulation of cytoplasmic CDC25A in cutaneous squamous cell carcinoma leads to a dependency on CDC25A for cancer cell survival and tumor growth. *Cancer Lett*. 2017 Dec 1;410:41-49.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405

Aref S, Fouda M, El-Dosoky E, Menessy A, Mabed M, Saleeb M, Zalata K. c-Myc oncogene and Cdc25A cell activating phosphatase expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology*. 2003 Jun;8(3):183-90

Aressy B, Ducommun B. Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008 Dec;8(8):818-24.

Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, Liang X, Weidhaas JB, Saltzman WM, Slack FJ. Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. 2012 Jun 26;109(26):E1695-704.

Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R, Eichenlaub S, Reindl C, Ellwart JW, Hiddemann W, Spiekermann K. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). Blood 2005 May 1;105(9):3679-85. Epub 2004 Dec 30.

Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, Hasan L, Kappeler A, Brunner T, Vassella E. miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. Cancer Res. 2009 Jul 1;69(13):5553-9.

Barré B, Vigneron A, Coqueret O. The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. J Biol Chem. 2005; 280(16):15673-81.

Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. FEBS Lett. 2001 Feb 16;490(3):117-22

Basit F, Andersson M, Hultquist A. The Myc/Max/Mxd Network Is a Target of Mutated Flt3 Signaling in Hematopoietic Stem Cells in Flt3-ITD-Induced Myeloproliferative Disease. Stem Cells Int. 2018 Oct 21;2018:3286949.

Behrens K, Maul K, Tekin N, Kriebitzsch N, Indenbirken D, Prassolov V, Müller U, Serve H, Cammenga J, Stocking C. RUNX1 cooperates with FLT3-ITD to induce leukemia. J Exp Med. 2017 Mar 6;214(3):737-752.

Ben-Yosef T, Yanuka O, Halle D, Benvenisty N. Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors. Oncogene. 1998 Jul 16;17(2):165-71

T Bertero, C Gastaldi, I Bourget-Ponzio, B Mari, G Meneguzzi, P Barbry, G Ponzio, and R Rezzonico. CDC25A targeting by miR-483-3p decreases CCND–CDK4/6 assembly and contributes to cell cycle arrest. Cell Death Differ. 2013 Jun; 20(6): 800–811.

Bertoli et al, 2015 : Bertoli S, Boutzen H, David L, Larrue C, Vergez F, Fernandez-Vidal A, Yuan L, Hospital MA, Tamburini J, Demur C, Delabesse E, Saland E, Sarry JE, Galcera MO, Mansat-De Mas V, Didier C, Dozier C, Récher C, Manenti S. CDC25A governs proliferation and differentiation of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. Oncotarget. 2015; 6:38061-38078

Bertoli S, Récher C. Nouvelles thérapies ciblées dans les leucémies aiguës myéloïdes. Journal de Biologie Médicale/ Volume 7-Numéro 25 / Avr-Juin 2018

Bertoli S. Targeted therapies in the spotlight, résumé du congrès ISAL 2019 à Munich.

Bhowmick NA¹, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL. TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23;100(26):15548-53.

Birg F¹, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pébusque MJ, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, Birnbaum D. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. Blood 1992 80:2584-2593

Kajal Biswas, Subha Philip, Aditya Yadav, Betty K. Martin, Sandra Burkett, Vaibhav Singh, Anav Babbar, Susan Lynn North, Suhwan Chang, and Shyam K. Sharan. BRE/BRCC45 regulates CDC25A stability by recruiting USP7 in response to DNA damage. *Nat Commun.* 2018; 9: 537.

Böiers C, Buza-Vidas N, Jensen CT, Pronk CJ, Kharazi S, Wittmann L, Sitnicka E, Hultquist A, Jacobsen SE. Expression and role of FLT3 in regulation of the earliest stage of normal granulocyte-monocyte progenitor development. *Blood.* 2010 Jun 17;115(24):5061-8.

Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, D'Urso L, Pagliuca A, Biffoni M, Labbaye C, Bartucci M, Muto G, Peschle C, De Maria R. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* 2008 Nov;14(11):1271-7.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1097-101

Bose P, Gandhi V, Konopleva M. Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. *Leuk Lymphoma.* 2017 Sep;58(9):1-17.

Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol.* 2005 Jul;204(1):280-5.

Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Apr;18(2):185-91.

Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer.* 2007 Jul;7(7):495-507.

Brasel K, McKenna HJ, Morrissey PJ, Charrier K, Morris AE, Lee CC, Williams DE, Lyman SD. Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood.* 1996 Sep 15;88(6):2004-12.

Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwäble J, Buerger H, Müller-Tidow C, Choudhary C, McMahon M, Berdel WE, Serve H. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res.* 2005 Nov 1;65(21):9643-50.

Breitenbuecher F, Markova B, Kasper S, Carius B, Stauder T, Böhmer FD, Masson K, Rönstrand L, Huber C, Kindler T, Fischer T. A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in AML. *Blood.* 2009 Apr 23;113(17):4063-73.

Brenner A, Reikvam H, Lavecchia A, Bruserud Ø. Therapeutic Targeting the Cell Division Cycle 25 (CDC25) Phosphatases in Human Acute Myeloid Leukemia — The Possibility to Target Several Kinases through Inhibition of the Various CDC25 Isoforms. *Molecules.* 2014 Nov; 19(11): 18414–18447.

Brenner A, Reikvam H, Paulsen Rye K, Hagen KM, Lavecchia A, Bruserud Ø. CDC25 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia—A Study of Patient Heterogeneity and the Effects of Different Inhibitors. *Molecules.* 2017 Mar; 22(3): 446.

Brezak MC¹, Valette A, Quaranta M, Contour-Galcera MO, Jullien D, Lavergne O, Frongia C, Bigg D, Kasprzyk PG, Prevost GP, Ducommun B. IRC-083864,

a novel bis quinone inhibitor of CDC25 phosphatases active against human cancer cells. *Int J Cancer*. 2009 Mar 15;124(6):1449-56.

de Bruijn M, Elaine Dzierzak E. Runx transcription factors in the development and function of the definitive hematopoietic system. *Blood* 2017 129:2061-2069

Bunting KD. STAT5 signaling in normal and pathologic hematopoiesis. *Front Biosci*. 2007 May 1;12:2807-20.

Busino L, Donzelli M, Chiesa M, Guardavaccaro D, Ganoth D, Dorrello NV, Hershko A, Pagano M, Draetta GF. Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature*. 2003 Nov 6;426(6962):87-91.

Busino L, Chiesa M, Draetta GF, Donzelli M. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene*. 2004 Mar 15;23(11):2050-6.

Cai CK, Zhao GY, Tian LY, Liu L, Yan K, Ma YL, Ji ZW, Li XX, Han K, Gao J, Qiu XC, Fan QY, Yang TT, Ma BA. miR-15a and miR-16-1 downregulate CCND1 and induce apoptosis and cell cycle arrest in osteosarcoma. *Oncol Rep*. 2012 Nov;28(5):1764-70.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2999-3004

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1793-801.

Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1;105(13):5166-71.

Cangi MG, Piccinin S, Pecciarini L, Talarico A, Dal Cin E, Grassi S, Grizzo A, Maestro R, Doglioni C. Constitutive overexpression of CDC25A in primary human mammary epithelial cells results in both defective DNA damage response and chromosomal breaks at fragile sites. *Int J Cancer*. 2008 Sep 15;123(6):1466-71.

Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, Small D. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*. 1996 Feb 1;87(3):1089-96

Cazales M, Boutros R, Brezak MC, Chaumeron S, Prevost G, Ducommun B. Pharmacologic inhibition of CDC25 phosphatases impairs interphase microtubule dynamics and mitotic spindle assembly. *Mol Cancer Ther.* 2007 Jan;6(1):318-25.

Cimmino A¹, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 27;102(39):13944-9.

Chan SM, Majeti R. Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2013 Dec;98(6):648-57.

Chang CW, Chou HY, Lin YS, Huang KH, Chang CJ, Hsu TC, Lee SC. Phosphorylation at Ser473 regulates heterochromatin protein 1 binding and corepressor function of TIF1beta/KAP1. *BMC Mol Biol.* 2008 Jul 1;9:61.

Chang S, Wang RH, Akagi K, Kim KA, Martin BK, Cavallone L; Kathleen Cuningham Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer (kConFab), Haines DC, Basik M, Mai P, Poggi E, Isaacs C, Looi LM, Mun KS, Greene MH, Byers SW, Teo SH, Deng CX, Sharan SK. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. *Nat Med.* 2011 Sep 25;17(10):1275-82.

Chang KH, Vincent F, Shah K. Deregulated Cdk5 triggers aberrant activation of cell cycle kinases and phosphatases inducing neuronal death. *J Cell Sci.* 2012 Nov 1;125(Pt 21):5124-37.

Chatterjee N, Sanphui P, Kemeny S, Greene LA, Biswas SC. Role and regulation of Cdc25A phosphatase in neuron death induced by NGF deprivation or β -amyloid. *Cell Death Discov.* 2016 Dec 12;2:16083.

Chen X, Prywes R. Serum-induced expression of the cdc25A gene by relief of E2F-mediated repression. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul;19(7):4695-702.

Chen MS, Ryan CE, Piwnicka-Worms H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(21):7488-97

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008 Oct;18(10):997-1006.

Chen H, Lin YW, Mao YQ, Wu J, Liu YF, Zheng XY, Xie LP. MicroRNA-449a acts as a tumor suppressor in human bladder cancer through the regulation of pocket proteins. *Cancer Lett.* 2012 Jul 1;320(1):40-7.

Chen CQ, Chen CS, Chen JJ, Zhou LP, Xu HL, Jin WW, Wu JB, Gao SM. Histone deacetylases inhibitor trichostatin A increases the expression of Dleu2/miR-15a/16-1 via HDAC3 in non-small cell lung cancer. *Mol Cell Biochem.* 2013 Nov;383(1-2):137-48.

Chen MT, Dong L, Zhang XH, Yin XL, Ning HM, Shen C, Su R, Li F, Song L, Ma YN, Wang F¹, Zhao HL, Yu J, Zhang JW. ZFP36L1 promotes monocyte/macrophage differentiation by repressing CDK6. *Sci Rep*. 2015 Nov 6;5:16229.

Chen HH, Lan YF, Li HF, Cheng CF, Lai PF, Li WH, Lin H Urinary miR-16 transactivated by C/EBP β reduces kidney function after ischemia/reperfusion-induced injury. *Sci Rep*. 2016 Jun 14;6:27945.

Chen SS, Tang CH, Chie MJ, Tsai CH, Fong YC, Lu YC, Chen WC, Lai CT, Wei CY, Tai HC, Chou WY¹⁷, Wang SW Resistin facilitates VEGF-A-dependent angiogenesis by inhibiting miR-16-5p in human chondrosarcoma cells. *Cell Death Dis*. 2019 Jan 10;10(1):31.

Chen Z, Zhu Y, Fan X, Liu Y, Feng Q. Decreased expression of miR-184 restrains the growth and invasion of endometrial carcinoma cells through CDC25A-dependent Notch signaling pathway. *Am J Transl Res*. 2019 Feb 15;11(2):755-764.

Chen Y, Li X, Liao H, Leung X, He J, Wang X, Li F, Yue H, Xu W. CFTR mutation compromises spermatogenesis by enhancing miR-15b maturation and suppressing its regulatory target CDC25A. *Biol Reprod*. 2019 Apr 15.

Cheon Y, Lee S. CENP-W inhibits CDC25A degradation by destabilizing the SCF ^{β -TrCP-1} complex at G₂/M. *FASEB J*. 2018 Jun 4:fj201701358RRR.

Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, Fischer T, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H. AML-associated FLT3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*. 2005 Jul 1;106(1):265-73.

Choudhary C, Brandts C, Schwable J, Tickenbrock L, Sargin B, Ueker A, Böhmer FD, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H. Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):370-4.

Choudhary et al, 2009 : doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.019.

Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, Cox J, Reddy PN, Böhmer FD, Gerke V, Schmidt-Arras DE, Berdel WE, Müller-Tidow C, Mann M, Serve H. Mislocalized activation of oncogenic switches downstream signaling outcomes. *Mol Cell*. 2009 Oct 23;36(2):326-39.

Chougule RA, Kazi JU, Rönstrand L. FYN expression potentiates FLT3-ITD induced STAT5 signaling in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2016 Mar 1;7(9):9964-74.

Cittelly DM, Das PM, Salvo VA, Fonseca JP, Burow ME, Jones FE. Oncogenic HER2 Δ 16 suppresses miR-15a/16 and deregulates BCL-2 to promote endocrine resistance of breast tumors. *Carcinogenesis*. 2010 Dec;31(12):2049-57.

Jorge Cortes, Samer Khaled, Giovanni Martinelli, Alexander E. Perl, Siddhartha Ganguly, Nigel Russell, Alwin Krämer, Hervé Dombret, Donna Hogge, Brian A. Jonas, Anskar Yu-Hung Leung, Priyanka Mehta, Pau Montesinos, Markus Radsak, Simona Sica, Meena Arunachalam, Melissa Holmes, Ken Kobayashi, Ruth Namuyinga, Nanxiang Ge, Antoine Yver, Yufen Zhan, Mark J. Levis. QUIZARTINIB SIGNIFICANTLY PROLONGS OVERALL SURVIVAL IN PATIENTS WITH FLT3-INTERNAL TANDEM

DUPLICATION–MUTATED (MUT) RELAPSED/REFRACTORY AML IN THE PHASE 3, RANDOMIZED, CONTROLLED QUANTUM-R TRIAL. EHA Learning Center. Cortes J. Jun 16, 2018; 218882

Coffer PJ¹, Koenderman L, de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2511-22.

Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2017 Sep;17(9):573-590.

Cutrona G, Matis S, Colombo M, Massucco C, Baio G, Valdora F, Emionite L, Fabris S, Recchia AG, Gentile M, Neumaier CE, Reverberi D, Massara R, Boccardo S, Basso L, Salvi S, Rosa F, Cilli M, Zupo S, Truini M, Tassone P, Calabrese M, Negrini M, Neri A, Morabito F, Fais F, Ferrarini M. Effects of miRNA-15 and miRNA-16 expression replacement in chronic lymphocytic leukemia: implication for therapy. *Leukemia*. 2017 Sep;31(9):1894-1904.

D'Alò F, Di Ruscio A, Guidi F, Fabiani E, Greco M, Rumi C, Hohaus S, Voso MT, Leone G. PU.1 and CEBPA expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2008 Sep;32(9):1448-53

Dahl et al, 2003:

Dahl R, Walsh JC, Lancki D, Laslo P, Iyer SR, Singh H, Simon MC. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1 : C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol*. 2003 Oct;4(10):1029-36

Daga RR, Jimenez J. Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth. *J Cell Sci*. 1999 Sep;112 Pt 18:3137-46.

Daver N, Cortes J, Ravandi F, Patel KP, Burger JA, Konopleva M, Kantarjian H. Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. *Blood*. 2015 May 21; 125(21): 3236–3245.

Daver N, Schlenk RF, Russel NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019; 33(2): 299–312.

Dejean E, Renalier MH, Foisseau M, Agirre X, Joseph N, de Paiva GR, Al Saati T, Soulier J, Desjobert C, Lamant L, Prósper F, Felsher DW, Cavallé J, Prats H, Delsol G, Giuriato S, Meggetto F. Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas. *Leukemia*. 2011 Dec;25(12):1882-90.

Demidova AR, Aau MY, Zhuang L, Yu Q. Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control. *J Biol Chem*. 2009 Feb 13;284(7):4132-9.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):231-5

Desterke C, Bilhou-Nabéra C, Guerton B, Martinaud C, Tonetti C, Clay D, Guglielmelli P, Vannucchi A, Bordessoule D, Hasselbalch H, Dupriez B, Benzoubir N, Bourgeade MF, Pierre-Louis O, Lazar V, Vainchenker W, Bennaceur-Griscelli A, Gisslinger H, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC; French Intergroup of Myeloproliferative Disorders; French INSERM; European EUMNET Networks on Myelofibrosis. FLT3-mediated p38-MAPK activation participates in the control of megakaryopoiesis in primary myelofibrosis. *Cancer Res*. 2011 Apr 15;71(8):2901-15.

Di Fusco D, Laudisi F, Dinallo V, Monteleone I, Di Grazia A, Marafini I¹, Troncione E, Colantoni A, Ortenzi A, Stolfi C, Picardo M, Monteleone G. Smad7 positively regulates keratinocyte proliferation in psoriasis. *Br J Dermatol*. 2017 Dec;177(6):1633-1643.

Diamantopoulos MA, Kontos CK, Kerimis D, Papadopoulos IN, Scorilas A. Upregulated miR-16 expression is an independent indicator of relapse and poor overall survival of colorectal adenocarcinoma patients. *Clin Chem Lab Med*. 2017 May 1;55(5):737-747.

DiNardo CD, Bannon SA, Routbort M, Franklin A, Mork M, Armanios M, Mace EM, Orange JS, Jeff-Eke M, Churpek JE, Takahashi K, Jorgensen JL, Garcia-Manero G, Kornblau S, Bertuch A, Cheung H, Bhalla K, Futreal A, Godley LA, Patel KP. Evaluation of patients and families with concern for predispositions to hematologic malignancies within the Hereditary Hematologic Malignancy Clinic (HHMC). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016 Jul; 16(7): 417–428.e2.

DiNardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016 Dec 2;2016(1):348-355

DiNardo CD, Pratz KW, Letai A, Jonas BA, Wei AH, Thirman M, Arellano M, Frattini MG, Kantarjian H, Popovic R, Chyla B, Xu T, Dunbar M, Agarwal SK, Humerickhouse R, Mabry M, Potluri J, Konopleva M, Pollyea DA. Safety and preliminary efficacy of venetoclax with decitabine or azacitidine in elderly patients with previously untreated acute myeloid leukaemia: a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2018 Feb;19(2):216-228.

Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424-447.

Donzelli M, Squatrito M, Ganoth D, Hershko A, Pagano M, Draetta GF. Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J*. 2002 Sep 16;21(18):4875-84

Donzelli S, Mori F, Bellissimo T, Sacconi A, Casini B, Frixia T, Roscilli G, Aurisicchio L, Facciolo F, Pompili A, Carosi MA, Pescarmona E, Segatto O, Pond G, Muti P, Telera S, Strano S, Yarden Y, Blandino G. Epigenetic silencing of miR-145-5p contributes to brain metastasis. *Oncotarget*. 2015 Nov 3; 6(34): 35183–35201.

Dosil M, Wang S, Lemischka IR. Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*. 1993 Oct;13(10):6572-85.

Dozier C, Mazzolini L, Cénac C, Froment C, Burlet-Schiltz O, Besson A, Manenti S. CyclinD-CDK4/6 complexes phosphorylate CDC25A and regulate its stability. *Oncogene*. 2017 Jun 29;36(26):3781-3788.

Drexler HG, Meyer C, Quentmeier H. Effects of FLT3 ligand on proliferation and survival of myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 1999 Mar;33(1-2):83-91.

Drusco A¹, Croce CM ; MicroRNAs and Cancer: A Long Story for Short RNAs. *Adv Cancer Res.* 2017;135:1-24.

Ebihara Y, Tsuji K, Lyman SD, Sui X, Yoshida M, Muraoka K, Yamada K, Tanaka R, Nakahata T. Synergistic action of Flt3 and gp130 signalings in human hematopoiesis. *Blood.* 1997 Dec 1;90(11):4363-8.

Esposito F, Pierantoni GM, Battista S, Melillo RM, Scala S, Chieffi P, Fedele M, Fusco A. Interaction between HMGA1 and retinoblastoma protein is required for adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2009 Sep 18;284(38):25993-6004.

Esteban V, Vázquez-Novelle MD, Calvo E, Bueno A, Sacristán MP. Human Cdc14A reverses CDK1 phosphorylation of Cdc25A on serines 115 and 320. *Cell Cycle.* 2006 Dec;5(24):2894-8.

Eytan M. Stein, Courtney D. DiNardo, Daniel A. Pollyea, Amir T. Fathi, Gail J. Roboz, Jessica K. Altman, Richard M. Stone, Ian W. Flinn, Hagop M. Kantarjian, Robert Collins, Manish R. Patel, Anthony Stein Mikkael A. Sekeres Ronan T. Swords Bruno C. Medeiros Robert D. Knight Sam Agresta Stéphane de Botton Martin S. Tallman ENASIDENIB (AG-221) IN MUTANT-IDH2 RELAPSED OR REFRACTORY ACUTE MYELOID LEUKEMIA (R/R AML): RESULTS OF A PHASE 1 DOSE-ESCALATION AND EXPANSION STUDY. EHA Learning Center. Jun 24, 2017; 181758

Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-CDC25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature.* 2001 Apr 12;410(6830):842-7.

Fathi AT, Arowojolu O, Swinnen I, Sato T, Rajkhowa T, Small D, Marmsater F, Robinson JE, Gross SD, Martinson M, Allen S, Kallan NC, Levis M. A potential therapeutic target for FLT3-ITD AML: PIM1 kinase. *Leuk Res.* 2012 Feb;36(2):224-31.

Feng X, Wu Z, Wu Y, Hankey W, Prior TW, Lei Li, Ganju RK, Shen R, and Zou X. Cdc25A Regulates Matrix Metalloprotease 1 through Foxo1 and Mediates Metastasis of Breast Cancer Cells. *Mol Cell Biol.* 2011 Aug; 31(16): 3457–3471.

Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed Rep.* 2016 Oct; 5(4): 395–402.

Fernandez-Vidal A, Ysebaert L, Didier C, Betous R, De Toni F, Prade-Houdellier N, Demur C, Contour-Galcéra MO, Prévost GP, Ducommun B, Payrastre B, Racaud-Sultan C, Manenti S. Cell adhesion regulates CDC25A expression and proliferation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2006 Jul 15;66(14):7128-35.

Fernandez-Vidal A, Mazars A, Gautier EF, Prévost G, Payrastre B, Manenti S. Upregulation of the CDC25A phosphatase down-stream of the NPM/ALK oncogene participates to anaplastic large cell lymphoma enhanced proliferation. *Cell Cycle.* 2009 May 1;8(9):1373-9. Epub 2009 May 26.

Ferrari S, Gentili C. Maintaining Genome Stability in Defiance of Mitotic DNA Damage. *Front Genet.* 2016 Jul 21;7:128.

Fletcher Jones M, Lal A. MicroRNAs, wild-type and mutant p53: More questions than answers. *RNA Biol.* 2012 Jun 1; 9(6): 781–791.

Foskolou IP, Stellas D, Rozani I, Lavigne MD, Politis PK. Prox1 suppresses the proliferation of neuroblastoma cells via a dual action in p27-Kip1 and Cdc25A. *Oncogene*. 2013 Feb 21;32(8):947-60.

Frasca D¹, Diaz A², Romero M², Ferracci F², Blomberg BB. MicroRNAs miR-155 and miR-16 Decrease AID and E47 in B Cells from Elderly Individuals. *J Immunol*. 2015 Sep 1;195(5):2134-40.

Friedman AD. Transcriptional regulation of myelopoiesis. *Int J Hematol*. 2002 Jun;75(5):466-72

Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K; AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. : *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4372-80.

Fu YR, Liu XJ, Li XJ, Shen ZZ, Yang B, Wu CC, Li JF, Miao LF, Ye HQ, Qiao GH, Rayner S, Chavanas S, Davrinche C, Britt WJ, Tang Q, McVoy M, Mocarski E, Luo MH. MicroRNA miR-21 attenuates human cytomegalovirus replication in neural cells by targeting Cdc25a. *J Virol*. 2015 Jan 15;89(2):1070-82

Galina Gabriely, Thomas Wurdinger, Santosh Kesari, Christine C. Esau, Julja Burchard, Peter S. Linsley, and Anna M. Krichevsky MicroRNA 21 Promotes Glioma Invasion by Targeting Matrix Metalloproteinase Regulators. *Mol Cell Biol*. 2008 Sep; 28(17): 5369–5380.

Ghai V¹, Wang K. Recent progress toward the use of circulating microRNAs as clinical biomarkers. *Arch Toxicol*. 2016 Dec;90(12):2959-2978.

Galaktionov K¹, Jessup C, Beach D. Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev*. 1995 May 1;9(9):1046-58.

Galaktionov K¹, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*. 1996 Aug 8;382(6591):511-7.

Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008 111:2776-2784

Gao SM, Xing CY, Chen CQ, Lin SS, Dong PH, Yu FJ. miR-15a and miR-16-1 inhibit the proliferation of leukemic cells by down-regulating WT1 protein level. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Dec 1;30:110.

Gao SM, Yang J, Chen C, Zhang S, Xing CY, Li H, Wu J, Jiang L. miR-15a/16-1 enhances retinoic acid-mediated differentiation of leukemic cells and is up-regulated by retinoic acid. *Leuk Lymphoma*. 2011 Dec;52(12):2365-71.

Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Liu CG, Schnittger S, Haferlach T, Liso A, Diverio D, Mancini M, Meloni G, Foa R, Martelli MF, Mecucci C, Croce CM, Falini B. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 11;105(10):3945-50.

Gautier EF, Picard M, Laurent C, Marty C, Villeval JL, Demur C, Delhommeau F, Hexner E, Giraudier S, Bonneville N, Ducommun B, Récher C, Laurent G, Manenti S, Mansat-De Mas V. The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2V617F oncogene. *Blood*. 2012 Feb 2;119(5):1190-9

D Gerloff, R Grundler, AA Wurm, D Bräuer-Hartmann, C Katzerke, J-U Hartmann, V Madan, C Müller-Tidow, J Duyster, DG Tenen, D Niederwieser, Behre G. NF- κ B/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015 Mar; 29(3): 535–547.

Giessrigl B, Krieger S, Rosner M, Huttary N, Saiko P, Alami M, Messaoudi S, Peyrat JF, Maciuk A, Gollinger M, Kopf S, Kazlauskas E, Mazal P, Szekeres T, Hengstschläger M, Matulis D, Jäger W, Krupitza G. Hsp90 stabilizes Cdc25A and counteracts heat shock-mediated Cdc25A degradation and cell-cycle attenuation in pancreatic carcinoma cells. *Hum Mol Genet*. 2012 Nov 1;21(21):4615-27.

Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1532-42

Goloudina A, Yamaguchi H, Chervyakova DB, Appella E, Fornace AJ Jr, Bulavin DV. Regulation of human Cdc25A stability by Serine 75 phosphorylation is not sufficient to activate a S phase checkpoint. *Cell Cycle*. 2003 Sep-Oct;2(5):473-8.

Green AS, Maciel TT, Hospital MA, Yin C, Mazed F, Townsend EC, Pilorge S, Lambert M, Paubelle E, Jacquel A, Zylbersztejn F, Decroocq J, Poulain L, Sujobert P, Jacque N, Adam K, So JC, Kosmider O, Auberger P, Hermine O, Weinstock DM, Lacombe C, Mayeux P, Vanasse GJ, Leung AY, Moura IC, Bouscary D, Tamburini J. Pim kinases modulate resistance to FLT3 tyrosine kinase inhibitors in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Sci Adv*. 2015 Sep; 1(8): e1500221.

Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):354-65.

Groner B¹, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Aug 15;451:1-14.

Guglielmelli P, Tozzi L, Bogani C, Iacobucci I, Ponziani V, Martinelli G, Bosi A, Vannucchi AM; AGIMM (AIRC-Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative) Investigators. Overexpression of microRNA-16-2 contributes to the abnormal erythropoiesis in polycythemia vera. *Blood*. 2011 Jun 23;117(25):6923-7.

Guide ALD n° 30, 2011 : HAS / Service maladies chroniques et dispositifs d'accompagnement des malades / INCa / Département des recommandations pour les professionnels de santé / Novembre 2011 Guide ALD n° 30 « Leucémies aiguës de l'adulte »

Guo J¹, Parise RA, Joseph E, Lan J, Pan SS, Joo B, Egorin MJ, Wipf P, Lazo JS, Eiseman JL. Pharmacology and antitumor activity of a quinolinedione Cdc25 phosphatase inhibitor DA3003-1 (NSC 663284). *Anticancer Res*. 2007 Sep-Oct;27(5A):3067-73.

Guo X, Connick MC, Vanderhoof J, Ishak MA, Hartley RS. MicroRNA-16 modulates HuR regulation of cyclin E1 in breast cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2015 Mar 30;16(4):7112-32.

Guo S, Guo W, Li S, Dai W, Zhang N, Zhao T, Wang H, Ma J, Yi X, Ge R, Wang G, Gao T, Li C. Serum miR-16: A Potential Biomarker for Predicting Melanoma Prognosis. : J Invest Dermatol. 2016 May;136(5):985-993.

Hamam R, Hamam D, Alsaleh KA, Kassem M, Zaher W, Alfayez M, Aldahmash A, Alajez NM. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. Cell Death Dis. 2017 Sep 7;8(9):e3045

Hammer S¹, To KK, Yoo YG, Koshiji M, Huang LE. Hypoxic suppression of the cell cycle gene CDC25A in tumor cells. Cell Cycle. 2007 Aug 1;6(15):1919-26.

Hannum C, Culpepper J, Campbell D, McClanahan T, Zurawski S, Bazan JF, Kastelein R, Hudak S, Wagner J, Mattson J. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. Nature. 1994 Apr 14;368(6472):643-8.

Hao S, Chen C, Cheng T. Cell cycle regulation of hematopoietic stem or progenitor cells. Int J Hematol. 2016 May;103(5):487-97

Harashima H¹, Dissmeyer N, Schnittger A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. Trends Cell Biol. 2013 Jul;23(7):345-56.

Akiko Hata[#] and Risa Kashima. Dysregulation of MicroRNA Biogenesis Machinery in Cancer Crit Rev Biochem Mol Biol. 2016 May-Jun; 51(3): 121–134.

He N, Li C, Zhang X, Sheng T, Chi S, Chen K, Wang Q, Vertrees R, Logrono R, Xie J. Regulation of lung cancer cell growth and invasiveness by beta-TRCP. Mol Carcinog. 2005 Jan;42(1):18-28.

Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R, Eades WC, Creer MH, Nolte JA. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. Blood. 2006 Mar 1; 107(5): 2162–2169.

Heiss E, Masson K, Sundberg C, Pedersen M, Sun J, Bengtsson S, Rönstrand L. Identification of Y589 and Y599 in the juxtamembrane domain of Flt3 as ligand-induced autophosphorylation sites involved in binding of Src family kinases and the protein tyrosinephosphatase SHP2. Blood. 2006 Sep 1;108(5):1542-50.

Higuchi Y, Zeng H, Ogawa M. CD38 expression by hematopoietic stem cells of newborn and juvenile mice. Leukemia. 2003 Jan;17(1):171-4.

Hirade T, Abe M, Onishi C, Taketani T, Yamaguchi S, Fukuda S. Internal tandem duplication of FLT3 deregulates proliferation and differentiation and confers resistance to the FLT3 inhibitor AC220 by Up-regulating RUNX1 expression in hematopoietic cells. Int J Hematol. 2016 Jan;103(1):95-106.

Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. EMBO J. 1994 Sep 15;13(18):4302-10.

Honaker Y, Piwnica-Worms H Casein Kinase 1 Functions as both Penultimate and Ultimate Kinase in Regulating Cdc25A Destruction. Oncogene. 2010 Jun 10; 29(23): 3324–3334.

Horiuchi K, Morioka H, Takaishi H, Akiyama H, Blobel CP, Toyama Y. Ectodomain shedding of FLT3 ligand is mediated by TACE. *J Immunol*. 2009 Jun 15; 182(12): 7408–7414.

Hu B, Wang X, Hu S, Ying X, Wang P, Zhang X, Wang J, Wang H, Wang Y. miR-21-mediated Radioresistance Occurs via Promoting Repair of DNA Double Strand Breaks. *J Biol Chem*. 2017 Feb 24;292(8):3531-3540.

Hu J, Zheng L, Shen X, Zhang Y, Li C, Xi T. MicroRNA-125b inhibits AML cells differentiation by directly targeting Fes. *Gene*. 2017 Jul 15;620:1-9.

Huang JC, Babak T, Corson TW, Chua G, Khan S, Gallie BL, Hughes TR, Blencowe BJ, Frey BJ, Morris QD. Using expression profiling data to identify human microRNA targets. *Nat Methods*. 2007 Dec;4(12):1045-9.

Huang E, Liu R, Chu Y. miRNA-15a/16: as tumor suppressors and more. *Future Oncol*. 2015;11(16):2351-63.

Huang S, Zou X, Zhu JN, Fu YH, Lin QX, Liang YY, Deng CY, Kuang SJ, Zhang MZ, Liao YL, Zheng XL, Yu XY, Shan ZX. Attenuation of microRNA-16 derepresses the cyclins D1, D2 and E1 to provoke cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Mol Med*. 2015 Mar;19(3):608-19.

Humplikova L¹, Kollinerova S, Papajik T, Pikalova Z, Holzerova M, Prochazka V, Divoka M, Modriansky M, Indrak K, Jarosova M. Expression of miR-15a and miR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2013 Dec;157(4):284-93.

Iavarone A, Massagué J. E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*. 1999 Jan;19(1):916-22.

Isoda M, Kanemori Y, Nakajo N, Uchida S, Yamashita K, Ueno H, Sagata N The Extracellular Signal-regulated Kinase–Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Phosphorylates and Targets Cdc25A for SCF^{β-TrCP}-dependent Degradation for Cell Cycle Arrest. *Mol Biol Cell*. 2009 Apr 15; 20(8): 2186–2195.

Catela Ivkovic T, Voss G, Cornella H, Ceder Y. microRNAs as cancer therapeutics: A step closer to clinical application. *Cancer Lett*. 2017 Oct 28;407:113-122.

Jackstadt R, Hermeking H. MicroRNAs as regulators and mediators of c-MYC function. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1849(5):544-53.

Jaime M, Pujol MJ, Serratos J, Pantoja C, Canela N, Casanovas O, Serrano M, Agell N, Bachs O The p21(Cip1) protein, a cyclin inhibitor, regulates the levels and the intracellular localization of CDC25A in mice regenerating livers. *Hepatology*. 2002 May;35(5):1063-71.

Jia X, Ouyang H, Abdalla BA, Xu H, Nie Q, Zhang X. miR-16 controls myoblast proliferation and apoptosis through directly suppressing Bcl2 and FOXO1 activities. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2017 Jun;1860(6):674-684.

Jiang Q, Zhang Y, Zhao M, Li Q, Chen R, Long X, Fang W, Liu Z. miR-16 induction after CDK4 knockdown is mediated by c-Myc suppression and inhibits cell growth as well as sensitizes nasopharyngeal carcinoma cells to chemotherapy. *Tumour Biol*. 2016 Feb;37(2):2425-33.

Jin G, Matsushita H, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, Yahata T, Takahashi S, Miyachi H. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 18;390(3):1001-6.

Jin W, Chen F, Wang K, Song Y, Fei X, Wu B. miR-15a/miR-16 cluster inhibits invasion of prostate cancer cells by suppressing TGF- β signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2018 Aug;104:637-644.

Jo MH, Shin S, Jung SR, Kim E, Song JJ, Hohng S. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol Cell*. 2015 Jul 2;59(1):117-24.

Johansson J, Berg T, Kurzejamska E, Pang MF, Tabor V, Jansson M, Roswall P, Pietras K, Sund M, Religa P, Fuxe J. MiR-155-mediated loss of C/EBP β shifts the TGF- β response from growth inhibition to epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in breast cancer. *Oncogene*. 2013 Dec 12;32(50):5614-24.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):635-47.

Johnson CD¹, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*. 2007 Aug 15;67(16):7713-22.

Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2016 Aug 19; 44(14):6518–6548.

Källström et al, 2005 :

Källström H, Lindqvist A, Pospisil V, Lundgren A, Rosenthal CK. Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import. *Exp Cell Res*. 2005 Feb 1;303(1):89-100.

Kang T, Wei Y, Honaker Y, Yamaguchi H, Appella E, Hung MC, Piwnicka-Worms H. GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell*. 2008 Jan;13(1):36-47.

Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2003 Jul 21;198(2):305-13.

Kasar S, Salerno E, Yuan Y, Underbayev C, Vollenweider D, Laurindo MF, Fernandes H, Bonci D, Addario A, Mazzella F, Raveche E. Systemic in vivo lentiviral delivery of miR-15a/16 reduces malignancy in the NZB de novo mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Immun*. 2012 Feb;13(2):109-19.

Keaton MA¹, Szkotnicki L, Marquitz AR, Harrison J, Zyla TR, Lew DJ. Nucleocytoplasmic Trafficking of G2/M Regulators in Yeast. *Mol Biol Cell*. 2008 Sep; 19(9): 4006–4018.

Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):310-8.

Khalife J, Radomska HS, Santhanam R, Huang X, Neviani P, Saultz J, Wang H, Wu YZ, Alachkar H, Anghelina M, Dorrance A, Curfman J, Bloomfield CD, Medeiros BC, Perrotti D, Lee LJ, Lee RJ, Caligiuri MA, Pichiorri F, Croce CM, Garzon R, Guzman ML, Mendler JH, Marcucci G. Pharmacological targeting of miR-155 via the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 (Pevonedistat) in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015 Oct;29(10):1981-92.

Khvorova A¹, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):209-16.

Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*. 2004 Apr;14(4):156-9.

Kim KT, Baird K, Ahn JY, Meltzer P, Lilly M, Levis M, Small D. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1759-67.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Feb;10(2):126-39

Kim KT, Carroll AP, Mashkani B, Cairns MJ, Small D, Scott RJ. MicroRNA-16 is down-regulated in mutated FLT3 expressing murine myeloid FDC-P1 cells and interacts with Pim-1. *PLoS One*. 2012; 7(9):e44546.

Kim SW, Choi SM, Choo YS, Kim IK, Song BW, Kim HS. Flt3 ligand induces monocyte proliferation and enhances the function of monocyte-derived dendritic cells in vitro. *J Cell Physiol*. 2015 Aug;230(8):1740-9.

Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*. 1998 Sep;12(9):1333-7.

Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*. 2002 Apr 11;21(16):2555-63.

Klamer S, Voermans C. The role of novel and known extracellular matrix and adhesion molecules in the homeostatic and regenerative bone marrow microenvironment. *Cell Adh Migr*. 2014;8(6):563-77.

Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, Dalla-Favera R. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):28-40.

Klug LR, Kent JD, Heinrich MC. Structural and clinical consequences of activation loop mutations in class III receptor tyrosinekinases. *Pharmacol Ther*. 2018 Nov;191:123-134.

Ko YC, Hu CY, Liu ZH, Tien HF, Ou DL, Chien HF, Lin LI. Cytarabine-Resistant FLT3-ITD Leukemia Cells are Associated with TP53 Mutation and Multiple Pathway Alterations—Possible Therapeutic Efficacy of Cabozantinib. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar; 20(5): 1230.

Kohl TM, Hellinger C, Ahmed F, Buske C, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K. BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts. *Leukemia*. 2007 Aug;21(8):1763-72.

Kölling M, Kaucsar T, Schauerte C, Hübner A, Dettling A, Park JK, Busch M, Wulff X, Meier M, Scherf K, Bukosza N, Szénási G, Godó M, Sharma A, Heuser M, Hamar P, Bang C, Haller H, Thum T, Lorenzen JM. Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice. *Mol Ther*. 2017 Jan 4;25(1):165-180.

Kong W, He L, Richards EJ, Challa S, Xu CX, Permut-Wey J, Lancaster JM, Coppola D, Sellers TA, Djeu JY, Cheng JQ. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 2014 Feb 6;33(6):679-89.

Koutova L, Sterbova M, Pazourkova E, Pospisilova S, Svobodova I, Horinek A, Lysak D, Korabecna M. The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients. *Leuk Res*. 2015 Dec;39(12):1389-95.

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D155-D162.

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. MiRBase. <http://www.mirbase.org/>. Consulté le 18.05.2019.

Kreiter S, Diken M, Selmi A, Petschenka J, Türeci Ö, Sahin U. FLT3 Ligand as a Molecular Adjuvant for Naked RNA Vaccines. *Methods Mol Biol*. 2016;1428:163-75.

Krell A, Wolter M, Stojcheva N, Hertler C, Liesenberg F, Zapatka M, Weller M, Malzkorn B, Reifenberger G. MiR-16-5p is frequently down-regulated in astrocytic gliomas and modulates glioma cell proliferation, apoptosis and response to cytotoxic therapy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2018 Dec 13.

Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*. 2007 May;39(5):673-7.

Kumar MS, Pester RE, Chen CY, Lane K, Chin C, Lu J, Kirsch DG, Golub TR, Jacks T. Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev*. 2009 Dec 1;23(23):2700-4.

Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Charles A. Schiffer, MD and Richard M. Stone, MD. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.

Kusec R, Jaksic O, Ostojic S, Kardum-Skelin I, Vrhovac R, Jaksic B. More on prognostic significance of FLT3/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006 108:405-406

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8.

Lambertz I, Nittner D, Mestdagh P, Denecker G, Vandesompele J, Dyer MA, Marine JC. Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death Differ*. 2010 Apr; 17(4): 633–641.

deLapeyrière O, Naquet P, Planche J, Marchetto S, Rottapel R, Gambarelli D, Rosnet O, Birnbaum D. Expression of Flt3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. *Differentiation*. 1995 Jun;58(5):351-9

Larossa-Garcia M, Baer MR. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Current status and future directions. *Mol Cancer Ther*. Author manuscript; available in PMC 2017 Dec 1.

Larrue C, Saland E, Vergez F, Serhan N, Delabesse E, Mansat-De Mas V, Hospital MA, Tamburini J, Manenti S, Sarry JE, Récher C. Antileukemic Activity of 2-Deoxy-d-Glucose through Inhibition of N-Linked Glycosylation in Acute Myeloid Leukemia with FLT3-ITD or c-KIT Mutations. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14(10):2364-73.

Lavecchia A, Di Giovanni C, Novellino E. Inhibitors of Cdc25 phosphatases as anticancer agents: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2010 Mar;20(3):405-25.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60. Epub 2004 Sep 16.

Lee SO¹, Masyuk T, Splinter P, Banales JM, Masyuk A, Stroope A, Larusso N. MicroRNA15a modulates expression of the cell-cycle regulator Cdc25A and affects hepatic cystogenesis in a rat model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest*. 2008 Nov 3; 118(11): 3714–3724.

de Leeuw DC, van den Ancker W, Denkers F, de Menezes RX, Westers TM, Ossenkuppele GJ, van de Loosdrecht AA, Smit L. MicroRNA profiling can classify acute leukemias of ambiguous lineage as either acute myeloid leukemia or acute lymphoid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2013 Apr 15;19(8):2187-96.

Leischner H¹, Albers C, Grundler R, Razumovskaya E, Spiekermann K, Bohlander S, Rönstrand L, Götze K, Peschel C, Duyster J. SRC is a signaling mediator in FLT3-ITD- but not in FLT3-TKD-positive AML. *Blood*. 2012 Apr 26;119(17):4026-33.

Leisser C, Rosenberger G, Maier S, Fuhrmann G, Grusch M, Strasser S, Huettenbrenner S, Fassl S, Polgar D, Krieger S, Cerni C, Hofer-Warbinek R, deMartin R, Krupitza G. Subcellular localisation of Cdc25A determines cell fate. *Cell Death Differ*. 2004 Jan;11(1):80-9.

Lerner M, Harada M, Lovén J, Castro J, Davis Z, Oscier D, Henriksson M, Sangfelt O, Grandér D, Corcoran MM. DLEU2, frequently deleted in malignancy, functions as a critical host gene of the cell cycle inhibitory microRNAs miR-15a and miR-16-1. *Exp Cell Res*. 2009 Oct 15;315(17):2941-52.

Levis M. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood* 2017 129:3403-3406

Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ,

Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30;368(22):2059-74

Lezina L, Purmessur N, Antonov AV, Ivanova T, Karpova E, Krishan K, Ivan M, Aksenova V, Tentler D, Garabadgiu AV, Melino G, Barlev NA. miR-16 and miR-26a target checkpoint kinases Wee1 and Chk1 in response to p53 activation by genotoxic stress. *Cell Death Dis*. 2013 Dec 12;4:e953.

Li CW, Chu YH, Chen BS. Construction and clarification of dynamic gene regulatory network of cancer cell cycle via microarray data. *Cancer Inform*. 2007 Feb 18;2:223-41.

Li L, Piloto O, Nguyen HB, Greenberg K, Takamiya K, Racke F, Huso D, Small D Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3849-58.

Li G, Miskimen KL, Wang Z, Xie XY, Brenzovich J, Ryan JJ, Tse W, Moriggl R, Bunting KD. STAT5 requires the N-domain for suppression of miR15/16, induction of bcl-2, and survival signaling in myeloproliferative disease. *Blood*. 2010; 115(7):1416-24.

Li Y, Zhao S, Zhen Y, Li Q, Teng L, Asai A, Kawamoto K. A miR-21 inhibitor enhances apoptosis and reduces G(2)-M accumulation induced by ionizing radiation in human glioblastoma U251 cells. *Brain Tumor Pathol*. 2011 Jul;28(3):209-14.

Li L, Bailey E, Greenblatt S, Huso D, Small D. Loss of the wild-type allele contributes to myeloid expansion and disease aggressiveness in FLT3/ITD knockin mice. *Blood*. 2011 Nov 3;118(18):4935-45.

Li L, Osdal T, Ho Y, Chun S, McDonald T, Agarwal P, Lin A, Chu S, Qi J, Li L, Hsieh YT, Dos Santos C, Yuan H, Ha TQ, Popa M, Hovland R, Bruserud Ø, Gjertsen BT, Kuo YH, Chen W, Lain S, McCormack E, Bhatia R. SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of human FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014 Oct 2;15(4):431-446.

Li Z, Chen P, Su R, Li Y, Hu C, Wang Y, Arnovitz S, He M, Gurbuxani S, Zuo Z, Elkahloun AG, Li S, Weng H, Huang H, Neilly MB, Wang S, Olson EN, Larson RA, Le Beau MM, Zhang J, Jiang X, Wei M, Jin J, Liu PP, Chen J. Overexpression and knockout of miR-126 both promote leukemogenesis. *Blood*. 2015 Oct 22;126(17):2005-15.

Li F, Xu Y, Deng S, Li Z, Zou D, Yi S, Sui W, Hao M, Qiu L. MicroRNA-15a/16-1 cluster located at chromosome 13q14 is down-regulated but displays different expression pattern and prognostic significance in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):38270-82.

Li H, Jiang M, Cui M, Feng G, Dong J, Li Y, Xiao H, Fan S. MiR-365 enhances the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells through targeting CDC25A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Apr 30;512(2):392-398.

Liang J, Cao R, Zhang Y, Xia Y, Zheng Y, Li X, Wang L, Yang W, Lu Z. PKM2 dephosphorylation by Cdc25A promotes the Warburg effect and tumorigenesis. *Nat Commun.* 2016 Aug 3;7:12431.

Lin YM, Chung CL, Cheng YS. Posttranscriptional regulation of CDC25A by BOLL is a conserved fertility mechanism essential for human spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jul;94(7):2650-7.

Lin TC, Lin PL, Cheng YW, Wu TC, Chou MC, Chen CY, Lee H. MicroRNA-184 Deregulated by the MicroRNA-21 Promotes Tumor Malignancy and Poor Outcomes in Non-small Cell Lung Cancer via Targeting CDC25A and c-Myc. *Ann Surg Oncol.* 2015 Dec;22 Suppl 3:S1532-9.

Lin TL, Strickland SA, Fielder W, Walter RB, Hou JZ, Roboz GJ, Enjeti A, Fakhoui KM, Darden DE, Dunbar M, Zhu M, Hayslip JW, Wei A. Phase Ib/2 study of venetoclax with low-dose cytarabine in treatment-naïve patients age ≥ 65 with acute myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 34, no. 15_suppl (May 20 2016) 7007-7007.

Lindqvist A¹, Källström H, Karlsson Rosenthal C. Characterisation of Cdc25B localisation and nuclear export during the cell cycle and in response to stress. *J Cell Sci.* 2004 Oct 1;117(Pt 21):4979-90.

Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, Takahira H, Lu L, Savchenko VG, Lyman SD, Broxmeyer HE. Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia.* 1996 Jun;10(6):1012-8.

Liu Q¹, Fu H, Sun F, Zhang H, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* 2008 Sep;36(16):5391-404.

Liu L, Papa EF, Dooner MS, Machan JT, Johnson KW, Goldberg LR, Quesenberry PJ, Colvin GA. Homing and long-term engraftment of long- and short-term renewal hematopoietic stem cells. *PLoS One.* 2012;7(2):e31300.

Liu J, Guo B, Chen Z, Wang N, Iacovino M, Cheng J, Roden C, Pan W, Khan S, Chen S, Kyba M, Fan R, Guo S, Lu J. miR-125b promotes MLL-AF9-driven murine acute myeloid leukemia involving a VEGFA-mediated non-cell-intrinsic mechanism. *Blood.* 2017 Mar 16;129(11):1491-1502.

Liu T, Xu Z, Ou D, Liu J, Zhang J. The miR-15a/16 gene cluster in human cancer: A systematic review. *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):5496-5506.

Llobet-Navas D, Rodriguez-Barrueco R, de la Iglesia-Vicente J, Olivan M, Castro V, Saucedo-Cuevas L, Marshall N, Putcha P, Castillo-Martin M, Bardot E, Ezhkova E, Iavarone A, Cordon-Cardo C, Silva JM. The microRNA 424/503 cluster reduces CDC25A expression during cell cycle arrest imposed by transforming growth factor β in mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 2014 Dec 1;34(23):4216-31.

Löffler H, Syljuåsen RG, Bartkova J, Worm J, Lukas J, Bartek J. Distinct modes of deregulation of the proto-oncogenic Cdc25A phosphatase in human breast cancer cell lines. *Oncogene.* 2003 Nov 6;22(50):8063-71.

Lopez S, Voisset E, Tisserand JC, Mosca C, Prebet T, Santamaria D, Dubreuil P, De Sepulveda P. An essential pathway links FLT3-ITD, HCK and CDK6 in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2016 Aug 9;7(32):51163-51173.

Lovat F, Fassan M, Gasparini P, Rizzotto L, Cascione L, Pizzi M, Vicentini C, Balatti V, Palmieri D, Costinean S, Croce CM. miR-15b/16-2 deletion promotes B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep 15;112(37):11636-41.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8

Lu Y, Li F, Xu T, Sun J. miRNA-497 Negatively Regulates the Growth and Motility of Chondrosarcoma Cells by Targeting Cdc25A. *Oncol Res*. 2016;23(4):155-63.

Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 9;105(36):13556-61

Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, de Vries P, Escobar SS, Downey H, Splett RR, Beckmann MP, McKenna HJ. Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for earlyhematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1994 May 15;83(10):2795-801.

Lyman SD, Jacobsen EW. c-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood* 1998 91:1101-1134;

Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*. 1995 Jul;3(1):147-61.

Mailand N, Podtelejnikov AV, Groth A, Mann M, Bartek J, Lukas J. Regulation of G₂/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J*. 2002 Nov 1; 21(21): 5911–5920.

Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell*. 2007 Dec 13;1(6):635-45.

Mandal M, Powers SE, Maienschein-Cline M, Bartom ET, Hamel KM, Kee BL, Dinner AR, Clark MR. Epigenetic repression of the Igk locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase Ezh2. *Nat Immunol*. 2011 Oct 30;12(12):1212-20. doi: 10.1038/ni.2136.

Mao A, Liu Y, Wang Y, Zhao Q, Zhou X, Sun C, Di C, Si J, Gan L, Zhang H miR-449a enhances radiosensitivity through modulating pRb/E2F1 in prostate cancer cells. *Tumour Biol*. 2016 Apr;37(4):4831-40.

Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1121-9.

Matsushita R, Seki N, Chiyomaru T, Inoguchi S, Ishihara T, Goto Y, Nishikawa R, Mataka H, Tatarano S, Itesako T, Nakagawa M, Enokida H. Tumour-suppressive microRNA-144-5p directly targets CCNE1/2 as potential prognostic markers in bladder cancer. *Br J Cancer*. 2015 Jul 14;113(2):282-9.

Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*. 1991 Jun 28;65(7):1143-52.

Mazars A, Fernandez-Vidal A, Mondesert O, Lorenzo C, Prévost G, Ducommun B, Payrastre B, Racaud-Sultan C, Manenti S. A caspase-dependent cleavage of CDC25A generates an active fragment activating cyclin-dependent kinase 2 during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2009 Feb;16(2):208-18.

Laurent Mazzolini, Anaïs Broban, Carine Froment, Odile Burlet-Schiltz, Arnaud Besson, Stéphane Manenti, and Christine Dozier. Phosphorylation of CDC25A on SER283 in late S/G2 by CDK/cyclin complexes accelerates mitotic entry. *Cell Cycle*. 2016; 15(20): 2742–2752.

Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*. 2010 Sep 2;467(7311):86-90.

Melixetian M, Klein DK, Sørensen CS, Helin K. NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat Cell Biol*. 2009 Oct;11(10):1247-53.

Melkun E, Piloni M, Paulson RF. A naturally occurring point substitution in Cdc25A, and not Fv2/Stk, is associated with altered cell-cycle status of early erythroid progenitor cells. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3804-11.

Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 2008 111:485-491

Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*. 2012 Jun 22;149(7):1635-46.

Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2014 Aug;15(9):e382-94

Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, Grüning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Büchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*. 2000 Dec 1;96(12):3907-14.

Mizuki M, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Böhmer FD, Müller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3164-73.

Moarii M, Papaemmanuil E. Classification and risk assessment in AML: integrating cytogenetics and molecular profiling. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017 Dec 8;2017(1):37-44

Mochizuki T¹, Kitanaka C, Noguchi K, Muramatsu T, Asai A, Kuchino Y. Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J Biol Chem*. 1999 Jun 25;274(26):18659-66.

Montani F, Marzi MJ, Dezi F, Dama E, Carletti RM, Bonizzi G, Bertolotti R, Bellomi M, Rampinelli C, Maisonneuve P, Spaggiari L, Veronesi G, Nicassio F, Di Fiore PP, Bianchi F. miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Mar 19;107(6):djv063

Moon HG, Yang J, Zheng Y, Jin Y. miR-15a/16 regulates macrophage phagocytosis after bacterial infection. *J Immunol.* 2014 Nov 1;193(9):4558-67.

Morenos L, Chatterton Z, Ng JL, Halemba MS, Parkinson-Bates M, Mechinaud F, Elwood N, Saffery R, Wong NC. Hypermethylation and down-regulation of DLEU2 in paediatric acute myeloid leukaemia independent of embedded tumour suppressor miR-15a/16-1. *Mol Cancer.* 2014 May 24;13:123.

Muñoz L, Aventín A, Villamor N, Juncà J, Acebedo G, Domingo A, Rozman M, Torres JP, Tormo M, Nomdedéu J. Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. *Haematologica.* 2003 Jun;88(6):637-45.

Narayan N, Morenos L, Phipson B, Willis SN, Brumatti G, Eggers S, Lalaoui N, Brown LM, Kosasih HJ, Bartolo RC, Zhou L, Catchpoole D, Saffery R, Oshlack A, Goodall GJ, Ekert PG. Functionally distinct roles for different miR-155 expression levels through contrasting effects on gene expression, in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2017 Apr;31(4):808-820.

Natarajan K, Xie Y, Burcu M, Linn DE, Qiu Y, Baer MR. Pim-1 Kinase Phosphorylates and Stabilizes 130 kDa FLT3 and Promotes Aberrant STAT5 Signaling in Acute Myeloid Leukemia with FLT3 Internal Tandem Duplication. *PLoS One.* 2013; 8(9): e74653.

Navarro A, Diaz T, Gallardo E, Viñolas N, Marrades RM, Gel B, Campayo M, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M. Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer. *J Surg Oncol.* 2011 Apr;103(5):411-5.

Neelsen KJ¹, Zanini IM, Herrador R, Lopes M. Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. *J Cell Biol.* 2013 Mar 18;200(6):699-708.

Nelson EA, Walker SR, Xiang M, Weisberg E, Bar-Natan M, Barrett R, Liu S, Kharbanda S, Christie AL, Nicolais M, Griffin JD, Stone RM, Kung AL, Frank DA. The STAT5 Inhibitor Pimozide Displays Efficacy in Models of Acute Myelogenous Leukemia Driven by FLT3 Mutations. *Genes Cancer.* 2012 Jul;3(7-8):503-11.

Nguyen DX, Westbrook TF, McCance DJ. Human Papillomavirus Type 16 E7 Maintains Elevated Levels of the cdc25A Tyrosine Phosphatase during Dereglulation of Cell Cycle Arrest. *J Virol.* 2002 Jan; 76(2): 619–632.

Nicholls SE¹, Winter S, Mottram R, Miyazaki JA, Whetton AD. Flt3 ligand can promote survival and macrophage development without proliferation in myeloid progenitor cells. *Exp Hematol.* 1999 Apr;27(4):663-72.

Nilsson SK¹, Debatis ME, Dooner MS, Madri JA, Quesenberry PJ, Becker PS. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem.* 1998 Mar;46(3):371-7.

Nimer SD, MacGrogan D, Jhanwar S, Alvarez S. Chromosome 19 abnormalities are commonly seen in AML, M7. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3838; author reply 3838-9.

GE Nybakken, J Canaani, D Roy, JD Morrisette, CD Watt, NP Shah, CC Smith, A Bagg, M Carroll, AE Perl. Quizartinib elicits differential responses that correlate with karyotype and genotype of the leukemic clone. *Leukemia*. 2016 Jun; 30(6): 1422–1425.

Nogami A, Okada K, Ishida S, Akiyama H, Umezawa Y, Miura O. Inhibition of the STAT5/Pim Kinase Axis Enhances Cytotoxic Effects of Proteasome Inhibitors on FLT3-ITD-Positive AML Cells by Cooperatively Inhibiting the mTORC1/4EBP1/S6K/Mcl-1 Pathway. *Transl Oncol*. 2019 Feb;12(2):336-349.

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 402.

Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993 Jun 1;81(11):2844-53.

Okamoto M, Hayakawa F, Miyata Y, Watamoto K, Emi N, Abe A, Kiyoi H, Towatari M, Naoe T. Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia*. 2007 Mar;21(3):403-10. Epub 2007 Jan 18.

de Oliveira PE, Zhang L, Wang Z, Lazo JS. Hypoxia-mediated regulation of Cdc25A phosphatase by p21 and miR-21. *Cell Cycle*. 2009 Oct 1;8(19):3157-64.

Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):631-44.

Ørom UA¹, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):460-71.

Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):242-5.

Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* volume17, pages93–115 (2017)

Palma CA, Al Sheikha D, Lim TK, Bryant A, Vu TT, Jayaswal V, Ma DD MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in Acute Myeloid Leukaemia. *Mol Cancer*. 2014 Apr 5;13:79.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jun 9;374(23):2209-2221

Pardee TS, Zuber J, Lowe SW. Flt3-ITD alters chemotherapy response in vitro and in vivo in a p53-dependent manner. *Exp Hematol*. 2011 Apr;39(4):473-485.e4.

Paskind M¹, Johnston C, Epstein PM, Timm J, Wickramasinghe D, Belanger E, Rodman L, Magada D, Voss J. Structure and promoter activity of the mouse CDC25A gene. *Mamm Genome*. 2000 Dec;11(12):1063-9.

Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, Levine RL. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1079-89.

Patel N, Garikapati KR, Ramaiah MJ, Polavarapu KK, Bhadra U, Bhadra MP. miR-15a/miR-16 induces mitochondrial dependent apoptosis in breast cancer cells by suppressing oncogene BMI1. *Life Sci*. 2016 Nov 1;164:60-70.

Paz-Priel I, Friedman A. C/EBP α dysregulation in AML and ALL. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1-2):93-102

Pekarsky Y, Balatti V, Croce CM. BCL2 and miR-15/16: from gene discovery to treatment. *Cell Death Differ*. 2018 Jan;25(1):21-26.

Pereg Y, Liu BY, O'Rourke KM, Sagolla M, Dey A, Komuves L, French DM, Dixit VM. Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A. *Nat Cell Biol*. 2010 Apr;12(4):400-6.

Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, Zhou W, Benson DM Jr, Hofmainster C, Alder H, Garofalo M, Di Leva G, Volinia S, Lin HJ, Perrotti D, Kuehl M, Aqeilan RI, Palumbo A, Croce CM. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*. 2010 Oct 19;18(4):367-81.

Placke T, Faber K, Nonami A, Putwain SL, Salih HR, Heidel FH, Krämer A, Root DE, Barbie DA, Krivtsov AV, Armstrong SA, Hahn WC, Huntly BJ, Sykes SM, Milsom MD, Scholl C, Fröhling S. Requirement for CDK6 in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Blood*. 2014 Jul 3;124(1):13-23.

Porcher C, Chagraoui H, Kristiansen MS SCL/TAL1: a multifaceted regulator from blood development to disease. *Blood* 2017 129:2051-2060

Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam YJ, Matkovich SJ, Dorn GW 2nd, van Rooij E, Olson EN. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res*. 2011 Sep 2;109(6):670-9.

Pothof J, Verkaik NS, van IJcken W, Wiemer EA, Ta VT, van der Horst GT, Jaspers NG, van Gent DC, Hoeijmakers JH, Persengiev SP. MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *EMBO J*. 2009; 28(14):2090-9.

Pouliot LM, Chen YC, Bai J, Guha R, Martin SE, Gottesman MM, Hall MD. Cisplatin sensitivity mediated by WEE1 and CHK1 is mediated by miR-155 and the miR-15 family. *Cancer Res.* 2012 Nov 15;72(22):5945-55.

Pozo-Molina G, Ponciano-Gómez A, Rivera-González GC, Hernández-Zavala A, Garrido E. Arsenic-induced S phase cell cycle lengthening is associated with ROS generation, p53 signaling and CDC25A expression. *Chem Biol Interact.* 2015 Aug 5;238:170-9.

Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, Escoda L, Guàrdia R, Queipo de Llano MP, Salamero O, Bargay J, Pedro C, Martí JM, Torrebaddell M, Díaz-Beyá M, Camós M, Colomer D, Hoyos M, Sierra J, Esteve J; Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood* 2013 121:2734-2738

Qian J, Lin J, Qian W, Ma JC, Qian SX, Li Y, Yang J, Li JY, Wang CZ, Chai HY, Chen XX, Deng ZQ. Overexpression of miR-378 is frequent and may affect treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2013 Jul;37(7):765-8.

Qin H, Liu W. MicroRNA-99a-5p suppresses breast cancer progression and cell-cycle pathway through downregulating CDC25A. *J Cell Physiol.* 2019 Apr;234(4):3526-3537.

Qiu W¹, Kassem M. miR-141-3p inhibits human stromal (mesenchymal) stem cell proliferation and differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Sep;1843(9):2114-21.

Radomska HS, Bassères DS, Zheng R, Zhang P, Dayaram T, Yamamoto Y, Sternberg DW, Lokker N, Giese NA, Bohlander SK, Schnittger S, Delmotte MH, Davis RJ, Small D, Hiddemann W, Gilliland DG, Tenen DG. Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *J Exp Med.* 2006 Feb 20;203(2):371-81

Radomska HS, Alberich-Jordà M, Will B, Gonzalez D, Delwel R, Tenen DG. Targeting CDK1 promotes FLT3-activated acute myeloid leukemia differentiation through C/EBP α . *J Clin Invest.* 2012 Aug;122(8):2955-66

Raghuveer SM, Lasater EA, Doyle K, Malla R, Boghaert E, Souers A, Levenson JD, Sampath S. FLT3-ITD Activation Mediates Resistance to the BCL-2 Selective Antagonist, Venetoclax, in FLT3-ITD Mutant AML Models. *Blood* 2017 130:1348

Ramsey HE, Fischer MA, Lee T, Gorska AE, Arrate MP, Fuller L, Boyd KL, Strickland SA, Sensintaffar J, Hogdal LJ, Ayers GD, Olejniczak ET, Fesik SW, Savona MR; A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* 2018 Dec;8(12):1566-1581.

Ray RJ, Paige CJ, Furlonger C, Lyman SD, Rottapel R; Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *Eur J Immunol.* 1996 Jul;26(7):1504-10.

Ray D, Terao Y, Fuhrken PG, Ma ZQ, DeMayo FJ, Christov K, Heerema NA, Franks R, Tsai SY, Papoutsakis ET, Kiyokawa H ; Deregulated CDC25A expression promotes mammary tumorigenesis with genomic instability. *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):984-91.

Ray D, Terao Y, Nimbalkar D, Hirai H, Osmundson EC, Zou X, Franks R, Christov K, Kiyokawa H. Hemizygous disruption of Cdc25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice.

Ren C, Chen H, Han C, Fu D, Wang D, Shen M. High expression of miR-16 and miR-451 predicating better prognosis in patients with gastric cancer. : *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016 Dec;142(12):2489-2496.

Rizwani W, Schaal C, Kunigal S, Coppola D, Chellappan S. Mammalian lysine histone demethylase KDM2A regulates E2F1-mediated gene transcription in breast cancer cells. *PLoS One.* 2014 Jul 16;9(7):e100888.

Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene.* 2007 Oct 15;26(47):6715-23. Review.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res.* 2004 Oct; 14(10a): 1902–1910.

Rosnet O, Bühring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainy D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, Birnbaum D. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia.* 1996 Feb;10(2):238-48.

Rother K, Kirschner R, Sängler K, Böhlig L, Mössner J, Engeland K. p53 downregulates expression of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A. *Oncogene.* 2007 Mar 22;26(13):1949-53. Epub 2006 Sep 25.

Rudolph J. Catalytic mechanism of Cdc25. *Biochemistry.* 2002 Dec 10;41(49):14613-23.

Ru Lee W, Chen CC, Liu S, Safe S. 17beta-estradiol (E2) induces cdc25A gene expression in breast cancer cells by genomic and non-genomic pathways. *J Cell Biochem.* 2006 Sep 1;99(1):209-20.

Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell.* 2006 Jun;9(6):435-43.

Salmanidis M, Pillman K, Goodall G, Bracken C. Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Sep;54:304-11.

Sampath D¹, Liu C, Vasan K, Sulda M, Puduvali VK, Wierda WG, Keating MJ. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012 Feb 2;119(5):1162-72.

Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):9762-70.

Sarkar S, Dey BK, Dutta A. MiR-322/424 and -503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A. *Mol Biol Cell*. 2010 Jul 1;21(13):2138-49.

Sato T, Yang X, Knapper S, White P, Smith BD, Galkin S, Small D, Burnett A, Levis M. FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3286-93.

Sawai CM, Babovic S, Upadhaya S, Knapp DJHF, Lavin Y, Lau CM, Goloborodko A, Feng J, Fujisaki J, Ding L, Mirny LA, Merad M, Eaves CJ, Reizis B. Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals. *Immunity*. 2016 Sep 20;45(3):597-609.

Scheijen B, Ngo HT, Kang H, Griffin JD. FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. *Oncogene*. 2004 Apr 22;23(19):3338-49.

Schlenk et al, 2014 :

Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, Held G, Brossart P, Lübbert M, Salih HR, Kindler T, Horst HA, Wulf G, Nachbaur D, Götze K, Lamparter A, Paschka P, Gaidzik VI, Teleanu V, Späth D, Benner A, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Döhner K; German-Austrian AML Study Group. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood* 2014 124:3441-3449

Schmidt-Arras DE¹, Böhmer A, Markova B, Choudhary C, Serve H, Böhmer FD. Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*. 2005 May;25(9):3690-703.

Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, Chen C. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*. 2008 Jan;44(1):31-8.

Schneider E, Staffas A, Röhner L, Krowiorz K, Heuser M, Döhner K, Bullinger L, Döhner H, Fogelstrand L, Rouhi A, Kuchenbauer F, Palmqvist L. MicroRNA-155 is upregulated in MLL-rearranged AML but its absence does not affect leukemidevelopment. *Exp Hematol*. 2016 Dec;44(12):1166-1171.

Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010 Nov-Dec;2(6):640-53.

Sexauer A, Perl A, Yang X, Borowitz M, Gocke C, Rajkhowa T, Thiede C, Frattini M, Nybakken GE, Pratz K, Karp J, Smith BD, Levis M. Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by FLT3 inhibition in FLT3/ITD AML. *Blood*. 2012 Nov 15;120(20):4205-14

Shi L, Zhang J, Pan T, Zhou J, Gong W, Liu N, Fu Z, You Y. MiR-125b is critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation. *Brain Res*. 2010 Feb 2;1312:120-6.

Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, Kuo MC, Lai CL, Hsu HC. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2387-92.

Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, Kennedy JA, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW, McLeod JL, Doedens M, Medeiros JJ, Marke R, Kim HJ, Lee K, McPherson JD, Hudson TJ; HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, Brown AM, Yousif F, Trinh QM, Stein LD, Minden MD, Wang JC, Dick JE. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014 Feb 20;506(7488):328-33.

Short NJ, Kantarjian H, Ravandi F, Daver N. Emerging treatment paradigms with FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol*. 2019; 10: 2040620719827310.

Shurin MR, Esche C, Lotze MT. FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998 Mar;9(1):37-48.

Singh L, Pushker N, Sen S, Singh MK, Bakhshi S, Chawla B, Kashyap S. Expression of CDC25A and CDC25B phosphatase proteins in human retinoblastoma and its correlation with clinicopathological parameters. *Br J Ophthalmol*. 2015 Apr;99(4):457-63.

Sive JI, Göttgens B. Transcriptional network control of normal and leukaemic haematopoiesis. *Exp Cell Res*. 2014 Dec 10;329(2):255-64.

So AY, Sookram R, Chaudhuri AA, Minisandram A, Cheng D, Xie C, Lim EL, Flores YG, Jiang S, Kim JT, Keown C, Ramakrishnan P, Baltimore D. Dual mechanisms by which miR-125b represses IRF4 to induce myeloid and B-cell leukemias. *Blood*. 2014 Aug 28;124(9):1502-12.

Song B, Chen Y, Liu Y, Wan C, Zhang L, Zhang W. NPAS2 regulates proliferation of acute myeloid leukemia cells via CDC25A-mediated cell cycle progression and apoptosis. *J Cell Biochem*. 2018 Dec 9 [Epub ahead of print].

Sørensen CS¹, Syljuåsen RG, Falck J, Schroeder T, Rönstrand L, Khanna KK, Zhou BB, Bartek J, Lukas J. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell*. 2003 Mar;3(3):247-58.

Staudt D, Murray HC, McLachlan T, Alvaro F, Enjeti AK, Verrills NM, Dun MD. Targeting Oncogenic Signaling in Mutant FLT3 Acute Myeloid Leukemia: The Path to Least Resistance. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct; 19(10): 3198.

Steinman RA. Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene*. 2002 May 13;21(21):3403-13

Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2003 Sep;3(9):650-65

Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006 107:3724-3726

Sullivan C, Liu Y, Shen J, Curtis A, Newman C, Hock JM, Li X. Novel interactions between FOXM1 and CDC25A regulate the cell cycle. *PLoS One*. 2012;7(12):e51277.

Sullivan RP, Leong JW, Schneider SE, Ireland AR, Berrien-Elliott MM, Singh A, Schappe T, Jewell BA, Sexl V, Fehniger TA. MicroRNA-15/16 Antagonizes Myb To Control NK Cell Maturation. *J Immunol*. 2015 Sep 15;195(6):2806-17.

Sun CY¹, She XM, Qin Y, Chu ZB, Chen L, Ai LS, Zhang L, Hu Y. miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis*. 2013 Feb;34(2):426-35.

Sun J, Ramos A, Chapman B, Johnnidis JB, Le L, Ho YJ, Klein A, Hofmann O, Camargo FD. Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature*. 2014 Oct 16;514(7522):322-7.

Sun YP, Lu F, Han XY, Ji M, Zhou Y, Zhang AM, Wang HC, Ma DX, Ji CY. MiR-424 and miR-27a increase TRAIL sensitivity of acute myeloid leukemia by targeting PLAG1. *Oncotarget*. 2016 May 3; 7(18): 25276–25290.

Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res*. 2016 Jul 1; 76(13): 3666–3670.

Swords R, Freeman C, Giles F. Targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012 Oct;26(10):2176-85.

Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, Lillington D, Oakervee H, Cavenagh J, Agrawal SG, Lister TA, Gribben JG, Bonnet D. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):568-75.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growthfactor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Sep 30;187(3):1579-86

Tsapogas P, Swee LK, Nusser A, Nuber N, Kreuzaler M, Capoferri G, Rolink H, Ceredig R, Rolink A. In vivo evidence for an instructive role of fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3) ligand in hematopoietic development. *Haematologica*. 2014 Apr; 99(4): 638–646.

Tsapogas P, Mooney CJ, Brown G, Rolink A The Cytokine Flt3-Ligand in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun; 18(6): 1115.

Takahashi S. Inhibition of the MEK/MAPK signal transduction pathway strongly impairs the growth of Flt3-ITD cells. *Am J Hematol*. 2006 Feb;81(2):154-5.

Takamizawa J¹, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3753-6.

Thiede C¹, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002 99:4326-4335

Tian R, Wang J, Yan H, Wu J, Xu Q, Zhan X, Gui Z, Ding M, He J. Differential expression of miR16 in glioblastoma and glioblastoma stem cells: their correlation with proliferation, differentiation, metastasis and prognosis. *Oncogene*. 2017 Oct 19;36(42):5861-5873.

Timofeev O, Cizmecioglu O, Hu E, Orlik T, Hoffmann I. Human Cdc25A phosphatase has a non-redundant function in G2 phase by activating Cyclin A-dependent kinases. *FEBS Lett.* 2009 Feb 18;583(4):841-7.

Timofeev O, Cizmecioglu O, Settele F, Kempf T, Hoffmann I. Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. *J Biol Chem.* 2010 May 28;285(22):16978-90.

Tomko RJ Jr¹, Lazo JS. Multimodal control of Cdc25A by nitrosative stress. *Cancer Res.* 2008 Sep 15;68(18):7457-65.

Tong LG, Wu WZ, Zhang YP, Zhou ZG, Chen YF, Huang WJ, Xu H, Su QQ. Expression of miR-16 in patients with T lymphoblastic lymphoma/acute lymphoblastic leukemia. [Article in Chinese] *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2014 Feb;22(1):99-103.

Trang P¹, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Homer R, Brown D, Bader AG, Weidhaas JB, Slack FJ. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene.* 2010 Mar 18; 29(11): 1580–1587.

Truesdell SS, Mortensen RD, Seo M, Schroeder JC, Lee JH, LeTonqueze O, Vasudevan S. MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP. *Sci Rep.* 2012;2:842.

Tumurbaatar I¹, Cizmecioglu O, Hoffmann I, Grummt I, Voit R. Human Cdc14B promotes progression through mitosis by dephosphorylating Cdc25 and regulating Cdk1/cyclin B activity. *PLoS One.* 2011 Feb 17;6(2):e14711.

Turowski P, Franckhauser C, Morris MC, Vaglio P, Fernandez A, Lamb NJ. Functional cdc25C dual-specificity phosphatase is required for S-phase entry in human cells. *Mol Biol Cell.* 2003 Jul;14(7):2984-98.

Uras IZ, Walter GJ, Scheicher R, Bellutti F, Prchal-Murphy M, Tigan AS, Valent P, Heidel FH, Kubicek S, Scholl C, Fröhling S, Sexl V. Palbociclib treatment of FLT3-ITD+ AML cells uncovers a kinase-dependent transcriptional regulation of FLT3 and PIM1 by CDK6. *Blood.* 2016 Jun 9;127(23):2890-902.

Vaiana CA, Kurcon T, Mahal LK. MicroRNA-424 Predicts a Role for β -1,4 Branched Glycosylation in Cell Cycle Progression. *J Biol Chem.* 2016 Jan 15;291(3):1529-37.

Van Roosbroeck K, Fanini F, Setoyama T, Ivan C, Rodriguez-Aguayo C, Fuentes-Mattei E, Xiao L, Vannini I, Redis RS, D'Abundo L, Zhang X, Nicoloso MS, Rossi S, Gonzalez-Villasana V, Rupaimoole R, Ferracin M, Morabito F, Neri A, Ruvolo PP, Ruvolo VR, Pecot CV, Amadori D, Abruzzo L, Calin S, Wang X, You MJ, Ferrajoli A, Orłowski R, Plunkett W, Lichtenberg TM, Davuluri RV, Berindan-Neagoe I, Negrini M, Wistuba II, Kantarjian HM, Sood AK, Lopez-Berestein G, Keating MJ, Fabbri M, Calin GA. Combining Anti-Mir-155 with Chemotherapy for the Treatment of Lung Cancers. *Clin Cancer Res.* 2017 Jun 1;23(11):2891-2904.

Vázquez-Novelle MD¹, Mailand N, Ovejero S, Bueno A, Sacristán MP. Human Cdc14A phosphatase modulates the G2/M transition through Cdc25A and Cdc25B. *J Biol Chem*. 2010 Dec 24;285(52):40544-53.

Vijayakumar S, Liu G, Rus IA, Yao S, Chen Y, Akiri G, Grumolato L, Aaronson SA. High-frequency canonical Wnt activation in multiple sarcoma subtypes drives proliferation through a TCF/ β -catenin target gene, CDC25A. *Cancer Cell*. 2011 May 17;19(5):601-12.

Vicente C, Conchillo A, García-Sánchez MA, Odero MD. The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Apr;82(1):1-17

Vigneron A, Cherier J, Barré B, Gamelin E, Coqueret O. The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J Biol Chem*. 2006 Nov 17;281(46):34742-50. Epub 2006 Aug 21.

Vigo E, Müller H, Prosperini E, Hateboer G, Cartwright P, Moroni MC, Helin K. CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol*. 1999 Sep;19(9):6379-95.

Wallace JA, Kagele DA, Eiring AM, Kim CN, Hu R, Runtsch MC, Alexander M, Huffaker TB, Lee SH, Patel AB, Mosbrugger TL, Voth WP, Rao DS, Miles RR, Round JL, Deininger MW, O'Connell RM. miR-155 promotes FLT3-ITD-induced myeloproliferative disease through inhibition of the interferon response. *Blood*. 2017 Jun 8;129(23):3074-3086.

Wallace JA, O'Connell RM. MicroRNAs and acute myeloid leukemia: therapeutic implications and emerging concepts. *Blood*. 2017 Sep 14; 130(11): 1290–1301.

Wang P, Zhu CF, Ma MZ, Chen G, Song M, Zeng ZL, Lu WH, Yang J, Wen S, Chiao PJ, Hu Y, Huang P. Micro-RNA-155 is induced by K-Ras oncogenic signal and promotes ROS stress in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2015 Aug 28;6(25):21148-58.

Wang DW, Wang YQ, Shu HS. MiR-16 inhibits pituitary adenoma cell proliferation via the suppression of ERK/MAPK signal pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Mar;22(5):1241-1248.

Wegener S, Hampe W, Herrmann D, Schaller HC. Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C. *Eur J Cell Biol*. 2000 Nov;79(11):810-5.

Williams M, Cheng YY, Blenkiron C, Reid G. Exploring Mechanisms of MicroRNA Downregulation in Cancer. *Microna*. 2017;6(1):2-16.

Wu L, Goodwin EC, Naeger LK, Vigo E, Galaktionov K, Helin K, DiMaio D. E2F-Rb complexes assemble and inhibit cdc25A transcription in cervical carcinoma cells following repression of human papillomavirus oncogene expression. *Mol Cell Biol*. 2000 Oct;20(19):7059-67.

Wu CF, Liu S, Lee YC, Wang R, Sun S, Yin F, Bornmann WG, Yu-Lee LY, Gallick GE, Zhang W, Lin SH, Kuang J. RSK promotes G2/M transition through activating phosphorylation of Cdc25A and Cdc25B. *Oncogene*. 2014 May 1;33(18):2385-94

Wu M, Li L, Hamaker M, Small D, Duffield AS. FLT3/ITD cooperates with Rac1 to modulate the sensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic agents via regulation of DNA repair pathways. *Haematologica*. 2019 Apr 11. pii: haematol.2018.208843. [Epub ahead of print]

Xia L, Zhang D, Du R, Pan Y, Zhao L, Sun S, Hong L, Liu J, Fan D. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int J Cancer*. 2008 Jul 15;123(2):372-379.

Xiao G, Tang H, Wei W, Li J, Ji L, Ge J. Aberrant Expression of MicroRNA-15a and MicroRNA-16 Synergistically Associates with Tumor Progression and Prognosis in Patients with Colorectal Cancer. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;2014:364549.

Xu X, Yamamoto H, Sakon M, Yasui M, Ngan CY, Fukunaga H, Morita T, Ogawa M, Nagano H, Nakamori S, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2003 May;9(5):1764-72

Xu X, Yamamoto H, Liu G, Ito Y, Ngan CY, Kondo M, Nagano H, Dono K, Sekimoto M, Monden M. CDC25A inhibition suppresses the growth and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med*. 2008 Feb;21(2):145-52.

Xu LH, Guo Y, Cen JN, Yan WY, He HL, Niu YN, Lin YX, Chen CS, Hu SY. Overexpressed miR-155 is associated with initial presentation and poor outcome in Chinese pediatric acute myeloid leukemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Dec;19(24):4841-50.

Xue G, Yan HL, Zhang Y, Hao LQ, Zhu XT, Mei Q, Sun SH. c-Myc-mediated repression of miR-15-16 in hypoxia is induced by increased HIF-2 α and promotes tumor angiogenesis and metastasis by upregulating FGF2. *Oncogene*. 2015 Mar 12;34(11):1393-406.

Yamaura T, Nakatani T, Uda K, Ogura H, Shin W, Kurokawa N, Saito K, Fujikawa N, Date T, Takasaki M, Terada D, Hirai A, Akashi A, Chen F, Adachi Y, Ishikawa Y, Hayakawa F, Hagiwara S, Naoe T, Kiyoi H. A novel irreversible FLT3 inhibitor, FF-10101, shows excellent efficacy against AML cells with *FLT3* mutations. *Blood*. 2018 Jan 25;131(4):426-438.

Yang X, Liu L, Sternberg D, Tang L, Galinsky I, DeAngelo D, Stone R. The FLT3 internal tandem duplication mutation prevents apoptosis in interleukin-3-deprived BaF3 cells due to protein kinase A and ribosomal S6 kinase 1-mediated BAD phosphorylation at serine112. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7338-47.

Yang X, Feng M, Jiang X, Wu Z, Li Z, Aau M, Yu Q. miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes Dev*. 2009 Oct 15;23(20):2388-93.

Yang X, Sexauer A, Levis M. Bone marrow stroma-mediated resistance to FLT3 inhibitors in FLT3-ITD AML is mediated by persistent activation of extracellular regulated kinase. *Br J Haematol*. 2014 Jan;164(1):61-72.

Yang TQ, Lu XJ, Wu TF, Ding DD, Zhao ZH, Chen GL, Xie XS, Li B, Wei YX, Guo LC, Zhang Y, Huang YL, Zhou YX, Du ZW. MicroRNA-16 inhibits glioma cell growth and invasion through suppression of BCL2 and the nuclear factor- κ B1/MMP9 signaling pathway. *Cancer Sci.* 2014 Mar;105(3):265-71.

Yang Y, Mei Q. miRNA signature identification of retinoblastoma and the correlations between differentially expressed miRNAs during retinoblastoma progression. *Mol Vis.* 2015 Dec 14;21:1307-17.

Yang IP, Tsai HL, Huang CW, Lu CY, Miao ZF, Chang SF, Juo SH, Wang JY. High blood sugar levels significantly impact the prognosis of colorectal cancer patients through down-regulation of microRNA-16 by targeting Myb and VEGFR2. *Oncotarget.* 2016 Apr 5;7(14):18837-50.

Ye W, Xue J, Zhang Q, Li F, Zhang W, Chen H, Huang Y, Zheng F. MiR-449a functions as a tumor suppressor in endometrial cancer by targeting CDC25A. *Oncol Rep.* 2014 Sep;32(3):1193-9.

Yi CH, Zheng T, Leaderer D, Hoffman A, Zhu Y. Cancer-related transcriptional targets of the circadian gene NPAS2 identified by genome-wide CHIP-on-chip analysis. *Cancer Lett.* 2009 Nov 1;284(2):149-56.

Yoshimoto G, Miyamoto T, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Iino T, Rocnik JL, Kikushige Y, Mori Y, Shima T, Iwasaki H, Takenaka K, Nagafuji K, Mizuno S, Niino H, Gilliland GD, Akashi K. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. *Blood* 2009 114:5034-5043

Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW, Zhang JW. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 13;349(1):59-68.

Yu DD, Lv MM, Chen WX, Zhong SL, Zhang XH, Chen L, Ma TF, Tang JH, Zhao JH. Role of miR-155 in drug resistance of breast cancer. *Tumour Biol.* 2015 Mar;36(3):1395-401

Yu M, Xue Y, Zheng J, Liu X, Yu H, Liu L, Li Z, Liu Y. Linc00152 promotes malignant progression of glioma stem cells by regulating miR-103a-3p/FEZF1/CDC25A pathway. *Mol Cancer.* 2017 Jun 26;16(1):110.

Yuan LL, Green AS, Bertoli S, Grimaldi F, Mansat-De Mas V, Dozier C, Tamburini J, Récher C, Didier C, Manenti S. Pim kinases phosphorylate Chk1 and regulate its functions in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2014 Feb;28(2):293-301.

Yuan JM, Shi XJ, Sun P, Liu JX, Wang W, Li M, Ling FY. Downregulation of cell cycle-related proteins in ovarian cancer line and cell cycle arrest induced by microRNA. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Oct 15;8(10):18476-81.

Yuan P, Li J, Zhou F, Huang Q, Zhang J, Guo X, Lyu Z, Zhang H, Xing J. NPAS2 promotes cell survival of hepatocellular carcinoma by transactivating CDC25A. *Cell Death Dis.* 2017 Mar 23;8(3):e2704.

Yue J, Tigyi G. Conservation of miR-15a/16-1 and miR-15b/16-2 clusters. *Mamm Genome.* 2010 Feb;21(1-2):88-94.

Zaidi SK, Dowdy CR, van Wijnen AJ, Lian JB, Raza A, Stein JL, Croce CM, Stein GS. Altered Runx1 subnuclear targeting enhances myeloid cell proliferation and blocks differentiation by activating a miR-24/MKP-7/MAPK network. *Cancer Res.* 2009 Nov 1;69(21):8249-55.

Zeigler FC, Bennett BD, Jordan CT, Spencer SD, Baumhueter S, Carroll KJ, Hooley J, Bauer K, Matthews W. Cellular and molecular characterization of the role of the flk-2/flt-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood.* 1994 Oct 15;84(8):2422-30.

Zhang S, Broxmeyer HE. p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jan 19;254(2):440-5.

Zhang S, Fukuda S, Lee Y, Hangoc G, Cooper S, Spolski R, Leonard WJ, Broxmeyer HE. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med.* 2000 Sep 4;192(5):719-28.

Zhang S, Broxmeyer HE. Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Oct 14;277(1):195-9.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007 Feb 1;302(1):1-12.

Zhang X, Neganova I, Przyborski S, Yang C, Cooke M, Atkinson SP, Anyfantis G, Fenyk S, Keith WN, Hoare SF, Hughes O, Strachan T, Stojkovic M, Hinds PW, Armstrong L, Lako M. A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A. *J Cell Biol.* 2009 Jan 12;184(1):67-82.

Zhang Y, Parsanejad M, Huang E, Qu D, Aleyasin H, Rousseaux MW, Gonzalez YR, Cregan SP, Slack RS, Park DS. Pim-1 kinase as activator of the cell cycle pathway in neuronal death induced by DNA damage. *J Neurochem.* 2010 Jan;112(2):497-510

Zhang TJ, Wu DH, Zhou JD, Li XX, Zhang W, Guo H, Ma JC, Deng ZQ, Lin J, Qian J. Overexpression of miR-216b: Prognostic and predictive value in acute myeloid leukemia. *J Cell Physiol.* 2018 Apr;233(4):3274-3281.

Zhang W, Zeng Q, Ban Z, Cao J, Chu T, Lei D, Liu C, Guo W, Zeng X. Effects of let-7c on the proliferation of ovarian carcinoma cells by targeted regulation of CDC25a gene expression. *Oncol Lett.* 2018 Nov;16(5):5543-5550.

Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizingradiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 12;99(23):14795-800.

Zhao Z, Ma X, Sung D, Li M, Kostic A, Lin G, Chen Y, Pertsemlidis A, Hsiao TH, Du L. microRNA-449a functions as a tumor suppressor in neuroblastoma through inducing cell differentiation and cell cycle arrest. *RNA Biol.* 2015;12(5):538-54.

- Zhao S, Wang Y, Guo T, Yu W, Li J, Tang Z, Yu Z, Zhao L, Zhang Y, Wang Z, Wang P, Li Y, Li F, Sun Z, Xuan Y, Tang R, Deng WG, Guo W, Gu C. YBX1 regulates tumor growth via CDC25a pathway in human lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016 Dec 13;7(50):82139-82157.
- Zhao Y, Wang F, Chen S, Wan J, Wang G. Methods of MicroRNA Promoter Prediction and Transcription Factor Mediated Regulatory Network. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 7049406.
- Zheng R, Levis M, Piloto O, Brown P, Baldwin BR, Gorin NC, Beran M, Zhu Z, Ludwig D, Hicklin D, Witte L, Li Y, Small D. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. : *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):267-74.
- Zhou B¹, Shu B¹, Xi T², Su N³, Liu J. Dub3 expression correlates with tumor progression and poor prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Biomed Pharmacother*. 2015 Mar;70:84-9.
- Zhu S¹, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*. 2008 Mar;18(3):350-9.
- Zhu X, Wu L, Yao J, Jiang H, Wang Q, Yang Z, Wu F. MicroRNA let-7c Inhibits Cell Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest by Targeting CDC25A in Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2015 Apr 24;10(4):e0124266.
- Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 2002;21:3295–3313.
- Zidan HE, Abdul-Maksoud RS, Elsayed WSH, Desoky EAM. Diagnostic and prognostic value of serum miR-15a and miR-16-1 expression among egyptian patients with prostate cancer. : *IUBMB Life*. 2018 May;70(5):437-444.
- Zou X, Tsutsui T, Ray D, Blomquist JF, Ichijo H, Ucker DS, Kiyokawa H. The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*. 2001 Jul;21(14):4818-28.
- Zriwil A, Böiers C, Kristiansen TA, Wittmann L, Yuan J, Nerlov C, Sitnicka E, Jacobsen SEW. Direct role of FLT3 in regulation of early lymphoid progenitors. *Br J Haematol*. 2018 Nov;183(4):588-600.
- Zubillaga-Guerrero MI, Alarcón-Romero Ldel C, Illades-Aguiar B, Flores-Alfaro E, Bermúdez-Morales VH, Deas J, Peralta-Zaragoza O. MicroRNA miR-16-1 regulates CCNE1 (cyclin E1) gene expression in human cervical cancer cells. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Sep 15;8(9):15999-6006.

ANNEXES

VI. Manuscrit

STAT5-dependent regulation of CDC25A by miR-16 controls proliferation and differentiation in FLT3-ITD acute myeloid leukemia

Gabrielle Sueur^{1,2}, Alison Boutet^{1,2}, Mathilde Gotanère¹, Véronique Mansat- De Mas^{1,2,3,5}, Arnaud Besson⁴, Stéphane Manenti^{1,2,*} and Sarah Bertoli^{1,2,5,6*}.

(* equal participation; co-corresponding author)

¹Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), INSERM U1037, CNRS ERL5294, University of Toulouse, France

²Equipe labellisée La Ligue contre le Cancer 2016, Toulouse, France

³Laboratoire d'hématologie, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole

⁴Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, UPS and CNRS, Toulouse, France.

⁵Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

⁶Service d'hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole (IUCT-O), Toulouse, France

Correspondence to:

Sarah Bertoli: Bertoli.Sarah@iuct-oncopole.fr

Stéphane Manenti: stephane.manenti@inserm.fr

Key words: Acute myeloid leukemia; miR-16; FLT3-ITD; STAT5; CDC25A; proliferation; differentiation

Running title: miR-16 regulates CDC25A in AML

Abstract

We recently identified the CDC25A phosphatase as a key actor in proliferation and differentiation in acute myeloid leukemia which expresses the FLT3-ITD mutation. In this paper we demonstrate that CDC25A level is controlled by a complex STAT5/miR-16 transcription and translation pathway working downstream of this receptor. First, we established by CHIP analysis that STAT5 is directly involved in FLT3-ITD-dependent *CDC25A* gene transcription. In addition, we determined that miR-16 expression is repressed by FLT3-ITD activity, and that STAT5 participates in this repression. In accordance with these results, miR-16 expression was significantly reduced in a panel of AML primary samples carrying the FLT3-ITD mutation when compared with FLT3wt cells. The expression of a miR-16 mimic reduced CDC25A protein and mRNA levels, and RNA interference-mediated down modulation of miR-16 restored CDC25A expression in response to FLT3-ITD inhibition. Finally, decreasing miR-16 expression partially restored the proliferation of cells treated with the FLT3 inhibitor AC220, while the expression of miR-16 mimic stopped this proliferation and induced monocytic differentiation of AML cells. In summary, we identified a FLT3-ITD/STAT5/miR-16/CDC25A axis essential for AML cell proliferation and differentiation.

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) arises from the malignant clonal expansion of undifferentiated myeloid precursors, resulting in bone marrow failure. Although many AML patients initially respond to conventional induction therapy, relapses are common and the prognosis is very poor (1). Over the past few decades, extensive molecular characterization studies have highlighted the complex heterogeneity of AML (2) but more in-depth knowledge of the biology of AML is still required in order to rationally design more effective therapies. The most common genetic abnormalities, which occur in about 30% of AML patients, can be found within the Fms-Like Tyrosine kinase 3 (*FLT3*) gene which encodes a receptor tyrosine kinase (RTK) (2). The most frequent mutations in this gene occur via internal tandem duplication (*FLT3-ITD*) in the juxtamembrane domain, or through point mutations, usually of the Asp835 residue within the activation loop (*FLT3-TKD*). Both types of mutations result in constitutive activation of FLT3 and promote leukemic cell proliferation and survival. The poor outcome associated with FLT3-ITD mutations (3) has generated great interest in the development of specific tyrosine kinase inhibitors (TKI). Recently, an improvement in overall survival was shown for the first time through a randomized phase-3 controlled trial that combined first-generation multi-targeted type II FLT3-TKI midostaurin (PKC412) with

standard chemotherapy in both newly diagnosed FLT3-ITD and FLT3-TKD AML, and which led to the approval of midostaurin in this indication in 2017 and its common use since then (4). Among the next generation of highly specific FLT3 TKIs that have been developed, quizartinib (AC220) compares favorably in monotherapy to standard treatment in refractory or relapsed AML (QuANTUM-R trial (NCT02039726) (5)), and is currently being evaluated in first line treatment in combination with chemotherapy (QuANTUM-First trial (NCT02668653)). However, resistance to FLT3 TKI treatment still commonly occurs due to the persistence of downstream signaling pathways (*e.g.* MAPK), point mutations (*e.g.* FLT3-TKD), or micro-environmental factors (3). Although significant efforts are being made to develop more efficient tyrosine kinase inhibitors (*e.g.* potent type II FLT3 TKI, namely gilteritinib, crenolanib or FF-10101) or to combine FLT3 inhibitors with other targeted therapies (*e.g.*, with Bcl2 inhibitor venetoclax (6), NCT03625505), novel approaches to eradicate FLT3-mutated leukemic cells are still lacking.

Although cell signaling pathways activated by FLT3-ITD are well characterized, cell cycle proteins that may account for deregulated proliferation of these cells remain poorly documented. In a recent work, we identified the dual-specificity phosphatase CDC25A as an early target of FLT3-ITD signaling and as a master actor in proliferation and differentiation arrest of these leukemic cells (7). CDC25A is a dual-specificity phosphatase that drives cyclin-dependent kinases activation during the cell cycle, with important functions during replication, mitosis, and G1 progression. CDC25A knock-out is lethal at an early stage of embryonic development. Its overexpression has been described in different categories of cancers, and is often associated with a poor prognosis (8). However, there are only a few studies concerning CDC25A in AML or other myeloid malignancies. CDC25A expression is increased by leukemic cell adhesion to fibronectin, and it participates in the adhesion-dependent increased proliferation of these cells (9). CDC25A is also constitutively expressed downstream of oncogenic tyrosine kinases, including NPM-ALK and BCR-ABL (10), as well as JAK2V617F in myeloproliferative neoplasms (11). CDC25A is finely regulated both at the gene and protein levels (12) and moderate variations in its expression affect genomic stability and oncogenic transformation (13). Consequently, better understanding of CDC25A regulation pathways in pathophysiological models appears to be of highest interest in order to identify new potential therapeutic targets.

We recently identified the STAT5 transcription factor as an intermediate between FLT3-ITD and CDC25A regulation in AML. However, the precise mechanism of this regulation remained undefined. In this paper we demonstrate that miR-16 regulates CDC25A protein levels downstream of FLT3-ITD in a STAT5-dependent manner, and that manipulating miR-16 has a high impact on the proliferation and differentiation of AML cells.

Methods

Cell lines and reagents

Human acute myeloid leukemia cell lines MOLM-14, MV4-11, OCI-AML3, HEL (DSMZ), and MOLM-14-TKD (provided by Dr. J Tamburini, Paris) were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco). All cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator. The Akt inhibitor VIII and STAT5 inhibitors were purchased from Calbiochem. The FLT3 inhibitor quizartinib AC220 and the MEK inhibitor PD0325901 were purchased from Selleck Chemicals. FLT3 ligand was purchased from R&D Systems, and D Actinomycin was purchased from Sigma.

Chromatin immuno-precipitation (ChIP)

Cells were crosslinked, lysed and sonicated according to (14), then STAT5 and RNA polymerase II immunoprecipitation was performed according to (15). The antibodies used for immunoprecipitation were STAT5 A (Santa Cruz) and STAT5 B (Santa Cruz), 1.2 µg each, and RNA Polymerase II CTD (Clinisciences), 2µg. DNA from ChIP was isolated with a phenol/chloroform extraction, and used for qPCR with the primers listed in Supplementary Table 2. Results were then normalized using the percent input method.

Patient samples and clonogenic assays

Patient samples' origins and characteristics are described in the *Online Supplementary Methods* and Supplementary Table 2.

Frozen patient cells were thawed in IMDM medium with 20% FBS and immediately processed for treatment. For clonogenic assays, cells were grown in duplicate in H4230 methylcellulose medium (Stem Cell Technologies) supplemented with 10% 5637-conditioned medium in 35mm petri dishes for 7 days in a humidified CO₂ incubator. Leukemic colonies were then scored under an inverted microscope.

Transduction of primary cells

To generate lentiviral vectors that express the micro-RNA 16, the miR-16 hairpin sequence was cloned into the pLKO.1 lentiviral vector. We used 293T packaging cells co-transfected with lentiviral protein (GAG, POL, and REV) that encode plasmids and our control (a scrambled shRNA hairpin sequence) or miR-16 plasmids. Supernatants containing lentivirus were collected for the next two day. Patient cells were thawed, plated at 1.5 million cells/ml and spinoculated for an hour with the concentrated lentiviral particles, before being inoculated for clonogenic assays.

Flow cytometry

Cells were stained for 30 minutes with the anti-human monoclonal antibody CD11b-PE (Beckman Coulter) or CD14-FITC (Beckman Coulter). Annexin V-FITC or APC (BD Biosciences) and 7-AAD (Cell viability assay, BD Biosciences) were used to assess cell viability. Data were collected on a MacsQuant cytometer (BD Biosciences), and analyzed using the FlowJo software (BD Biosciences)

Statistics

Experiments in cell lines were performed at least 3 times. Results are expressed as mean value +/- SEM. Statistical analysis of the data was performed by the Mann-Whitney U test using the GraphPad Prism software, version 5.0 (GraphPad Software Inc.). Differences were considered as significant for p values < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p<0.001 (***).

Results

STAT5 regulates CDC25A mRNA and protein levels

In a previous work (7), we showed that FLT3-ITD inhibition induced rapid (2 hours) down-regulation of CDC25A mRNA and protein in the FLT3-ITD AML cell line MOLM-14, and we identified STAT5 as a regulator of CDC25A protein level in this model. Based on these data, we investigated the mechanisms by which CDC25A is regulated downstream of FLT3-ITD. Because STAT5 is a transcription factor, we first examined whether RNA interference-mediated STAT5 down-regulation could impact CDC25A mRNA level. As shown in figure 1A, 24 hours after transfecting MV4-11 cells with STAT5 siRNA, the level of CDC25A mRNA was decreased by 50%, and CDC25A protein level was dramatically reduced at the same time (Figure 1A). Similarly, a pharmacological inhibitor of STAT5 reduced both CDC25A mRNA and protein levels as early as 4 hours after treatment (Figure 1B).

These data suggest that STAT5 regulates CDC25A, either directly through gene transcription, or indirectly through post-transcriptional mechanisms that affect its mRNA level, or both.

FLT3-ITD and STAT5 are involved in CDC25A transcription

To establish whether FLT3-ITD activity and STAT5 modulate CDC25A transcription, we performed chromatin-immunoprecipitation (ChIP) experiments on MOLM-14 or MV4-11 AML cells treated with an FLT3 inhibitor. The experimental design is shown in figure 2A. First, we performed RNA Polymerase II immune-precipitation and found that the association of RNA polymerase II with the CDC25A promoter was disrupted in the presence of the FLT3 inhibitor (figure 2B), indicating that FLT3-ITD activity indeed controls CDC25A transcription. Similar experiments performed with a STAT5 inhibitor suggest that STAT5 is involved in this transcriptional regulation (Figure 2C). To obtain direct evidence of CDC25A transcriptional regulation by STAT5, we then performed ChIP experiments with a STAT5 antibody in MOLM-14 cells treated with the FLT3 inhibitor. These experiments revealed (i) that the STAT5 factor is indeed present on the CDC25A promoter in these leukemic cells, and (ii) that this association is dependent on FLT3-ITD activity (Figure 2D). To our knowledge these data represent the first direct evidence of a transcriptional regulation of CDC25A by STAT5, and they demonstrate that FLT3-ITD activity controls this process.

FLT3-ITD and STAT5 induce miR-16 down-regulation in AML cells

Since CDC25A is extensively regulated at transcriptional and post-transcriptional levels by several pathways (12), we examined whether other mechanisms besides transcription could account for modifications in CDC25A level in AML cells. We specifically focused our attention on the micro RNA miR-16, a known tumor suppressor that has been reported to regulate CDC25A in response to UV-induced DNA damage (16), and which was found to be down-regulated in murine FDCP-1 cells that express FLT3-ITD (17). First, we tested the impact of FLT3 inhibition on miR-16 level in human MOLM-14 and MV4-11 cells. As shown in figure 3A, miR-16 was significantly increased after two hours of FLT3-ITD inhibition. In order to investigate the physiological meaning of these data, we established the status of miR-16 expression in primary cells from AML patients. As shown in figure 3B, miR-16 level was significantly lower in AML cells that express FLT3-ITD, further confirming that FLT3-ITD activity negatively regulates miR-16 expression. We then examined whether STAT5 could also regulate miR-16 expression in these cell lines. RNA interference-mediated down-regulation of STAT5 indeed increased miR-16 level to the same extent as FLT3 inhibition (figure 3C). In contrast, inhibiting either ERK or Akt, two other important pathways constitutively activated downstream of FLT3-ITD, did not modify miR-16 levels (figure 3D). From these experiments, we

concluded that miR-16 level is negatively controlled by FLT3-ITD in a STAT5-dependent way in AML. Since miR-16 is part of two complex loci also expressing either miR-15-a, or miR-15-b, we also tested whether the level of these 2 micro-RNAs was dependent of FLT3 activity. As shown in Supplementary figure 1, FLT3 inhibition did not impact the levels of miR-15-a, or b, which indicates that the regulation of miR-16 expression by FLT3-ITD is not a regulation of either of the miR-16 cluster genes, as this would also impact miR-15-a or b expression.

MiR-16 regulates CDC25A protein level

We then examined whether miR-16 regulates CDC25A protein level downstream of FLT3-ITD. Transfection of FLT3-ITD AML cell lines with miR-16 mimic indeed dramatically reduced CDC25A protein levels (figure 3E). To further specify this process, we then used an RNA interference strategy to repress miR-16 expression in MOLM-14 and MV4-11 cells treated with the FLT3i AC220 (figure 3F). As expected, down-regulating miR-16 in these conditions totally rescued CDC25A protein expression on FLT3 inhibition, demonstrating that miR-16 is the major regulator of CDC25A protein level downstream of FLT3-ITD. We then tested whether miR-16 also regulates CDC25A protein expression downstream of STAT5. As expected, inhibiting miR-16 completely restored CDC25A protein expression in MOLM-14 cells transfected with STAT5 siRNA (figure 3G), which confirms the existence of a FLT3-ITD/STAT5/miR-16/CDC25A axis in these AML cells.

To further specify how miR-16 regulates CDC25A translation, we then measured CDC25A mRNA level by Q-PCR. In contrast to our observations concerning CDC25A protein level, miR-16 inhibition only very partially restored CDC25A mRNA expression when FLT3-ITD is inhibited in MOLM-14 cells, and not at all when FLT3-ITD is inhibited or STAT5 is down-regulated in MV4-11 cells (Supplementary Fig 2 A and B). Moreover, when CDC25A mRNA stability was studied using an Actinomycin-D chase experiment only a low impact of FLT3 inhibition (Supplementary Fig 2 C) and no impact of STAT5 knockdown (Supplementary Fig 2D) on CDC25A mRNA half-life were shown. Altogether these results imply that although miR-16 might somehow destabilize CDC25A mRNA, its major function resides in the inhibition of mRNA translation.

The STAT5/miR-16/CDC25A axis is specific to FLT3-ITD AML cells

We then examined whether these molecular pathways specifically work downstream of FLT3-ITD. In order to do this, we first used the HEL leukemic cell line, which expresses the mutant tyrosine kinase JAK2V617F but not the FLT3 receptor, and in which we previously described a STAT5-dependent regulation of CDC25A (11). As shown in figure 4A, RNA interference-mediated down-regulation of

STAT5 actually induced a dramatic decrease in CDC25A protein level, but inhibiting miR-16, which was modestly increased under these conditions (figure 4B), did not restore CDC25A protein level. This indicates that STAT5 regulation of CDC25A does not depend on miR-16 in this cell line. In the OCI-AML3 leukemic cell line, which expresses wild type FLT3, activating FLT3 with FLT3 ligand, or inhibiting the receptor with AC220, modified neither CDC25A protein nor the miR-16 level (Figure 4C-D). Overall, these data obtained in human leukemic cells suggest that several different signaling pathways operate in different cell lines to regulate CDC25A, and that the STAT5/miR-16/CDC25A pathway specifically acts downstream of the FLT3-ITD mutant receptor in AML.

MiR-16 regulates FLT3-ITD AML cell proliferation and differentiation

Considering that we identified CDC25A as a master regulator of FLT3-ITD AML proliferation and differentiation, we decided to investigate whether this is also the case for miR-16. Expressing miR-16 mimic in MOLM-14 or MV4-11 cells for 72 hours significantly decreased their proliferation (figure 5A). Interestingly, this was not the case in the OCI-AML3 AML cells that express wild type FLT3. Down-regulating miR-16 partially restored proliferation of MOLM-14 or MV4-11 cells treated with the FLT3 inhibitor AC220 (Figure 5B), suggesting that miR-16 regulation and functions could be central to the therapeutic effects of FLT3 inhibitors. We then tested the importance of miR-16 in a MOLM-14-TKD cell line that is resistant to FLT3-ITD inhibition (7, 18). Overexpressing miR-16 also reduced cell proliferation in this case, suggesting that targeting this pathway could overcome some of the resistance observed with FLT3-ITD kinase inhibitors (Figure 5A). In accordance with these results, the clonogenic potential of primary cells from a FLT3-ITD-positive patient was reduced when miR-16 was overexpressed, while there was no impact in FLT3wt primary samples (Figure 5C).

In addition to proliferation, we then examined whether miR-16 down-regulation by FLT3-ITD was involved in the differentiation block of these cells. As seen in figure 5D, miR-16 expression induced differentiation of MOLM-14 cells, as indicated by increased expression of the cell surface differentiation marker CD11b. Interestingly, this was also the case in MOLM-14-TKD cells that are resistant to FLT3 inhibition, but not in cells that express wild type FLT3 (OCI-AML3). Finally, we also observed re-expression of the CD14 but not the CD15 surface differentiation marker with miR-16 overexpression (figures 5E and F), suggesting that monocytic rather than granulocytic differentiation was induced by miR-16 in FLT3-ITD cells, which is highly consistent with our previous work on CDC25A (7).

Discussion

In this work we investigated the molecular mechanisms that control *CDC25A* transcription and translation in acute myeloid leukemia cells that express the FLT3-ITD mutant tyrosine kinase receptor. This investigation picks up where our previous study leaves off, in which we identified this phosphatase as a master determinant of proliferation and differentiation arrest in this leukemic subtype (7). In general, *CDC25A* expression is tightly regulated in myeloid malignancies that express tyrosine kinase mutations (7, 11) in which STAT5 and STAT3 pathways are most often activated. Transcriptional regulations of *CDC25A* by E2F1 (19), myc (20) and STAT3 (21) have been described previously in different cellular contexts. However, the question of STAT5-mediated transcriptional regulation of *CDC25A* remained an open one. In our study, STAT5 is identified at the *CDC25A* promoter for the first time, and we highlight the importance of STAT5 activity for proper *CDC25A* transcription downstream of the FLT3-ITD receptor. It has been reported that STAT3 associates with myc or Rb to respectively activate or inhibit *CDC25A* transcription (21). Therefore, whether STAT5 associates with transcriptional partners to finely tune *CDC25A* transcription in AML cells remains an interesting question.

The importance of STAT factors in hematological models has been extensively documented (22, 23), and researchers have been taking interest in the clinical relevance of these factors as targets in various cancer models (24, 25). Recently, a study in MDS and AML models showed an impairment in leukemic growth *in vivo* and an increase in differentiation in primary progenitor cells with the use of a clinical antisense nucleotide that targets STAT3 (26). Our current findings along with those of other studies (27, 28) highlight and specify the importance of STAT5 as part of an essential pathway for FLT3-ITD AML proliferation and survival, and efforts to target STAT5 in AML are in progress (29).

In addition to this direct transcriptional regulation, we have highlighted another *CDC25A* regulation pathway downstream of FLT3-ITD involving STAT5 as well. In fact, we identified micro-RNA 16 as a key negative regulator of *CDC25A* protein expression downstream of FLT3-ITD and STAT5 in AML cells. First, our data support the argument that STAT5 is an actor in miR-16 regulation downstream of FLT3-ITD. STAT5 has been shown to regulate miR-16-2 and miR15-b expression in multiple myeloma (30) by inhibiting the transcription of their cluster gene, SMC4. However, in AML cell lines, we found no effect of FLT3 inhibition on miR-15-a, or -b expression, which suggests a more complex regulation of miR-16 that may involve maturation rather than transcriptional regulation of one or both cluster genes (for a review see 31).

Our data also point to the fact that miR-16 is an important determinant of *CDC25A* protein level downstream of FLT3-ITD. MiR-16-dependent regulation of *CDC25A* has been previously reported in response to UV radiation-induced DNA damage, participating in the checkpoint response and proliferation arrest observed in these conditions (16). In this study, we demonstrate that miR-16-dependent regulation of *CDC25A* is not restricted to DNA damage response, and could participate in

the response of leukemic cells to tyrosine kinase inhibitors. There are 2 seed sequences of miR-16 in the 3'UTR region of CDC25A mRNA. This strongly suggests a direct interaction between miR-16 and CDC25A mRNA, as was suggested with a luciferase reporter system in HeLa cells in response to UV radiation (16). However, in this study we did not detect a significant impact of miR-16 expression on CDC25A mRNA level in AML cells, which suggests that depending on the cell and the environmental conditions, the functional miR-16 molecular mechanisms may differ.

In a previous work, Kim et al described a down-regulation of miR-16 by FLT3-ITD (17). Pim1 regulation by miR-16 has been described in a murine cell line model overexpressing FLT3-ITD (17). However our data do not support the argument that Pim1 is a miR-16 target in the human FLT3-ITD AML cell lines MOLM-14 and MV4-11 (see figure 3E). It remains to be established whether this discrepancy is due to the distinct AML cell models used in both studies or to other unknown parameters. However, considering that transcriptional regulation of Pim1 by STAT5 is a well-established event downstream of FLT3-ITD (32, 33), this may suggest the existence of a complex oncogenic signaling network including STAT5, miR-16, Pim1, and CDC25A that still needs to be clarified.

MiR-16 is considered to be a tumor suppressor because it negatively regulates the expression of pro-oncogenic proteins involved in cell proliferation and cell death. Therefore, some studies aimed at expressing miR-16 as a therapeutic approach have been developed in a murine model of CLL (34, 35). However the use of micro RNAs as therapeutic tools remains rather unsuccessful as they have never progressed beyond a phase I trial (36). This emphasizes the need for a clearer understanding of the networks of proteins regulated downstream of these oligonucleotides. Although we describe CDC25A as an important target of miR-16 in this study, it is unlikely that all the effects of miR-16 expression in FLT3-ITD cells are only due to CDC25A regulation. For instance, in terms of the effects of miR-16 expression on the differentiation process, it should be noted that this RNA is involved in retinoic acid induced differentiation (37), and that PU.1, an important transcriptional regulator of myeloid differentiation, has been described as a miR-16 target (38). Whether or not the miR-16-dependent differentiation that we observed in FLT3-ITD AML cells is linked with these pathways remains to be investigated. With regards to its cancer relevance, another interesting miR-16 target that has been established is the anti-apoptotic protein Bcl2 (39). Bcl2 inhibitors are currently being introduced as potential therapeutic tools in AML (40), and interestingly, a synergy between venetoclax and the FLT3-inhibitor quizartinib has been described (41). It would be interesting to establish whether miR-16-dependent regulation of Bcl2 is involved in this process.

References

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2015; **373**(12):1136-52.
2. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016; **374**(23):2209-2221
3. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019; **33**(2):299-312
4. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, Thiede C, Prior TW, Döhner K, Marcucci G, Lo-Coco F, Klisovic RB, Wei A, Sierra J, Sanz MA, Brandwein JM, de Witte T, Niederwieser D, Appelbaum FR, Medeiros BC, Tallman MS, Krauter J, Schlenk RF, Ganser A, Serve H, Ehninger G, Amadori S, Larson RA, Döhner H. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017 Aug 3; **377**(5):454-464
- 5 Jorge E. Cortes, Samer K. Khaled, Giovanni Martinelli, Alexander E. Perl, Siddhartha Ganguly, Nigel H. Russell, Alwin Kramer, Herve Dombret, Donna Hogge, Brian A. Jonas, Anskar Y.-H. Leung, Priyanka Mehta, Pau Montesinos, Markus P. Radsak, Simona Sica, Meena Arunachalam, Melissa Holmes, Ken Kobayashi, Ruth Namuyinga, Nanxiang Ge, Antoine Yver, Yufen Zhang and Mark J. Levis. Efficacy and Safety of Single-Agent Quizartinib (Q), a Potent and Selective FLT3 Inhibitor (FLT3i), in Patients (pts) with FLT3-Internal Tandem Duplication (FLT3-ITD)-Mutated Relapsed/Refractory (R/R) Acute Myeloid Leukemia (AML) Enrolled in the Global, Phase 3, Randomized Controlled Quantum-R Trial. *Blood*. 2018; 132:563
- 6 Grundy M, Seedhouse C, Jones T, Elmi L, Hall M, Graham A, Russell N, Pallis M. Predicting effective pro-apoptotic anti-leukaemic drug combinations using co-operative dynamic BH3 profiling. *PLoS One*. 2018; **13**(1):e019068
- 7 Bertoli S, Boutzen H, David L, Larrue C, Vergez F, Fernandez-Vidal A, Yuan L, Hospital MA, Tamburini J, Demur C, Delabesse E, Saland E, Sarry JE, Galcera MO, Mansat-De Mas V, Didier C, Dozier C, Récher C, Manenti S. CDC25A governs proliferation and differentiation of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2015; 6:38061-38078
- 8 Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer*. 2007; **7**(7):495-507
- 9 Fernandez-Vidal A, Ysebaert L, Didier C, Betous R, De Toni F, Prade-Houdellier N, Demur C, Contour-Galcéra MO, Prévost GP, Ducommun B, Payrastra B, Racaud-Sultan C, Manenti S. Cell adhesion regulates CDC25A expression and proliferation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2006; **66**(14):7128-35

- 10 Fernandez-Vidal A, Mazars A, Gautier EF, Prévost G, Payrastra B, Manenti S. Upregulation of the CDC25A phosphatase down-stream of the NPM/ALK oncogene participates to anaplastic large cell lymphoma enhanced proliferation. *Cell Cycle*. 2009; **8**(9): 1373-9
- 11 Gautier EF, Picard M, Laurent C, Marty C, Villeval JL, Demur C, Delhommeau F, Hexner E, Giraudier S, Bonneville N, Ducommun B, Récher C, Laurent G, et al. The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2V617F oncogene. *Blood*. 2012; **119**(5): 1190-9
12. Fernandez-Vidal A, Mazars A, Manenti S. CDC25A: a rebel within the CDC25 phosphatases family? *Anticancer Agents Med Chem*. 2008; **8**(8): 825-31
- 13 Ray D, Kiyokawa H. CDC25A phosphatase: a rate-limiting oncogene that determines genomic stability. *Cancer Res*. 2008; **68**(5):1251-3
- 14 Pelish HE, Liao BB, Nitulescu II, Tangpeerachaikul A, Poss ZC, Da Silva DH, Caruso BT, Arefolov A, Fadeyi O, Christie AL, Du K, Banka D, Schneider EV, Jestel A, Zou G, Si C, Ebmeier CC, Bronson RT, Krivtsov AV, Myers AG, Kohl NE, Kung AL, Armstrong SA, Lemieux ME, Taatjes DJ, Shair MD. Mediator kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML. *Nature*. 2015 Oct 8; **526**(7572):273-276.
- 15 Rascole A, Johnston JA, Amati B. Deacetylase activity is required for recruitment of the basal transcription machinery and transactivation by STAT5. *Mol Cell Biol*. 2003; **23**(12):4162-73.
- 16 Pothof J, Verkaik NS, van IJcken W, Wiemer EA, Ta VT, van der Horst GT, Jaspers NG, van Gent DC, Hoeijmakers JH, Persengiev SP. MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *EMBO J*. 2009; **28**(14):2090-9.
- 17 Kim KT, Carroll AP, Mashkani B, Cairns MJ, Small D, Scott RJ. MicroRNA-16 is down-regulated in mutated FLT3 expressing murine myeloid FDC-P1 cells and interacts with Pim-1. *PLoS One*. 2012; **7**(9):e44546.
18. Larrue C, Saland E, Vergez F, Serhan N, Delabesse E, Mansat-De Mas V, Hospital MA, Tamburini J, Manenti S, Sarry JE, Récher C. Antileukemic Activity of 2-Deoxy-d-Glucose through Inhibition of N-Linked Glycosylation in Acute Myeloid Leukemia with FLT3-ITD or c-KIT Mutations. *Mol Cancer Ther*. 201; **14**(10):2364-73.
- 19 Vigo E, Müller H, Prosperini E, Hateboer G, Cartwright P, Moroni MC, Helin K. CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol*. 1999; **19**(9):6379-95.

- 20 Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*. 1996; **382**(6591):511-7.
- 21 Barré B, Vigneron A, Coqueret O. The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. *J Biol Chem*. 2005; **280**(16):15673-81.
- 22 Coffey PJ, Koenderman L, de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene*. 2000; **19**(21):2511-22.
- 23 Bunting KD. STAT5 signaling in normal and pathologic hematopoiesis. *Front Biosci*. 2007; **12**:2807-20.
- 24 Rani A, Murphy JJ. STAT5 in Cancer and Immunity. *J Interferon Cytokine Res*. 2016; **36**(4):226-37.
- 25 Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol*. 2017; **451**:1-14.
- 26 Shastri A, Choudhary G, Teixeira M, Gordon-Mitchell S, Ramachandra N, Bernard L, Bhattacharyya S, Lopez R, Pradhan K, Giricz O, Ravipati G, Wong LF, Cole S, Bhagat TD, Feld J, Dhar Y, Bartenstein M, Thiruthuvanathan VJ, Wickrema A, Ye BH, Frank DA, Pellagatti A, Boultonwood J, Zhou T, Kim Y, MacLeod AR, Epling-Burnette PK, Ye M, McCoon P, Woessner R, Steidl U, Will B, Verma A. Antisense STAT3 inhibitor decreases viability of myelodysplastic and leukemic stem cells. *J Clin Invest*. 2018; **128**(12):5479-5488.
- 27 Gerloff D, Grundler R, Wurm AA, Bräuer-Hartmann D, Katzerke C, Hartmann JU, Madan V, Müller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G. NF- κ B/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015; **29**(3):535-47.
- 28 Nogami A, Okada K, Ishida S, Akiyama H, Umezawa Y, Miura O. Inhibition of the STAT5/Pim Kinase Axis Enhances Cytotoxic Effects of Proteasome Inhibitors on FLT3-ITD-Positive AML Cells by Cooperatively Inhibiting the mTORC1/4EBP1/S6K/Mcl-1 Pathway. *Transl Oncol*. 2019; **12**(2):336-349.
- 29 Wingelhofer B, Maurer B, Heyes EC, Kumaraswamy AA, Berger-Becvar A, de Araujo ED, Orlova A, Freund P, Ruge F, Park J, Tin G, Ahmar S, Lardeau CH, Sadovnik I, Bajusz D, Keserü GM, Grebien F, Kubicek S, Valent P, Gunning PT, Moriggl R. Pharmacologic inhibition of STAT5 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018; **32**(5):1135-1146.

- 30 Li G, Miskimen KL, Wang Z, Xie XY, Brenzovich J, Ryan JJ, Tse W, Moriggl R, Bunting KD. STAT5 requires the N-domain for suppression of miR15/16, induction of bcl-2, and survival signaling in myeloproliferative disease. *Blood*. 2010; **115**(7):1416-24.
- 31 Liu T, Xu Z, Ou D, Liu J, Zhang J. The miR-15a/16 gene cluster in human cancer: A systematic review. *J Cell Physiol*. 2019; **234**(5):5496-5506.
- 32 Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J*. 1999; **18**(17):4754-65.
- 33 Mizuki M, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Böhmer FD, Müller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood*. 2003; **101**(8):3164-73.
- 34 Kasar S, Salerno E, Yuan Y, Underbayev C, Vollenweider D, Laurindo MF, Fernandes H, Bonci D, Addario A, Mazzella F, Raveche E. Systemic in vivo lentiviral delivery of miR-15a/16 reduces malignancy in the NZB de novo mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Immun*. 2012; **13**(2):109-19.
- 35 Cutrona G, Matis S, Colombo M, Massucco C, Baio G, Valdora F, Emionite L, Fabris S, Recchia AG, Gentile M, Neumaier CE, Reverberi D, Massara R, Boccardo S, Basso L, Salvi S, Rosa F, Cilli M, Zupo S, Truini M, Tassone P, Calabrese M, Negrini M, Neri A, Morabito F, Fais F, Ferrarini M. Effects of miRNA-15 and miRNA-16 expression replacement in chronic lymphocytic leukemia: implication for therapy. *Leukemia*. 2017; **31**(9):1894-1904.
- 36 Beg MS, Brenner AJ, Sachdev J, Borad M, Kang YK, Stoudemire J, Smith S, Bader AG, Kim S, Hong DS. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2017; **35**(2):180-188.
- 37 Gao SM, Yang J, Chen C, Zhang S, Xing CY, Li H, Wu J, Jiang L. miR-15a/16-1 enhances retinoic acid-mediated differentiation of leukemic cells and is up-regulated by retinoic acid. *Leuk Lymphoma*. 2011; **52**(12):2365-71.
- 38 Moon HG, Yang J, Zheng Y, Jin Y. miR-15a/16 regulates macrophage phagocytosis after bacterial infection. *J Immunol*. 2014; **193**(9):4558-67.
- 39 Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-

15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(39):13944-9.

40 Wei AH, Strickland SA Jr, Hou JZ, Fiedler W, Lin TL, Walter RB, Enjeti A, Tiong IS, Savona M, Lee S, Chyla B, Popovic R, Salem AH, Agarwal S, Xu T, Fakouhi KM, Humerickhouse R, Hong WJ, Hayslip J, Roboz GJ. Venetoclax Combined With Low-Dose Cytarabine for Previously Untreated Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Phase Ib/II Study. J Clin Oncol. 2019: JCO1801600. [Epub ahead of print]

41 Singh Mali R, Lasater EA, Doyle K, Malla R, Boghaert E, Souers A, Levenson JD, Sampath D. FLT3-ITD Activation Mediates Resistance to the BCL-2 Selective Antagonist, Venetoclax, in FLT3-ITD Mutant AML Models. Blood 2017; 130:1348

Figure legends

Figure 1: STAT5 regulates CDC25A protein and mRNA level in FLT3-ITD AML cells

A. MV411 cells were transfected for 24h with siRNA against STAT5A/B, and the CDC25A protein and mRNA levels were analyzed by western blot (left panel) and RT-qPCR (right panel) respectively.

B. MOLM14 and MV411 cells were treated for 4h with STAT5 inhibitor II (1 μ M), and the CDC25A protein and mRNA levels were analyzed by western blot (left panel) and RT-qPCR (right panel) respectively. These results are representative of at least 3 independent experiments. Actin was used as a loading control in the western blot experiments.

Figure 2: STAT5-dependent transcriptional regulation of CDC25A downstream of FLT3-ITD

A. Experimental design and position of the Q-PCR primer in the CDC25A promoter used for the CHIP experiments performed on MOLM-14 and MV4-11 cells.

B. MOLM14 and MV411 cells were treated for 4 hours with the FLT3 inhibitor AC220 (2nM). ChIP experiments were then performed with RNA Pol II antibody and mouse IgG as a control. The CDC25A TATA Box region was amplified by qPCR as described in A.

C. MOLM14 and MV411 cells were treated for 4h with STAT5 inhibitor (1 μ M). ChIP experiments were then performed with RNA Pol II antibody and mouse IgG as a control. The CDC25A TATA Box region was amplified by qPCR.

D. MOLM14 cells were treated for 4h with AC220 (2nM). ChIP experiments were then performed with STAT5 A/B antibody and rabbit IgG as a control. The CDC25A proximal promoter region was amplified by qPCR.

Figure 3: miR-16 level is dependent on FLT3-ITD activity and STAT5 in AML cells

A. MOLM-14 and MV4-11 cells were treated for 2 hours with the FLT3 inhibitor AC220 (2nM) and the miR-16 level was analyzed by RT-qPCR.

B. Basal miR-16 levels were analyzed by RT-qPCR and normalized to a control (MOLM14).

C. MV4-11 cells were transfected for 24 hours with STAT5A/B siRNA and the miR-16 level was analyzed by RT-qPCR.

D. MOLM-14 and MV4-11 cells were treated for 2h with ERK or Akt inhibitors (50nM and 5 μ M respectively) and the miR-16 level was analyzed by RT-qPCR.

E. MOLM-14 and MV4-11 cells were transfected for 24 hours with a premiR-16 and the CDC25A protein level was analyzed by western blot.

F. MOLM-14 and MV4-11 cells were transfected for 24 hours with a miR-16 inhibitor and treated for 2 hours with AC220 (2nM), the CDC25A and Pim1 protein levels were analyzed by western blot.

G. MV4-11 cells were transfected for 24 hours with a miR-16 inhibitor and STAT5A/B siRNA, and the CDC25A protein level was analyzed by western blot.

These results are representative of at least 3 independent experiments. Actin was used as a loading control in the western blot experiments. ns: non-specific.

Figure 4: The STAT5/miR-16/CDC25A axis is specific to FLT3-ITD positive cells

A. HEL cells were transfected for 24 hours with a miR-16 inhibitor and STAT5A/B siRNA. CDC25A and STAT5 protein levels were analyzed by western blot.

B. HEL cells were transfected for 24 hours with STAT5A/B siRNA and miR-16 level was analyzed by RT-qPCR.

C. OCI-AML3 cells were treated for 2 hours with the FLT3 inhibitor AC220 (2nM) and/or FLT3 ligand (6nM), and the CDC25A protein level was analyzed by western blot.

D. OCI-AML3 cells were treated for 2 hours with the FLT3 inhibitor AC220 (2nM) and/or FLT3 ligand (6nM) and the miR-16 level was analyzed by RT-qPCR.

These results are representative of at least 3 independent experiments. Actin was used as a loading control in the western blot experiments. ns: non-specific

Figure 5: miR-16 inhibits cell proliferation in FLT3-ITD cell lines and primary cells, and triggers monocytic differentiation in FLT3-ITD AML cells

A. MOLM-14 and MV4-11 (FLT3-ITD), OCI-AML3 (FLT3wt) and MOLM-14-TKD (FLT3-ITD inhibition resistant) cell lines were transfected with pre-miRcontrol or pre-miR-16 and live cells were counted at 72 hours after trypan blue staining.

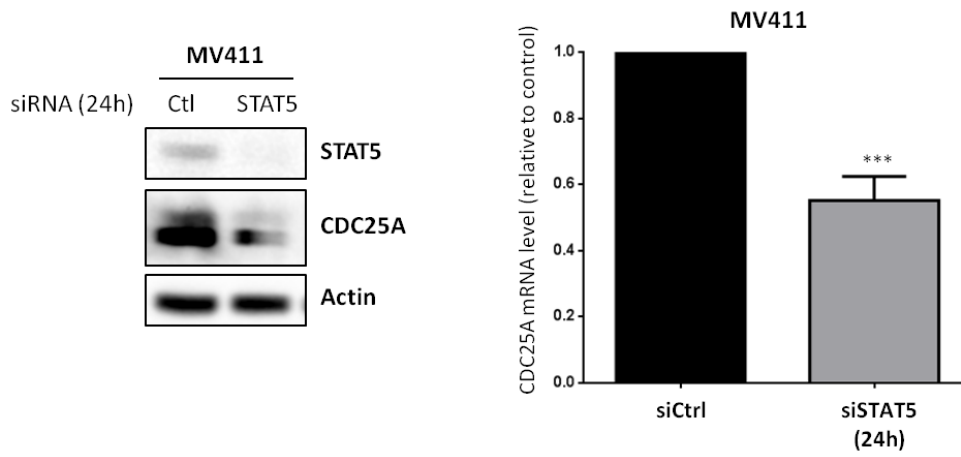
B. MOLM-14 and MV4-11 cells were transfected with pre-miRcontrol or pre-miR-16 as in A, and then treated with AC220 (2 nM) 24 hours after transfection. 72 hours after transfection, cells were counted after trypan blue staining.

C. Primary cells from three AML patients were transduced with a lentiviral vector expressing a scrambled shRNA (Ctrl, black bars) or the miR-16 (miR-16, grey bars), and clonogenic potential was assessed by colony forming assay 7 days after transduction (left panel). Transduction efficiency was assessed by RT-qPCR after 3 days (right panel)

D - F. MOLM-14, OCI-AML3, MOLM14-TKD or MV4-11 cells were transfected with pre-miRcontrol or pre-miR-16 as in A, and then labeled with anti CD11 (D) and CD14 (E) or anti CD15 (F) antibodies in order to monitor their differentiation state. Annexin V labeling was performed in parallel in order to exclude dying cells from the FACS analysis.

Figure 1

A.



B.

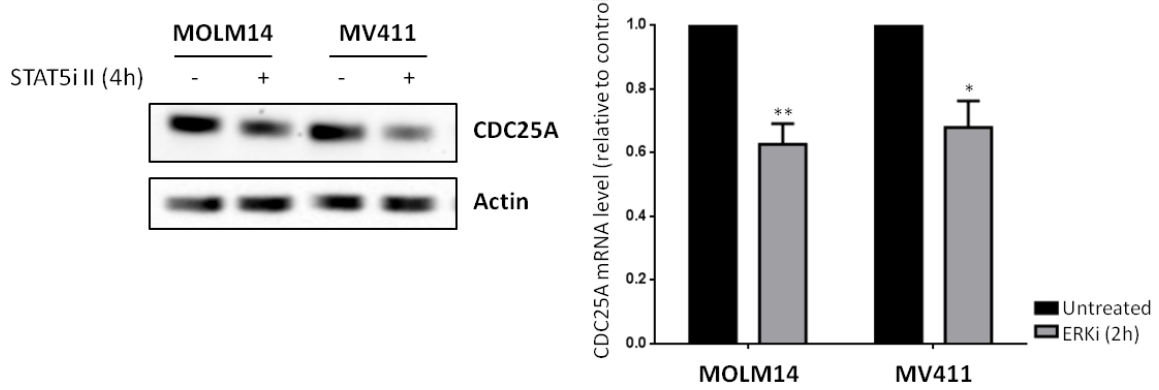


Figure 2

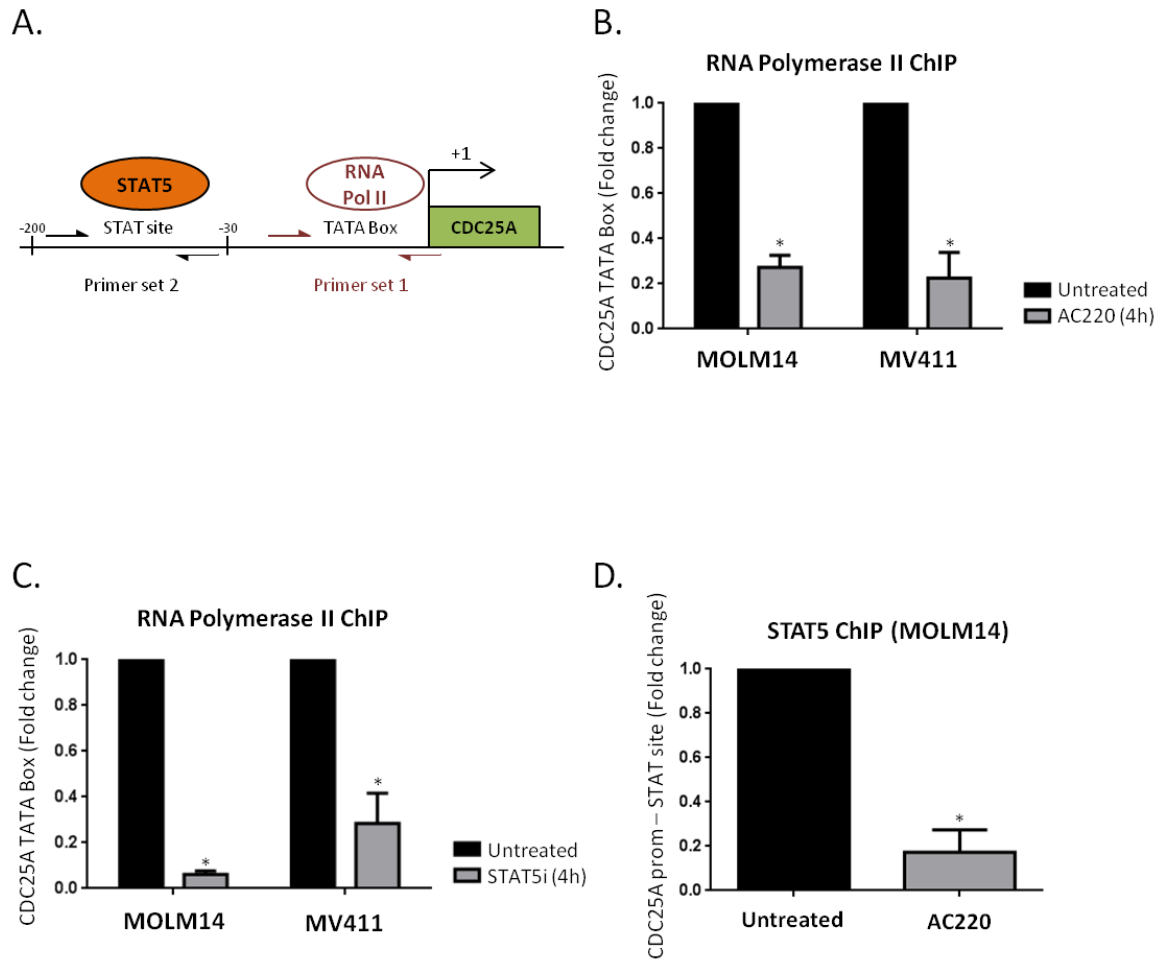


Figure 3

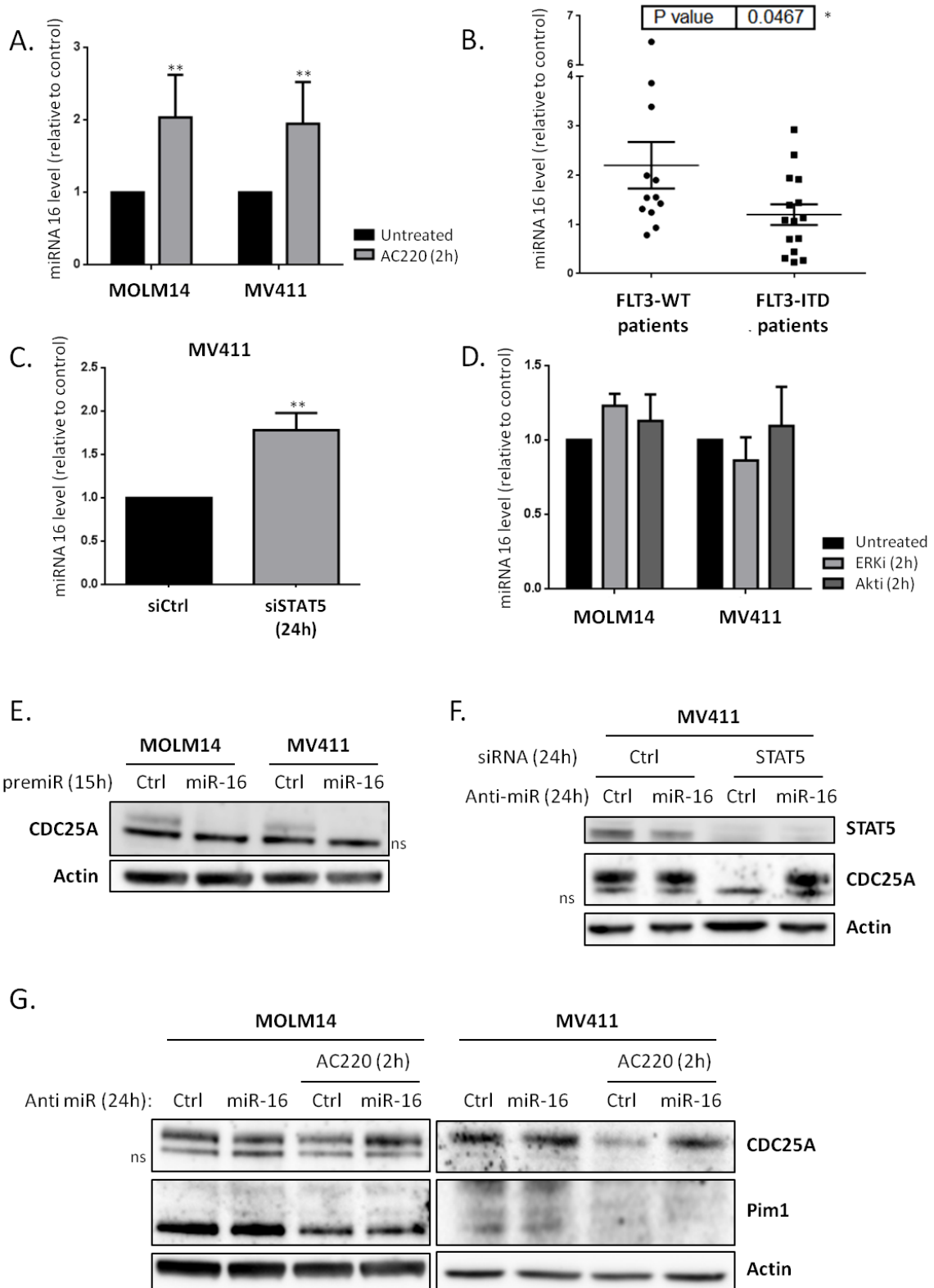


Figure 4

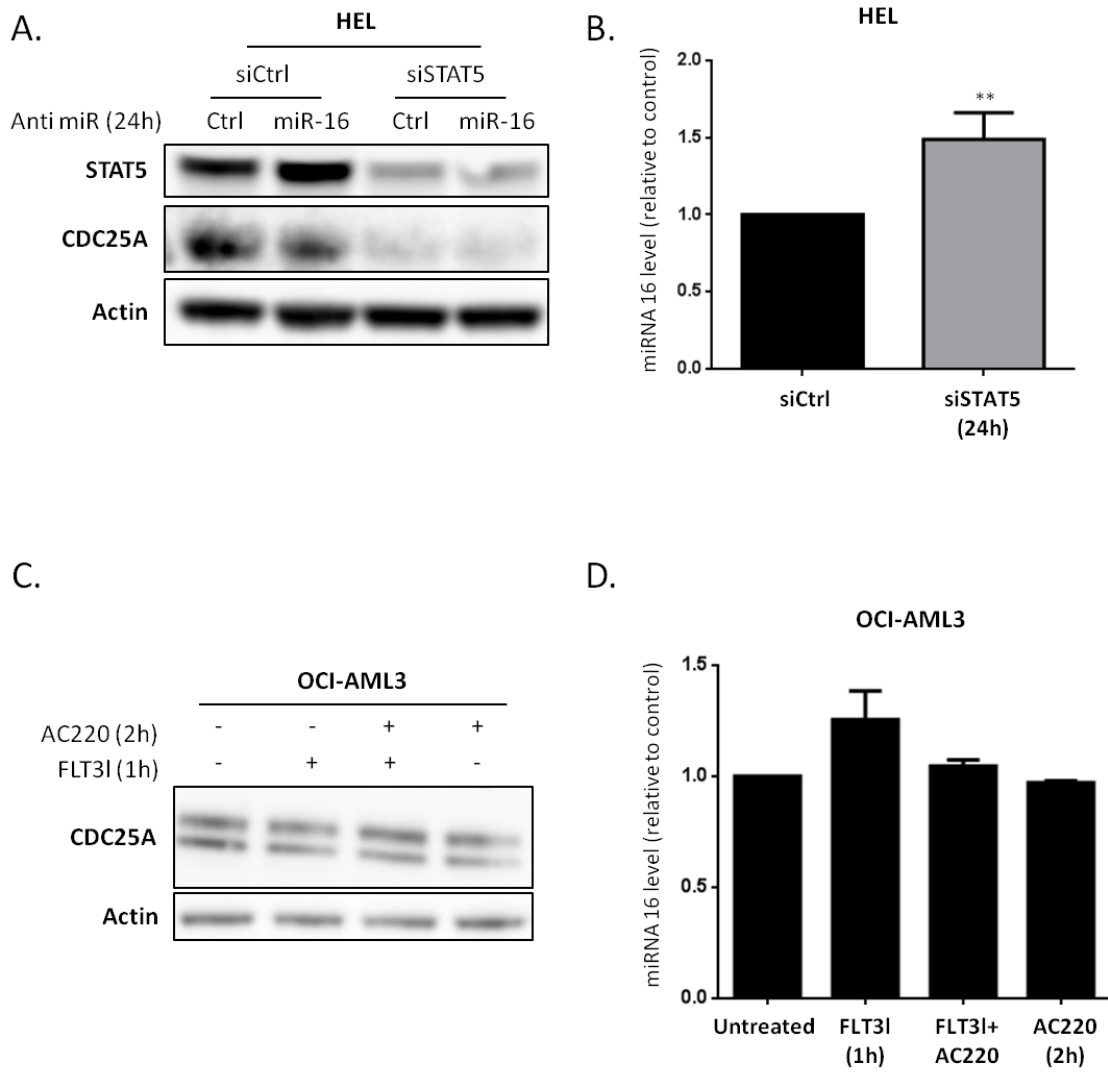
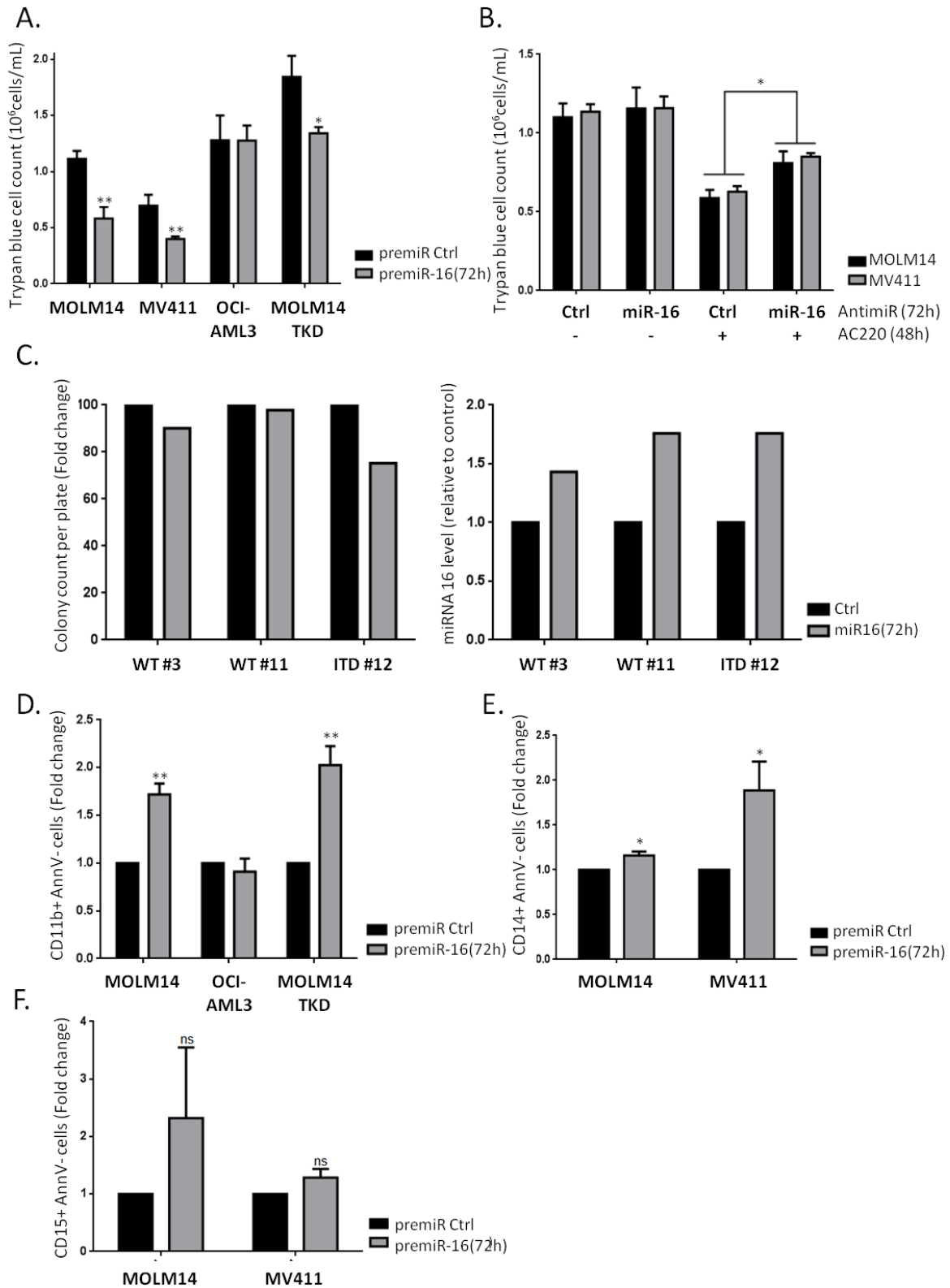


Figure 5



Supplementary methods:

Western Blot

1 x 10⁶ cells were lysed in 60 µl of NuPAGE® LDS Sample Buffer (Novex, Life Technologies), sonicated for 4x7 seconds, and boiled for 3 minutes. Proteins were then resolved on NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gels and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was saturated for 1 hour in Tris Buffer Saline with Tween 0.1% (TBS-T) containing 5% non-fat milk. Membranes were blotted with suitable antibodies overnight at 4°C, washed thrice with TBS-T and incubated for 1 hour with HRP-conjugated secondary antibody (Promega). After four additional washes, detection was achieved with ECL™ or ECL™ prime western blotting detection reagents (GE Healthcare). The antibodies used were: monoclonal anti-CDC25A (F-6) and anti-Pim1 (12H8) from Santa Cruz; monoclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) and polyclonal anti-phospho-STAT5 (Tyr 694), anti-STAT5, anti-p44/42 MAPK, anti-Akt 1/2/3, anti-phospho-Ser473 Akt (D9E) XP, anti-phospho-C/EBPα (Ser21), anti-C/EBPα (p42) from Cell Signaling Technology and anti-β-actin from Sigma.

RT-qPCR

Cells were lysed in TRIzol (Invitrogen) and total RNA was then extracted according to the manufacturer's instructions. For gene expression analysis, cDNA was generated with the SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The PCR was performed with TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) with 10ng of cDNA, The primer used was Hs00947994_m1 (Applied Biosystem) for *CDC25A*. *GUSB* (Hs00939627_m1) and *B2M* (Hs00984230_m1) were used as housekeeping genes. For mature micro-RNA expression analysis, cDNA was generated using the TaqMan® micro-RNA reverse transcription kit (Applied Biosystems), and PCR was performed using the TaqMan® Universal Master Mix with UNG (Applied Biosystems), and the TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The primers used were miR-16 (assay 000391) and U6 snRNA (assay 001973) as a control. Results were analyzed with the StepOne™ software v2.2.2 (Applied Biosystems) using the conventional $\Delta\Delta C_t$ method. PCR was carried out on a StepOne™ (Applied Biosystems).

RNA transfection

Leukemic cell lines were transfected with the Neon transfection system (Life Technologies). Cells (2×10^6) were re-suspended in 100 μ l of resuspension buffer, and various doses of RNA were added. RNA sequences were: specific STAT5A and STAT5B siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool, human STAT5A and STAT5B, Dharmacon) or siRNA control (sigenome control pool non targeting #2, or ON-TARGETplus control pool, Dharmacon), anti-miR control or anti-miR-16 (Life Technologies), and pre-microRNA negative control or pre-microRNA-16 (Life Technologies). Cells were then transfected with the nucleofector device (program 5 for MOLM14, MV4-11 and OCI-AML3 cell lines, custom program for the HEL cell line), and subsequently re-suspended in normal culture medium at a concentration of 1×10^6 cells/ml.

Patient samples

Patient AML samples used in this work were obtained after informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and were stored in the HIMIP collection. In compliance with French law, the HIMIP collection was declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1) and a transfer agreement was obtained (AC 2008-129) after approval by the ethics committees (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II and the APHP ethics committee). Clinical biological annotations of the samples were declared to the CNIL (French Data Protection Authority). All were diagnosed at the Department of Hematology of Toulouse University Hospital. The patients' characteristics are listed in Supplementary Table 2.

Supplementary tables:

	Forward	Reverse
CDC25A TATA Box	CCGCTATTACCGCGAAAGG	AGCTCCGGGTAGCAGAAA
STAT site in the CDC25A promoter	CTTCTGAGAGCCGATGAC	CAAACGGAATCCACCAATC

Supplementary Table 1: Primers used in ChIP experiments (Fig 2.A)

Sample	FLT3 status	Karyotype abnormalities
WT #1	WT	NA
WT #2	WT	NA
WT #3	WT	NA
WT #4	WT	None

WT #5	WT	None
WT #6	WT	None
WT #7	WT	None
WT #8	WT	NA
WT #9	WT	None
WT #10	WT	None
WT #11	WT	None
WT #12	WT	None
ITD #1	ITD 62%	46,XY,add(14)(q3?1)[6]/46,XY[14]
ITD #2	ITD 64.7%	47,XX,+8[22]
ITD #3	ITD 30%	NA
ITD #4	ITD 101%	None
ITD #5	ITD 70%	NA
ITD #6	ITD 6%	NA
ITD #7	ITD 59%	NA
ITD #8	ITD 51%	NA
ITD #9	ITD 45%	46,XY,del(20)(q11)<22>
ITD #10	ITD 20%	None
ITD #11	ITD 55%	None
ITD #12	ITD 20%	None
ITD #13	ITD 81%	None
ITD #14	ITD 105%	None
ITD #15	ITD 80%	None
ITD #16	ITD 68%	None

Supplementary Table 2: Summary of the known characteristics for AML patient samples used in Fig. 3B and 5C.

NA: Not Available, WT: Wild-Type

Supplementary figures legends

Supplementary figure 1: FLT3 inhibition does not modulate miR-15-a or b level

MOLM14 and MV411 cells were treated for 2h with AC220 (2nM) and miR-15-a (upper panel) and miR-15-b (lower panel) levels were analyzed by RT-qPCR.

Supplementary figure 2: miR-16 tenuously regulates CDC25A mRNA level

A. MOLM14 (black bars) and MV411 (grey bars) cells were transfected for 24 hours with a miR-16 inhibitor and treated for 2h with AC220 (2nM). The CDC25A mRNA level was analyzed by RT-qPCR

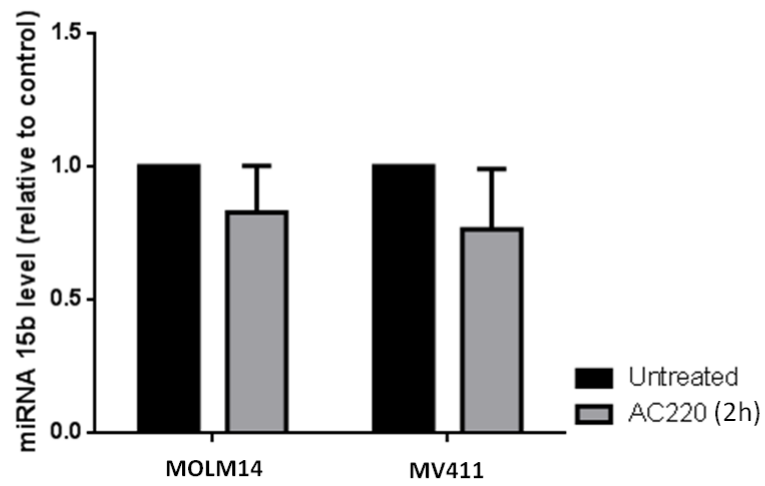
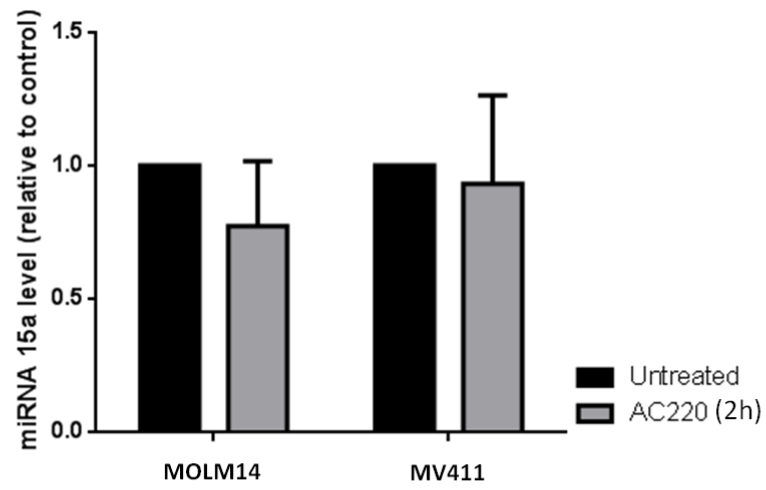
B. MV411 cells were transfected for 24 hours with a miR-16 inhibitor and a STAT5A/B siRNA. The CDC25A mRNA level was analyzed by RT-qPCR

C. MOLM14 and MV411 cells were treated for 1 hour with AC220 (2 nM) and further treated with D actinomycin (3µg/ml) for the indicated times. The CDC25A mRNA level was analyzed by RT-qPCR.

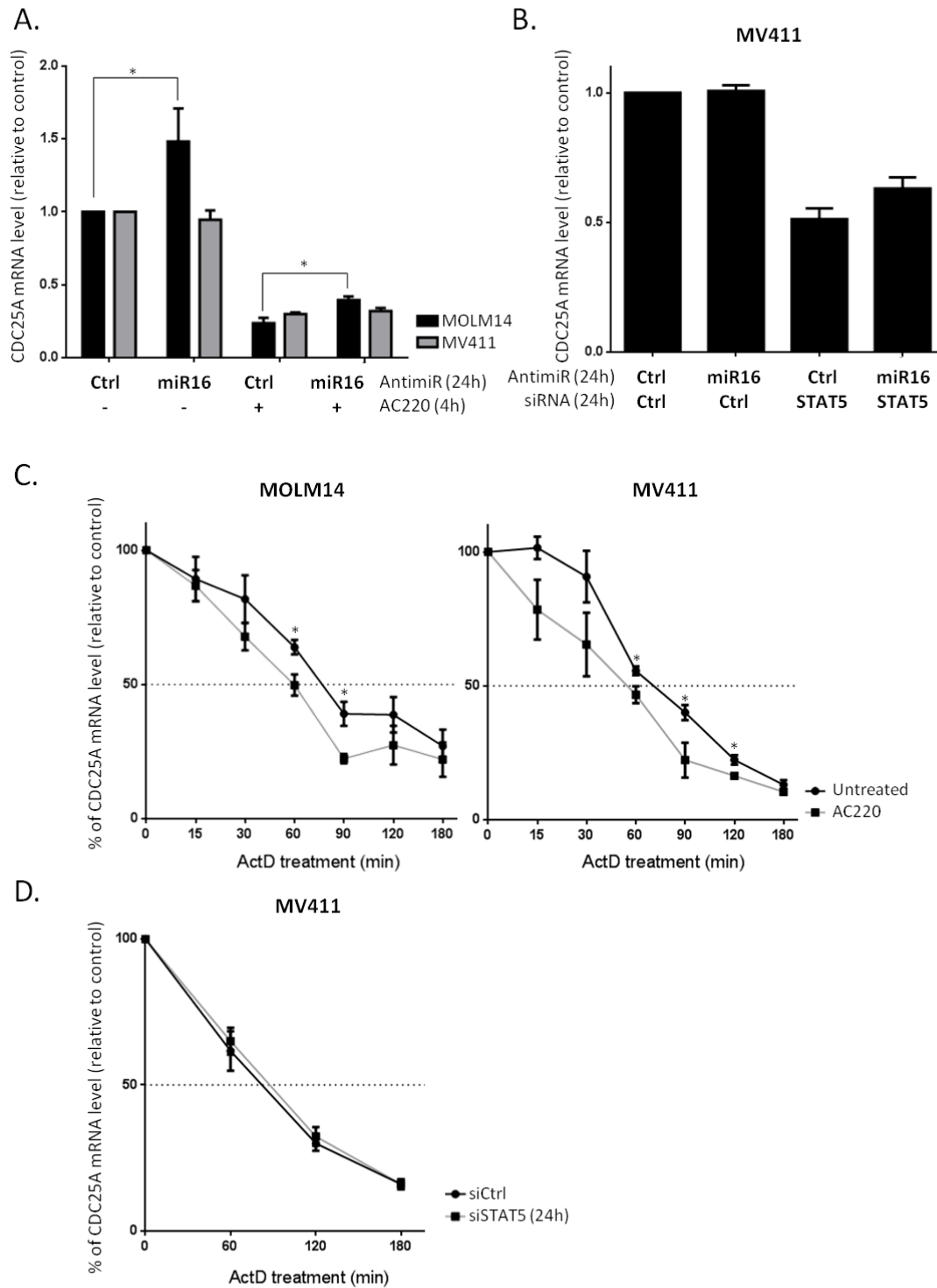
D. MV411 cells were transfected for 24 hours with STAT5A/B siRNA and treated with D actinomycin (3µg/ml) for the indicated times. The CDC25A mRNA level was analyzed by RT-qPCR.

These results are representative of at least 3 independent experiments.

Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Résumé de la thèse en français :

Les patients présentant une Duplication Interne en Tandem dans le récepteur FLT3 (FLT3-ITD) représentent 25% des cas de Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM), et ont un mauvais pronostic de survie par rapport aux patients exprimant le récepteur sauvage. Notre équipe a précédemment identifié la phosphatase CDC25A comme une cible précoce du récepteur muté et un acteur essentiel de la biologie de ces LAM. Les inhibiteurs pharmacologiques de CDC25A disponibles n'étant pas utilisables en clinique, nous avons donc décidé d'étudier plus en détail la voie de signalisation FLT3-ITD/CDC25A afin de trouver une autre approche pour la cibler.

Dans ce travail, nous montrons tout d'abord que dans les cellules de LAM FLT3-ITD, STAT5 constitue un régulateur transcriptionnel direct de CDC25A. Nous avons ensuite identifié le micro-ARN-16 (miR-16) comme un régulateur négatif de CDC25A dont l'expression est réprimée par STAT5 en aval de FLT3-ITD. Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle fonctionnel du miR-16, et avons montré que les cellules leucémiques FLT3-ITD sont très dépendantes de la répression de l'expression du miR-16 pour leur prolifération et le blocage de leur différenciation, deux caractéristiques essentielles des LAM

Nous avons également montré une sensibilité très marquée des lignées leucémiques et des cellules primaires FLT3-ITD par rapport aux cellules FLT3-WT à l'inhibition de Bcl2, une cible du miR-16.

Mots clés : Leucémie, micro-ARN, différenciation, prolifération, CDC25A

Résumé de la thèse en anglais :

Patients presenting an Internal Tandem Duplication in the FLT3 receptor (FLT3-ITD) represent up to 25% of Acute Myeloid Leukemia (AML) cases, and suffer from an overall poorer outcome than their peers expressing the wild type receptor. Our team has demonstrated that expression of the cell cycle regulator CDC25A is tightly controlled by FLT3-ITD in this model, and that CDC25A is a key player in the biology of these AML. However, targeting CDC25A has proven complicated and currently available pharmacological inhibitors show high toxicity. Therefore we are studying the regulation mechanisms of CDC25A downstream of FLT3-ITD, to hopefully identify another strategy to target this pathway.

In this work we first show that in FLT3-ITD AML, STAT5 is a direct transcriptional regulator of CDC25A. Furthermore, we identify the micro-RNA-16 (miR-16) as a negative regulator of CDC25A whose expression is repressed by STAT5 downstream of FLT3-ITD. Interestingly, FLT3-ITD leukemic cells are very dependent on the repression of miR-16 expression for their proliferation and differentiation block, two hallmarks of AML.

We also highlight a very high sensitivity to the inhibition of Bcl2, another known miR-16 target, in FLT3-ITD cell lines and AML primary samples, compared to the FLT3-WT ones.

Key words : Leukemia, micro-RNA, differentiation, proliferation, CDC25A