



**HAL**  
open science

# Inhibition de facteurs de transcription oncogènes : vers une nouvelle approche thérapeutique

Raja Nhili

► **To cite this version:**

Raja Nhili. Inhibition de facteurs de transcription oncogènes : vers une nouvelle approche thérapeutique. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S049 . tel-04648660

**HAL Id: tel-04648660**

**<https://theses.hal.science/tel-04648660>**

Submitted on 15 Jul 2024

**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 de Lille Nord de France**  
**Ecole Doctorale Biologie-Santé**

**THESE**

Présentée pour l'obtention du grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE-NORD DE FRANCE**

*Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire*

Par

Raja NHILI

**Inhibition de Facteurs de Transcription Oncogènes**  
**Vers une Nouvelle Approche Thérapeutique**

Soutenue le 26 Mars 2013 devant le jury :

Rapporteurs : Dr. Liliane MASSADE  
Dr. François MORLE

Examineurs : Dr. Paola B. ARIMONDO  
Pr. Pierre FORMSTECHE

Directeur de thèse : Dr. Marie-Hélène DAVID-CORDONNIER

***CONFIDENTIEL***

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements aux docteurs Liliane MASSADE et François MORLE d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.*

*Je remercie également le docteur Paola B. ARIMONDO et le Professeur Pierre FORMSTECHEER, de me faire l'honneur de siéger dans ce jury.*

*J'exprime également tout ma reconnaissance envers ma tutrice de thèse le docteur Marie-Hélène DAVID-CORDONNIER.*

*A mes grands-parents,*

*A mes parents,*

*A mes frères et sœurs.*

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme. Avant tout propos, je m'excuse si j'oublie quelqu'un.

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert - UMR-837-Equipe 4 dont les thèmes de recherches s'orientent autour du ciblage moléculaire et cellulaire pour le traitement du cancer dirigé par le Pr. Pierre Formstecher. Je tiens à vous remercier pour m'avoir permise d'intégrer cette structure multidisciplinaire essentielle à l'aboutissement de ce projet. Je remercie, par ailleurs, l'IMPRT IFR 114 pour la mise à disposition de nombreux équipements de haute qualité nécessaires à la réalisation des ces travaux.

De simples remerciements sur papier ne pourront décrire à quel point je suis reconnaissante envers ma tutrice de thèse le Dr. Marie-Hélène David-Cordonnier. Tes conseils, tes idées et ta rigueur scientifique m'ont aidé à réaliser ces travaux et m'ont permis d'évoluer scientifiquement et humainement. Merci tout particulièrement pour cette formation, pour la confiance accordée tout au long de ces années et les nombreuses corrections et suggestions apportées dans l'élaboration de mon manuscrit de thèse. Et malgré mon peu d'enthousiasme à mes débuts pour l'apparat des congrès, je te suis grandement reconnaissante d'avoir eut l'opportunité d'y participer. Merci également aux nombreuses collaborations auxquelles j'ai pu prendre part notamment avec les Pr. David Wilson et Pr. David Boykin pour l'étude des composés DB et le Pr. Grace Karminski-Zamola ainsi que les membres de son équipe m'ayant initié à la méthode QSAR dont leur accueil fut si chaleureux.

J'exprime toute ma gratitude envers le conseil régional du Nord-Pas-de-Calais et le CHRU de Lille pour le financement octroyé pour ces trois ans de doctorat. Je remercie aussi les membres du conseil de l'IRCL et particulièrement la directrice, le Dr. Maud Collyn, pour l'allocation de fin de thèse attribuée pour ces 6 mois supplémentaires. Merci également à Micheline Magdelon pour son dévouement envers l'Institut dont l'aide administrative fut précieuse.

Il m'est impossible d'oublier Sabine Depauw qui a sans cesse fait tout son possible pour m'aider. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton organisation sans faille et pour avoir répondu à toutes mes questions. En bref tu es la « MacGyver » du labo, un soucis, un appareil non fonctionnel, une idée: tout problème a une solution et aussi impressionnant que cela soit tu ne disposais d'aucun couteau suisse mais seulement d'une force légendaire.

Merci aussi à Xavier Dezitter pour ton extrême gentillesse, toujours prêt à aider quelque soit la situation.

Merci également aux « anciens »: Paul Peixoto pour mes premiers pas dans le labo, tu m'as énormément appris et transmis ta passion pour la recherche et le faillitage. Merci pour tous tes nombreux conseils. Merci aussi à Gaëlle Lenglet pour ta bonne humeur, ton aide et tes encouragements constants depuis mes débuts. Magali Rebutti je te remercie pour ta gentillesse et ton accueil, ta classe légendaire m'a montré qu'il est possible de ressembler à une princesse tout en portant une blouse blanche. Je n'oublie pas Marie-Paule Hildebrand, partager mon bureau avec le votre fut très enrichissant autant pour ma formation scientifique qu'humainement. Merci pour votre gentillesse, votre aide, votre bonne humeur inconditionnelle et vos délicieuses pâtisseries. Merci aussi à Denise Mendy pour votre accueil et votre gentillesse. J'ai put enfin côtoyer la légende écossaise, William Laine, dont sa bonne humeur et sa gentillesse sont bel et bien conformes aux récits.

Je tiens à remercier Samuel Meignan, Brigitte Baldeyrou, Christine Bal, Nicole Wattez et Nicolas Simon pour votre bonne humeur constante et les nombreux cafés pris ensemble.

Je tiens aussi à associer à ces travaux l'ensemble des stagiaires qui ont contribué de près ou de loin autant par leurs bonnes humeurs que leurs apports techniques: Aline Chagnon, Charles Paul-Constant, Lina Lutchmee, Marine Bellart, Benjamin Billore, Thomas Cuiengnet, Mansour Latreche, Lucie Louis-Thérèse,...

Merci aux stagiaires de courtes durées, plus qu'une formation à la recherche, ce fut un échange dans les deux sens, j'ai appris énormément de votre part.

Merci également à l'ensemble des membres de l'IRCL, vos sourires, votre accueil m'ont fait me sentir chez moi durant toutes ces années et dont de nombreux souvenirs sont à jamais gardés en mémoire.

Sans l'aide et le soutien de mes proches, la réalisation de cette thèse n'aurait sans doute pas été possible.

Merci pour ton écoute inconditionnelle Amel, quelque soit l'heure et le moment tu as toujours été disponible et attentive.

Je ne pourrais achever ces remerciements sans associer ces travaux à mes grands parents, en particulier ma grand-mère Fatima qui m'apporte tant.

Merci à mes parents qui m'ont aidé à avancer sans pour autant oublier mes racines. L'arbre puise dans ses racines pour fleurir. Merci pour vos sacrifices et votre disponibilité inconditionnelle quoique je fasse ou quoique je dise.

Je tiens aussi à remercier Khalid, Zineb, Adil, Amina, Salah et ma très chère Ilham pour votre soutien, vos rires et votre bonne humeur. Merci à toi Khalid de m'avoir encouragé à continuer même si le chemin semblait périlleux et long. Les réponses à tes questions sont enfin dans ce manuscrit donc libre à toi d'en faire ton livre de chevet ou de l'inclure dans ta « pseudo » bibliothèque.

Zineb, merci pour ta patience et ton dévouement à chaque instant devenant au fil du temps la grande sœur que j'aurais souhaité avoir.

Merci également à toi Adil, qui ne m'a jamais rien refusé et dont ta générosité n'a pas d'égale.

Quant à Amina et Salah merci pour votre discrétion et votre gentillesse à tout instant.

Ma grande Ilham je te remercie pour tes mots d'encouragements et nos nombreux fourires bien que ton humour fût parfois si difficile à comprendre...

Enfin comment pourrais-je ne pas inclure ma petite Amalou dans mes remerciements, malgré ton âge ta maturité me surprend tous les jours et j'aimerais te remercier pour ta gentillesse et ton soutien me faisant remarquer que tu as grandi trop vite.

***Milles Merci!***



*“Scientific success requires the four big Gs:  
Geduld, Geschick, Glück und Geld”  
(Patience, Ability, Luck and Money)  
will remain essential for the future development of  
more efficacious magic bullets against cancer.”  
Ehrlich’s maxim*

## LISTE DES ABBREVIATIONS

5-FU	5-Fluorouracil
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF9	ALL fused gene from chromosome 9
AML-1	Acute myeloid leukemia-1
ANWL	Alanine-Asparagine-Tryptophane-Leucine
Ara-C	Aracytine
ARN	Acide ribonucléique
ASB2	Ankirin repeat and SOCS box containing 2
ATP	Adénosine triphosphate
ATRA	Acide tout-trans rétinolique
BCL6	B-Cell lymphoma-6
BCR/ABL	Breakpoint Cluster Region/Abelson
BET	Bromure d'Ethidium
BFU-E	Burst forming unit erythrocytaire
BRCA1	Breast cancer 1
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CALM-AF10	Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukemia-ALL
CBP	CREB Binding Protein
CDX	Caudal-type homeobox transcription factor
CFU-G	Colony forming unit granulocytaire
CFU-GM	Colony forming unit granulo-monocytaire
CFU-M	Colony forming unit monocytaire
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CMV	Cytomegalovirus
c-Myc	cellular Myelocytomatosis
CREB	cAMP-Regulated Enhancer Binding
CSH	Cellules souches hématopoiétiques
CUL-4A	Cullin-4A
CYBB	cytochrome b245 beta polypeptide
DiOC6	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DO	Densité Optique
DUSP4	Dual specific phosphate 4
EBS	ETS binding site
EDTA	Ethylene diamine tetracetic acid
ERG	Ets related gene
ETO	eight twenty one
ETS	E Twenty-six
EWRS1	Ewing sarcoma breakpoint region 1
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FEV	Fifth Ewing sarcoma variant
FLI-1	Friend leukemia integration 1
Flt3	fms-like tyrosine receptor-3
GCN4	General control nondepressible 4
GEMM	Colony forming unit erythrocytaire mégakaryocytaire monocytaire
HAPT1	High affinity pentamidine transporter 1
HAT	Histone-acétyl-transférases
HDAC	Histones desacétylases
HDAC6	Histone déacétylase 6

hHK	human Hair Keratin
HIV-1	Human Immunodeficiency virus 1
HLH	Helix-Loop-Helix
HMG	High Mobility Group
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HMT	Histones méthyltransférases
HOTTIP	HOXA transcript at the distal tip
HOX	Homeobox
HRP	Horseradish
HSP70	Heat Shock protein 70
HTH	Hélice-Tour-Hélice
IDH1	Isocitrate deshydrogenase 1
IDH2	Isocitrate deshydrogenase 2
IL3	Interleukine 3
IP	Iodure de Propidium
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAL	Leucémies Aiguës Lymphoïdes
LAL-B	Leucémies Aiguës Lymphoïdes-B
LAL-T	Leucémies Aiguës Lymphoïdes-T
LAM	Leucémies Aiguës Myéloïdes
LAM-CN	Leucémies Aiguës Myéloïdes à Caryotype Normal
LAMK	Leucémies Aiguës Mégakaryocytaires
LAPT1	Low affinity pentamidine transporter
LB	Luria Bertoni
LDGCB	Lymphome diffus à grandes cellules B
LEF-1	Lymphoid Enhancer Binding Factor
LMC	Leucémies Myéloïdes Chroniques
MBq	Méga Becquerel
MDM2	murine double minute 2
MEIS-1	Myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog
Min	Minute
MKP2	Mitogen activated protein kinase phosphatase 2
mL	Millilitre
MLL	Mixed-Lineage Leukemia
MLL-PTD	MLL-partial tandem duplication
mM	Millimolaire
MM	Myélomes multiples
MMP1	Matrix MetalloProtéase-1
NER	Nucleotide Excision Repair
NF-Y	Nuclear Factor-Y
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
ng	Nanogramme
NK	Natural Killer
nM	Nanomolaire
NMP1	Nucleophosmine
NP 40	Nonidet P-40
NUP98	Nucléoporine 98
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBX	Pre-B cell leukemia homeobox
PcG	Polycomb group
PEA3	Polyoma Enhancer Activator 3

PEG	Polyéthylène Glycol
PFA	Paraformaldéhyde
PKC	Proteine Kinase C
PNT	Pointed
PTEN	Phosphatases and TENing homolog
Q-RT-PCR	PCR quantitative en temps réel
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
RAR	Retinoic Acid Receptor
RMN	Raisonance Magnétique Nucléaire
RPS	Raisonance Plasmonique de Surface
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SMD	Syndrômes Myélodysplasiques
SV40	Simian Vacuolating virus 40
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAFs	TBP-Associated Factors
TALE	Three Amino acid Loop Extension
TBE	Tris/Borate/EDTA
TBP	TATA Box Protein
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline Tween 20
TCR	T cell receptor
TE	Tris EDTA
TEL	Translocation Ets leukemia
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TMB	3,3',5,5' –TetraMethylBenzidène
TPO	Thrombopoïétine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminométhane
v-ets	E-twenty-six specific
virus E26	Avian Erythroblastosis Virus
wHTH	winged hélice-tour-hélice
$\mu\text{g/L}$	Microgramme par litre
$\mu\text{M}$	Micromolaire

Si les chimiothérapies conventionnelles restent largement utilisées dans le traitement des cancers, l'avènement des thérapies ciblées, dont des petites molécules (gleevec) et des anticorps monoclonaux illustrent l'efficacité, représente l'espoir d'une plus faible toxicité et d'un taux de guérison supérieur.

L'identification de nouvelles approches thérapeutiques (cibles et médicaments potentiels) est de longue date au cœur du travail de notre groupe au sein de l'UMR837-Equipe 4. C'est ainsi que certains facteurs de transcription oncogènes, impliqués ou à l'origine de la cancérogenèse, sont ciblés pour leur interaction à l'ADN visant à moduler l'expression de gènes cibles, relais du processus cancérogène. Les outils moléculaires dédiés à cette approche correspondent à de petites molécules hétérocycliques diamidines (les composés DB) ayant la capacité d'interagir avec le petit sillon de l'ADN et cela de manière séquence-spécifique. Développés dans le cadre d'une étroite collaboration avec les Pr. D.W. Boykin et Pr. W.D. Wilson, chimistes de l'université d'Atlanta, ces composés interagissent au niveau du petit sillon de l'ADN sous forme de monomères ou dimères et ciblent, pour la majorité, des séquences riches en paires de bases AT (comme leur chef de file : le composé dyphényl-furane DB75), et pour d'autres des séquences plus spécifiques à l'instar du phényl-furane-benzimidazole (DB293) reconnaissant la séquence 5'-ATGA-3'.

Mes travaux de thèse portent sur deux modèles pathologiques associés à deux facteurs de transcription de familles différentes et dont l'inhibition de leur interaction à l'ADN représente une approche thérapeutique envisageable: HOXA9 (facteur de transcription de la famille des gènes à homéodomaine) et ERG (de la famille des gènes *ETS*). Le premier facteur (HOXA9) est impliqué dans le développement embryonnaire mais est ré-exprimé dans divers types de leucémies dont les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Cette dérégulation est soit liée à une surexpression d'HOXA9, soit à une translocation aboutissant à la protéine chimère NUP98-HOXA9. Le second facteur (ERG) est à la fois surexprimé dans certaines leucémies et cancer de la prostate et à l'identique, cette dérégulation peut impliquer le facteur seul ou sous forme de translocations impliquant ERG (TMPRSS2-ERG dans les carcinomes prostatiques, EWS-ERG dans des sarcomes d'Ewing ou TLS/FUS-ERG dans certaines leucémies).

Sur la base d'une sélection de composés DB pour leur capacité d'inhibition *in vitro* des complexes ERG/ADN ou HOXA9/ADN nous nous sommes alors intéressés à la validation cellulaire de cette inhibition. Plusieurs objectifs ont été abordés : 1- Etude de la spécificité de séquence pour l'inhibition du complexe ERG/ADN *in vitro* ; 2- Détermination d'une toxicité sélective des composés actifs fonction du statut d'expression de l'oncogène sur un panel de lignées cancéreuses leucémies ou prostatiques selon le modèle d'étude ; 3- Evaluation d'une modulation de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs en présence des composés sélectionnés ; et en plus pour le modèle HOXA9 : 4- Confirmation d'une sélectivité d'inhibition sur des échantillons de patients et 5- Validation *in vivo* sur modèles animaux.

Les études menées *in vitro* sur le facteur ERG ont mis en évidence l'interaction spécifique des composés de type di-thiophènes sélectionnés sur la séquence adjacente en 3' (soulignée) du site EBS (Ets-binding-site en majuscule: 5'-agCAGGAAGTtcg-3'). Cette interaction est suffisante à l'inhibition de la formation du complexe arguant sur le concept d'inhibition sans nécessité stricte de reconnaissance par le composé de l'entière séquence. Au contraire, pour l'inhibition d'HOXA9, les dérivés DB sélectionnés couvrent entièrement le site consensus d'interaction à l'ADN d'HOXA9.

*In cellulo*, ce concept a été validé sur un modèle de régulation transcriptionnelle où l'expression d'un gène rapporteur est sous le contrôle de la séquence consensus respective de chaque facteur. En présence des composés actifs respectifs, l'activité transcriptionnelle initiale est spécifiquement inhibée fonction à la fois de la séquence consensus et de l'activité du composé. A ces travaux s'ajoute pour le modèle d'inhibition du facteur HOXA9, la mise en évidence d'une efficacité des composés DB actifs en lien avec le niveau d'expression d'HOXA9 à la fois sur des lignées leucémiques et sur des blastes de patients atteints de LAM.

Ces données témoignent ainsi de l'efficacité et de la possibilité d'inhiber des facteurs de transcription oncogènes en ciblant leur interaction à l'ADN, en particulier pour le facteur HoxA9 dont l'impact leucémogène est clairement lié à son domaine de liaison à l'ADN.

# **TABLE DES MATIERES**

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>A. HOXA9: De l'architecte du développement embryonnaire à l'oncogène leucémique</b>	<b>20</b>
1. Du gène au facteur de transcription fonctionnel	20
2. HOXA9 : Facteur de transcription fonctionnel et spécificité de reconnaissance de l'ADN	29
3. Fonctions physiologiques des facteurs HOX	33
4. HOXA9 et la cancérogenèse	36
5. Leucémies : gènes cibles et domaine d'interaction à l'ADN	47
6. HOX et autres pathologies	49
7. Traitements actuels et usuels des Leucémies	50
8. Ciblage moléculaire des facteurs HOX	51
<b>B. ERG : De l'implication embryonnaire à l'oncogène prostatique et leucémique</b>	<b>52</b>
1. Du gène au facteur de transcription fonctionnel	52
2. Fonctions physiologiques du facteur ERG	62
3. ERG et la cancérogenèse	65
4. ERG et Leucémies	69
5. Autres facteurs ETS en cancérologie	72
6. Cancer de la prostate et sarcome d'Ewing: traitements actuels.	72
7. Ciblage moléculaire des facteurs ETS	73
<b>C. Des Chimiothérapies Cancéreuses aux Thérapies Ciblées : Une Révolution Thérapeutique</b>	<b>75</b>
1. Chimiothérapies Cancéreuses : quelques exemples	75
2. Les inhibiteurs de topoisomérase :	82
3. Etoposide et Leucémies : modèle de cancer chimio-induit	87
<b>D. Spécificité Accrue et Faible Toxicité : Thérapies Ciblées</b>	<b>88</b>
1. Imatinib (Gleevec) et Leucémie myéloïde chronique (LMC): Inhibiteur de tyrosine kinase	89
2. Acide tout-trans rétinolique: Exemple d'une thérapie différenciatrice modulant l'expression de gènes cibles	89
3. Nutlins : de petites molécules ciblant le complexe MDM2/p53	91
4. Polyamines : le design « à façon » de ligands de la double hélice d'ADN	91
<b>E. Les composés DB : Modulateurs Transcriptionnels ?</b>	<b>93</b>
1. Traitement des maladies parasitaires et développement des diamidines	93
2. Mode d'action : ligands de l'ADN	95
3. Relations structure-activité	101
4. Seconde génération de composés diamidines	108
5. Mode d'action moléculaire	111
6. Développement clinique en tant que molécules antiparasitaires :	116
<b>F. Modulation de l'expression des gènes :</b>	<b>118</b>
1. Polyamines et modulation transcriptionnelle	118
2. Inhibition <i>in vitro</i> de deux facteurs de transcription oncogènes par le DB293	120
<b>II. OBJECTIFS</b>	<b>122</b>
<b>III. RESULTATS &amp; DISCUSSION</b>	<b>125</b>
<b>1ÈRE PARTIE :</b>	<b>126</b>
<b>Recherche de nouveaux ligands séquence-spécifiques de l'ADN</b>	<b>126</b>
<b>A. Nouveaux composés DB ciblant spécifiquement les séquences 5'-TTAA : l'exemple du DB1003.</b>	<b>127</b>
<b>B. DB921: modèle d'interaction médiée par une molécule d'eau</b>	<b>130</b>
<b>C. Nouveaux ligands de l'ADN et analyse quantitative des relations structure/activité</b>	<b>132</b>
<b>D. Conclusions / Perspectives</b>	<b>135</b>

<b>2<sup>EME</sup> PARTIE :</b>	<b>137</b>
<b>Modulation de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription ERG</b>	<b>137</b>
<b>A. Localisation sub-cellulaire du DB1998</b>	<b>140</b>
<b>B. Inhibition de l'activité transcriptionnelle de ERG par le DB1998</b>	<b>141</b>
<b>C. Cytotoxicités des dérivés dithiophènes</b>	<b>143</b>
<b>D. Conclusions / Perspectives</b>	<b>145</b>
<b>3<sup>EME</sup> PARTIE :</b>	<b>148</b>
<b>Modulation de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription HOXA9</b>	<b>148</b>
<b>A. Données antérieurs laboratoire</b>	<b>149</b>
<b>B. Evaluation de l'inhibition des différentes protéines HOX par les composés DB sélectionnés</b>	<b>150</b>
<b>C. Spécificité d'inhibition des composés DB sur des séquences issues de promoteurs régulés <i>in vivo</i> par HOXA9</b>	<b>157</b>
<b>D. Modulation du complexe HOXA9/ADN <i>in cellulo</i></b>	<b>166</b>
1. Localisation cellulaire des composés DB sélectionnés	166
2. Modulation <i>in cellulo</i> de l'activité transcriptionnelle des composés DB sélectionnés	167
3. Evaluation de la cytotoxicité cellulaires des composés DB sélectionnés	172
4. Potentiel anti-prolifératif des composés DB sélectionnés	173
5. Conclusions/Perspectives	177
<b>IV. Matériel &amp; méthodes</b>	<b>182</b>
<b>A. Composés Etudiés</b>	<b>183</b>
<b>B. Oligonucléotides</b>	<b>183</b>
<b>C. Vecteurs Plasmidiques</b>	<b>183</b>
<b>D. Biologie Moléculaire</b>	<b>185</b>
1. Clonage	185
2. Transformation bactérienne	185
3. Amplification/Extraction des plasmides amplifiés	186
4. Quantification de l'ADN	186
<b>E. Modulation de l'interaction protéines/ADN</b>	<b>186</b>
1. Marquages de l'ADN par des radioéléments	186
2. Expression des protéines en lysat de réticulocytes	187
3. Expression des protéines marquées au <sup>35</sup> S	187
4. Retard en gel (ou EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay)	188
<b>F. Etude de l'effet cellulaire des composés</b>	<b>188</b>
1. Culture cellulaire	188
2. Extractions des protéines totales	190
3. Dosage protéiques	190
4. Distribution cellulaire des composés par microscopie de fluorescence	190
5. Expression protéique: Western Blotting	190
6. Mesure des effets cytotoxiques des composés	191
7. Test de Clonogénicité	192
8. Modulation de l'activité transcriptionnelle	192
9. PCR Quantitative en temps réel (Q-RT-PCR)	193
<b>V. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>195</b>





# I. INTRODUCTION

La recherche scientifique s'attelle depuis de nombreuses années à la compréhension des phénomènes moléculaires, biologiques et physiologiques qui caractérisent le cancer, pathologie dont le nombre de décès (7,6 millions en 2008) correspond à 13% de la mortalité mondiale selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Et ce chiffre serait en constante augmentation du fait de la hausse de l'espérance de vie et de l'accroissement des populations, pour atteindre 13,1 millions de décès en 2030 selon les estimations mondiale de l'OMS. Concernant la France, 31% des décès en 2010 avaient pour cause des cancers, devançant ainsi la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires. Parmi les différents types de cancers, l'incidence et la mortalité diffèrent selon le sexe avec le cancer du poumon qui reste le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes et le cancer du sein pour les femmes.

Les recherches entreprises aussi bien au plan fondamentales que cliniques mettent en avant la complexité des phénotypes cancéreux rendant si difficile le développement de nouvelles thérapies dite « ciblée » afin de réduire la toxicité des traitements actuels. Cette complexité est autant liée à la diversité des cancers existants (de *novo* ou chimio-induits), dépendant du tissu affecté, qu'aux disparités constatées au sein d'un même tissu selon le stade évolutif mais aussi selon le patient. A cet effet, Hanahan et al. ont dépeint 10 caractéristiques du tissu cancéreux incluant à la fois l'entité de base qu'est la cellule cancéreuse mais aussi l'impact du microenvironnement tumoral dans lequel évoluent ces cellules (Hanahan et al., 2011) (Fig. 1).

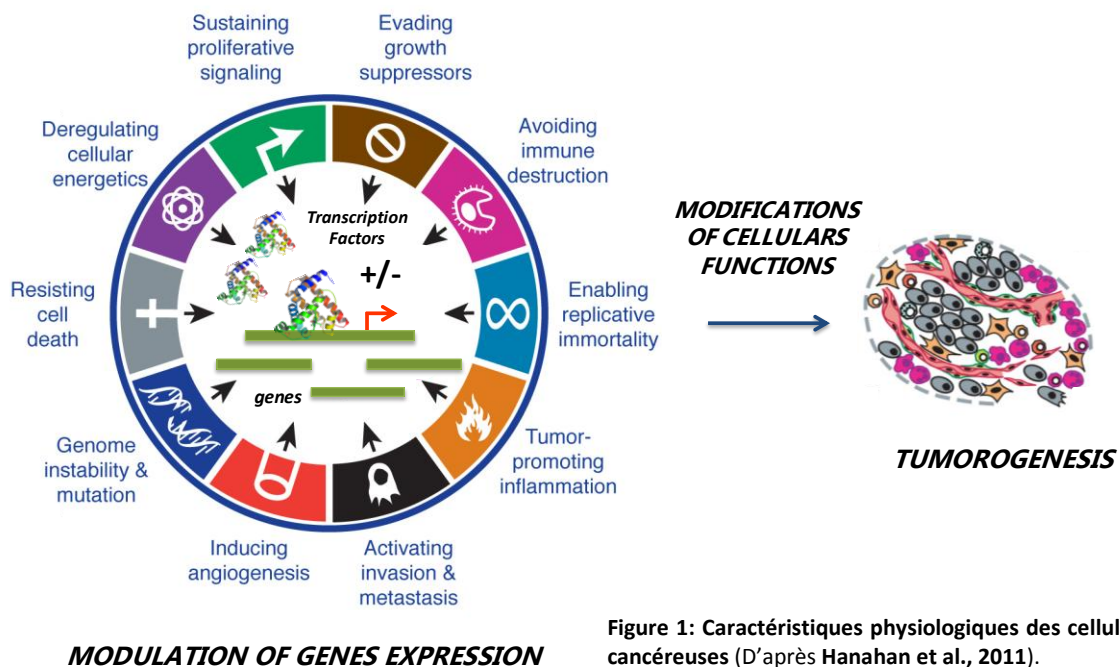


Figure 1: Caractéristiques physiologiques des cellules cancéreuses (D'après Hanahan et al., 2011).

La prolifération anarchique est souvent la première notion abordée dans la description d'une cellule cancéreuse bien que cela soit plus complexe. En effet, le maintien des voies de signalisation « proliférative » côtoie d'autres dysfonctionnements tels l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur, l'échappement au système immunitaire, la capacité à se répliquer à l'infini, la promotion de l'inflammation tumorale, l'activation de l'invasion et des métastases, l'induction de l'angiogenèse, l'instabilité génomique et les mutations de l'ADN, la résistance à la mort cellulaire ainsi que la dérégulation du métabolisme énergétique. L'ensemble de ces caractéristiques évoluent en étroite collaboration avec la modulation de l'activité des facteurs de transcription, protéines interagissant avec une séquence consensus de l'ADN au niveau de régions promotrices ou d'éléments régulateurs *enhancers* ou *silencers* de leurs gènes cibles respectifs. En effet, chaque caractéristique énoncée précédemment requière une modulation fine de l'expression de gènes cibles, relais des voies signalétiques ou d'autres signaux internes et/ou externes à la cellule, afin d'activer ou de réprimer l'expression de protéines clés nécessaires au développement tumoral.

Par ailleurs, ces facteurs de transcription peuvent eux-mêmes devenir source de cancérogenèse suite à des altérations génétiques de leurs gènes (duplications, mutations ou translocations). Cette notion peut être illustrée par le facteur de transcription BCL6 (*B-cell lymphoma – 6*), répresseur transcriptionnel requis pour la différenciation terminale des lymphocytes B dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques. Il est sujet au mécanisme de « substitution du promoteur », où son expression devient guidée par un promoteur ectopique qui rend compte d'une expression constitutive induisant l'indifférenciation des cellules B qui contribue à la lymphomagenèse des lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCB). A ces modifications s'ajoutent des délétions génomiques et/ou des mutations somatiques au niveau de la région 5' non codante du gène (Ye et al., 1993 ; Baron et al., 2004 ; Basso et al., 2012).

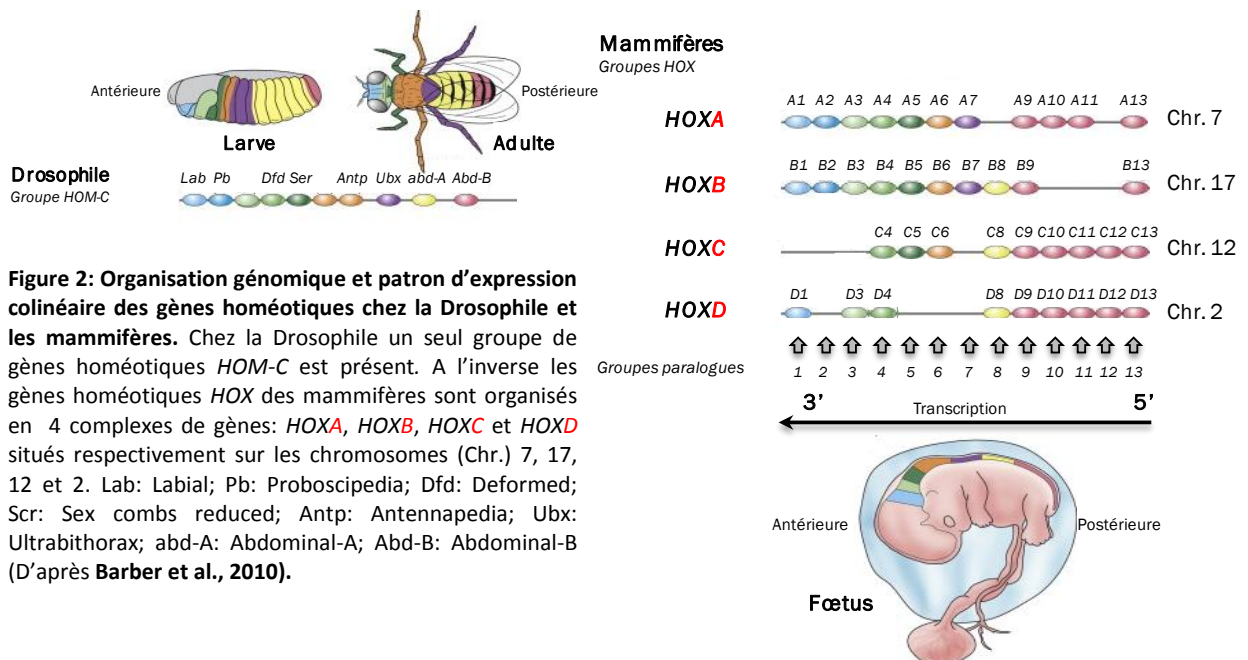
Un autre exemple implique le facteur de transcription AML1 (*acute myeloid leukemia-1* ou RUNX1 ou CBF $\alpha$ 2) nécessaire au processus d'hématopoïèse en condition physiologique. Sa fusion (translocation t(8;21)) au corépresseur transcriptionnel ETO (*eight twenty one*) aboutit à une protéine chimère AML1-ETO leucémogène ayant perdu le domaine transactivateur d'AML1 (Licht, 2001). D'autres exemples seront discutés dans les paragraphes suivants pour des facteurs de transcription appartenant à deux grandes familles de facteurs impliquées dans la leucémogénèse et le cancer de la prostate.

## A. HOXA9: De l'architecte du développement embryonnaire à l'oncogène leucémique

### 1. Du gène au facteur de transcription fonctionnel

#### a. HOXA9 : membre de la famille des gènes HOX

Plus de 25 ans se sont écoulés depuis la découverte des gènes homéotiques chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) définis ainsi par la présence d'une séquence d'ADN commune et conservée: l'homéobox. Depuis, ces gènes communément nommés « les gènes *HOX* » furent décrits dans de nombreuses espèces notamment le nématode *Ceanorhabditis elegans*, le poisson zèbre, la souris ou encore l'Homme. Chez ces deux derniers, 39 gènes *HOX* sont regroupés en 4 complexes (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC* et *HOXD*) situés sur 4 chromosomes différents (7p15, 17q21, 12q13 et 2q31 respectivement) qui furent classés en 13 groupes paralogues sur la base de la conservation de séquences protéiques correspondantes et d'une expression parallèle (**Fig. 2**) (**Shah et al., 2010**).



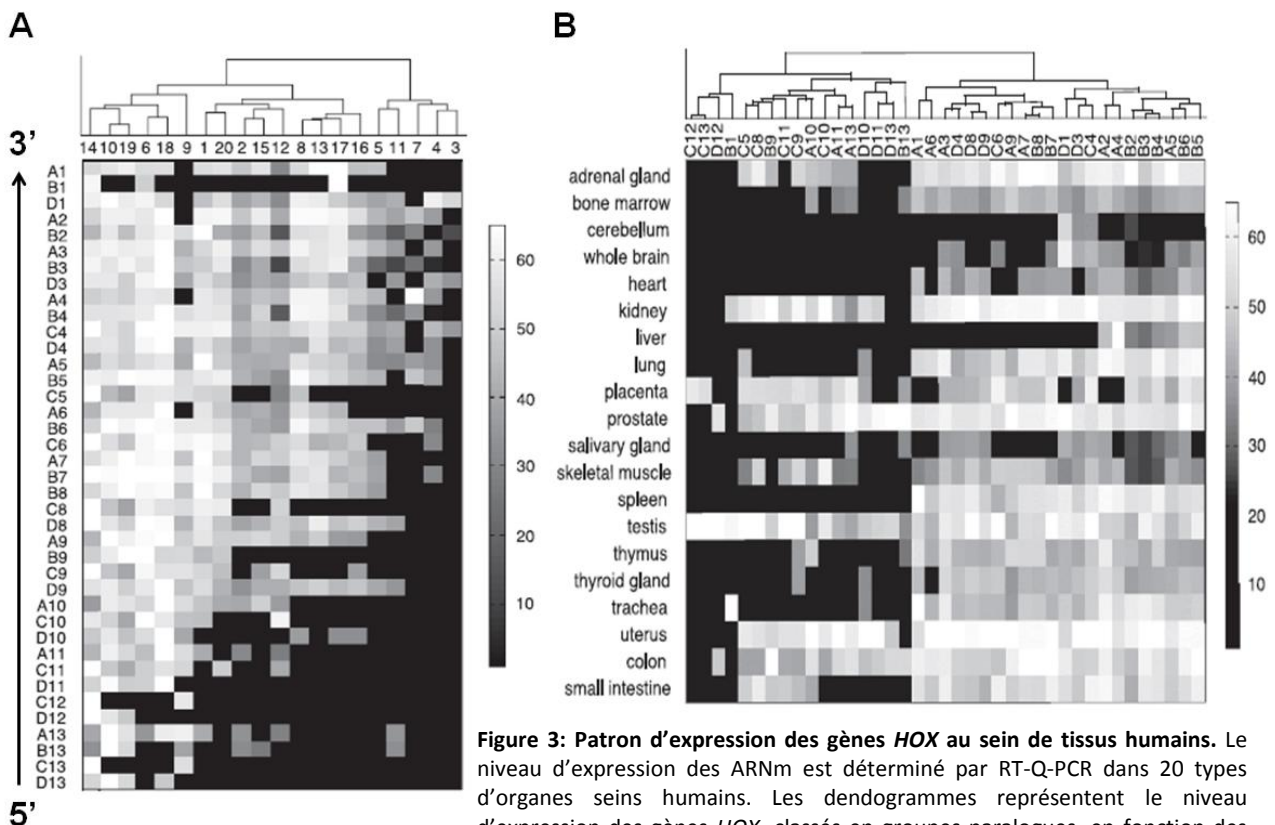
Ces gènes *HOXA-HOXD* appartiennent à la famille des gènes *HOX* de classe I par opposition à d'autres gènes *HOX* réunis dans la classe II (nommé gènes « non *HOX* » ou gènes « *HOX* divergents »). Ces derniers sont dispersés au sein du génome. Certains codent pour des cofacteurs des protéines *HOX* de classe I tels *PBX* (*Pre B cell leukemia*) et *MEIS* (*myeloid ectropic insertion site*) et d'autres pour des protéines impliquées dans l'organogenèse et la différenciation de types cellulaires spécifiques tels *HOX11* ou *HOX11L2* (**Owens et al., 2002**).

## b. Expression des gènes HOX

L'expression des gènes *HOX* est généralement restreinte aux cellules indifférenciées et/ou prolifératives comme l'illustre son rôle dans les stades précoces du développement embryonnaire et les cellules souches hématopoïétiques (CSHs).

Au cours de l'embryogénèse, trois principes de base guident cette expression. Le premier se réfère à la règle de colinéarité spatiale où la position des gènes *HOX* à l'extrémité 3' vers 5' au sein d'un complexe correspond à son expression le long de l'axe antéropostérieur. Ceci implique une expression des gènes situés en 3' du complexe *HOX* dans les segments (ou métamères) antérieurs alors que les gènes situés en 5' agissent dans les segments plus postérieurs. Le second repose sur le principe de prévalence postérieure où les gènes plus proches de l'extrémité 5' du complexe ont un phénotype dominant à ceux plus en 3'. Enfin le troisième principe s'appuie sur la règle de colinéarité temporelle où l'expression des gènes *HOX* dans le temps suit l'ordre correspondant à leur position au sein du complexe de l'extrémité 3' vers 5'. L'expression des gènes en 3' prime alors temporellement sur ceux situés en 5' (Durstun et al., 2012).

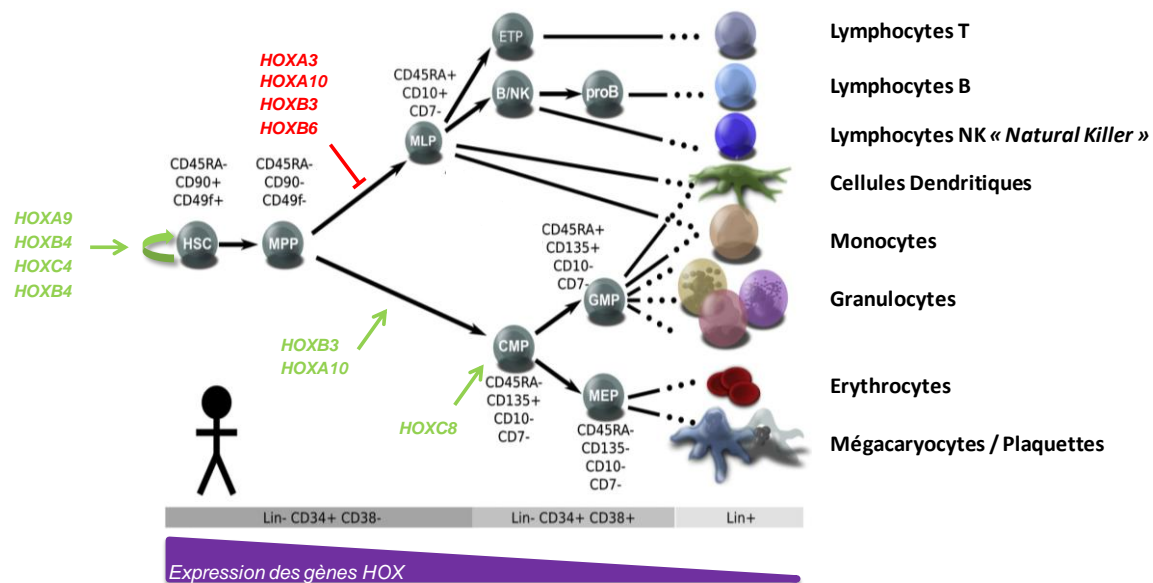
Chez l'adulte, en particulier chez l'être humain, les tissus (cerveau, foie, cœur et glandes salivaires) exprimant moins de la moitié des gènes *HOX* sont localisés dans la partie antérieure du corps contrairement aux tissus (testicules, prostate, colon, reins, utérus et placenta) exprimant la plupart des gènes *HOX* situés dans la partie la plus postérieure (Fig. 3).



**Figure 3: Patron d'expression des gènes *HOX* au sein de tissus humains.** Le niveau d'expression des ARNm est déterminé par RT-Q-PCR dans 20 types d'organes seins humains. Les dendrogrammes représentent le niveau d'expression des gènes *HOX*, classés en groupes paralogues, en fonction des différents organes (A) ou selon l'intensité d'expression du tissu (B) (D'après Takahashi et al., 2004).

De plus, les gènes localisés à l'extrémité 3' sont davantage activés que ceux en 5' (Neville et al., 2002 ; Takahashi et al., 2004 ; Morgan, 2006). A l'identique, il semblerait que la colinéarité spatiotemporelle observée au cours de l'embryogenèse soit préservée chez l'adulte à l'exemple de l'appareil reproducteur féminin où *HOXA9* est exprimée dans les oviductes, suivi par *HOXA10* et *HOXA11* dans l'utérus et le col de l'utérus et finalement *HOXA13* au sein du tissu vaginal et de la vulve (Taylor et al., 1997).

Un des systèmes physiologiques de l'organisme adulte particulièrement soumis à l'expression des gènes *HOX* est le système hématopoïétique : l'expression des gènes *HOX* n'y est pas sans rappeler celle observée dans les stades précoces du développement embryonnaire, fonction à la fois du lignage cellulaire et du stade de différenciation (Fig. 4).



**Figure 4: Implication des gènes *HOX* au cours de l'hématopoïèse humaine.** Chaque classe majeure de cellules souches ou de cellules progénitrices est caractérisée par des marqueurs de surfaces indiqués sur le schéma. Les régulations positives ou négatives de chaque facteur de transcription *HOX* sur un processus spécifique sont indiquées en vert et rouge respectivement et la flèche verte indique la capacité d'auto-renouvellement des CSHs. HSC: *hematopoietic stem cell* (CSH), MPP: *multipotent progenitor* (progéniteur multipotent), MLP: *multipotent lymphoid progenitor* (progéniteur lymphoïde multipotent), CMP: *common multipotent myeloid progenitor* (progéniteur myéloïde commun), ETP: *early T-lineage progenitor* (Progéniteur de la lignée T précoce), B/NK: *B cell and natural killer* (précurseur commun aux lymphocyte B et natural killer), proB: *pro-B cell* (cellules pré-B), GMP: *myelo-granuloid progenitor* (progéniteur myélo-granulocytaire), MEP: *myelo-erythroid progenitor* (progéniteur myélo-érythroïde) (D'après Mahdipour et al., 2011 ; Doulatov et al., 2012).

Effectivement, les différents groupes de gènes *HOX* ont un patron d'expression dépendant de la lignée hématopoïétique où les gènes *HOXA* sont davantage exprimés dans les cellules myéloïdes, *HOXB* au sein des cellules érythroïdes et *HOXC* dans les cellules lymphoïdes. Seuls les gènes du groupe *HOXD* ne sont pas présents dans le système hématopoïétique (Giampaolo et al., 1994 ; Pineault et al., 2002). De manière générale, les gènes *HOX* sont fortement exprimés au sein des CSHs et des progéniteurs primitifs, caractérisés par un statut cellulaire indifférencié et par l'expression du marqueur de surface CD34+, contrairement aux cellules CD34-, décrites comme les cellules différenciées de la moelle osseuse, où l'expression des gènes est quasiment absente (Sauvageau et al.,

1994). Tel est le cas des gènes *HOXA9*, *HOXB4*, *HOXC4* et *HOXB3* principalement exprimés dans les cellules indifférenciées (notamment les CSHs) et dont l'expression s'éteint progressivement au cours de la différenciation des CSHs en cellules matures (Fig. 4) (Sauvageau et al., 1994 ; Lawrence et al., 1997).

c. Expression du gène *HOXA9*

L'expression du gène conduit à la synthèse d'un transcrite d'ARN constitué de 2 exons (exons I et II), l'homéodomaine étant inclus au sein de l'exon II (Kim et al, 1998 ; Popovic et al., 2008). Un autre transcrite fut identifié d'abord chez la souris. Il est issu d'une modification du cadre de lecture présentant de manière précoce un codon stop et aboutit à l'expression d'une forme tronquée nommée ici *hoxa9t* dépourvue du domaine de liaison au cofacteur PBX et de son domaine d'interaction à l'ADN : l'homéodomaine (Fig. 5) (Fujimoto et al., 1998 ; Dintilhac et al., 2004). Ce transcrite est retrouvé au sein de différents tissus embryonnaires murins contrairement à son homologue humain *HOXA9T* qui n'a été décrit qu'au sein de tissus pathologiques (cellules d'adénocarcinomes endométriaux et cellules leucémiques ayant des réarrangements du gène *MLL*) (He et al., 2012). D'un point de vue fonctionnel, très peu de données expérimentales discutent du rôle joué par ce transcrite au sein de cellules normales, seule la localisation subcellulaire est modifiée. En effet, exprimé de manière ectopique au sein de cellules HeLa, il se localise à la fois dans le compartiment cytoplasmique et nucléaire alors qu'*HOXA9* est exclusif au noyau (Dintilhac et al., 2004).

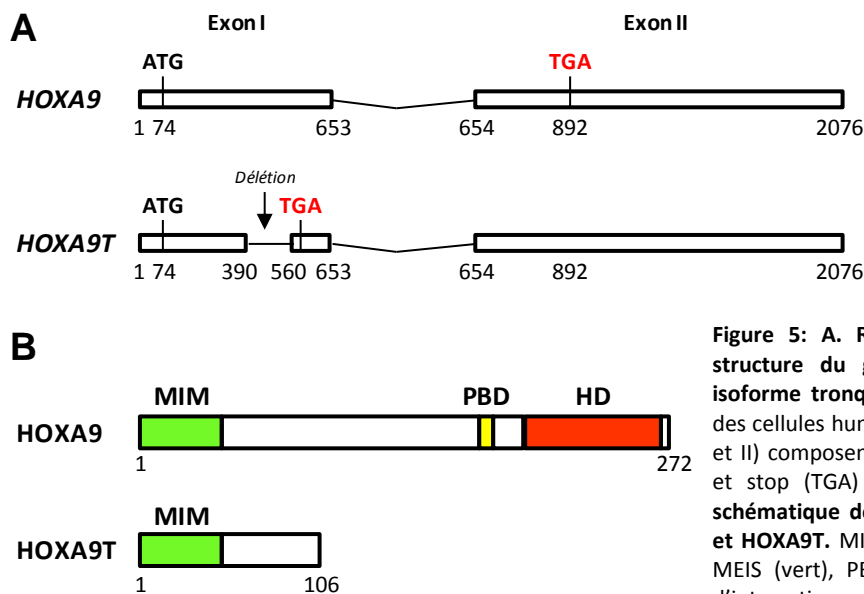


Figure 5: A. Représentation schématique de la structure du gène *HOXA9* humain et de son isoforme tronqué *HOXA9T*. Ce dernier est absent des cellules humaines normales. Deux exons (exon I et II) composent le locus où les codons start (ATG) et stop (TGA) sont indiqués. B. Représentation schématique des domaines protéiques de *HOXA9* et *HOXA9T*. MIM: motif d'interaction du cofacteur MEIS (vert), PBD (PBX-binding domain): domaine d'interaction du cofacteur PBX (jaune), HD: Homéodomaine (D'après He et al., 2012).



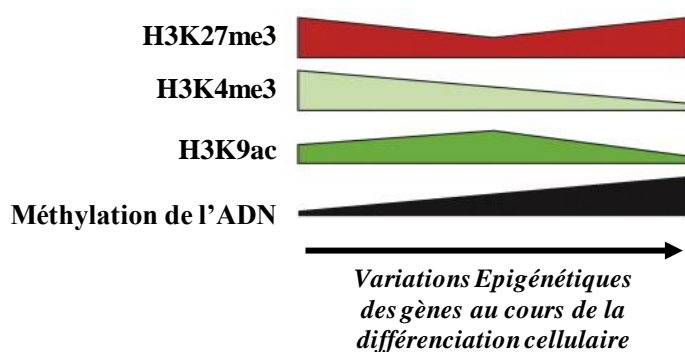
Contrairement à la forme tronquée, l'expression du gène *HOXA9* est largement décrit au cours de l'hématopoïèse chez l'adulte. Cette expression persistante constitue un des vestiges du développement embryonnaire où bien que le rôle premier est l'établissement de l'axe antéropostérieur au cours de l'embryogenèse, certains gènes *HOX* et certains organes conservent leurs expressions chez l'adulte.

#### d. Régulation physiologique de l'expression du gène *HOXA9*

L'expression colinéaire et exclusive des gènes *HOX* au cours du développement embryonnaire suggère une régulation fine nécessaire à la cohérence génétique et développementale impliquant la perte de ces fonctions embryonnaires par répression transcriptionnelle et/ou perte fonctionnelle à l'âge adulte.

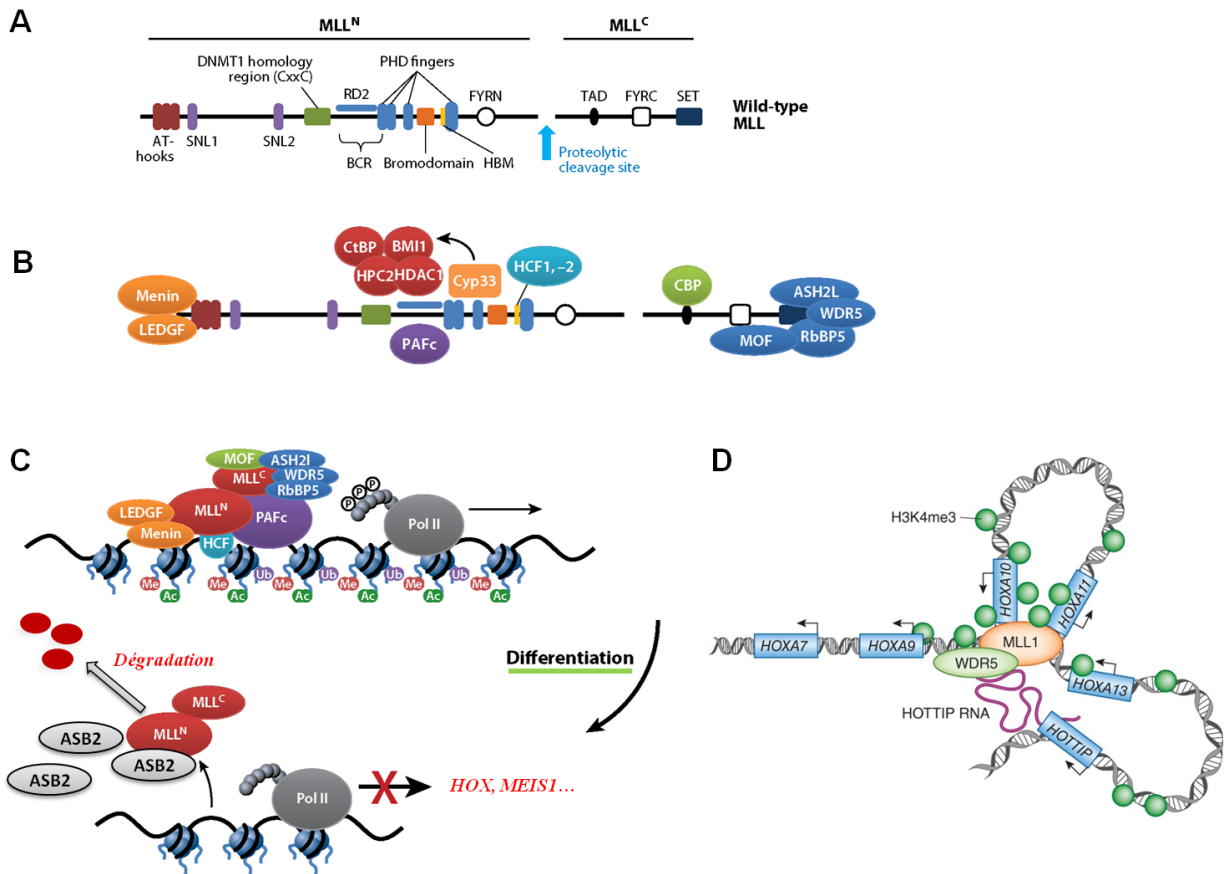
##### i. Régulation épigénétique : Modifications des histones

Tel est l'exemple du locus génique du complexe *HOXA*, incluant *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9* et *HOXA10* pour lequel l'action d'histones méthyltransférases (HMT) intègre l'un des modes de régulation transcriptionnelle. Ce locus est caractérisé par la fréquence des marqueurs épigénétiques favorables à une activité transcriptionnelle (H3K4me3: triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3, H3K4me1: méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, H3K9me1: méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, H3K36me3: triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3, H4K20me1: méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 et H2A.Z: variant Z de l'histone H2A) au sein de CSHs CD133+ impliquant une expression élevée des gènes du complexe *HOXA* (**Fig. 6**). Ces marqueurs sont ensuite supplantés, lors de la différenciation des CSHs CD133+ en précurseurs érythrocytaires CD36+ ou en précurseurs des lymphocytes pré-B CD19+, par un autre marqueur épigénétique synonyme de répression transcriptionnelle: la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) (**Cao et al., 2008 ; Cui et al., 2009 ; Chapman et al., 2011**).



Cette signature épigénétique est qualifiée de bivalente pour la famille des gènes *HOX* puisque celle-ci implique à la fois les méthylations H3K4 (activatrices) et H3K27 (répressives) réalisées en partie par le « complexe MLL », complexe incluant la protéine MLL (*mixed lineage leukemia*) et le complexe répressif du groupe Polycomb (PcG) contenant EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*) respectivement. La protéine MLL est exprimée dans la plupart des tissus, incluant les cellules myéloïdes et lymphoïdes. Issue de l'expression du gène *mll* en position q23 du chromosome 11, elle code pour une histone méthyltransférase qui interagit directement avec l'ADN et régule positivement l'expression de gènes *HOX* via le recrutement de diverses protéines réunies au sein du complexe MLL (**Fig. 7**). L'interaction MLL-promoteur des gènes *HOX* aboutit à l'acétylation des histones H3 de la lysine 4 ce qui constituerait le mécanisme par lequel la protéine MLL maintient l'expression des gènes *HOX*. Le dépôt de ce marqueur et l'activation transcriptionnelle du locus *HOXA* peut être facilité par un ARN HOTTIP (*HOXA transcript at the distal tip*). Celui-ci correspond à un large ARN intergénique non codant (ARN-linc, *large intergenic non coding RNA*) dont le sens de sa transcription est opposée à l'orientation des gènes du locus *HOXA* et son expression corrèle avec celle des gènes *HOXA* (notamment les plus distaux: *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXA11* et *HOXA13*). Cet ARN est capable d'interagir avec la protéine WDR5 (*WD repeat-containing protein 5*), membre du « complexe MLL », et à travers la modification spatiale de la chromatine (caractérisée par des boucles chromatiniennes compactes lors d'un statut transcriptionnel actif) de maintenir ce complexe « MLL-WDR5 » à proximité physique du locus *HOXA*, complexe nécessaire au dépôt du marqueur H3K4me3 (**Fig. 7.D**) (**Wang et al., 2011**). En effet, la protéine MLL possède, en plus du site de fixation à l'ADN de type AT-hook, un domaine homologue à l'ADN méthyltransférase (**Fig. 7.A**). La région carboxy-terminale contient un domaine SET, domaine caractéristique des protéines ayant la capacité de modifier la structure de la chromatine par méthylation de certaines lysines composant les histones ce qui contribuerait ainsi à une régulation positive et directe de l'expression des gènes *HOX* (**Nakamura et al., 2002 ; Milne et al., 2002**). De plus la protéine MLL s'associe avec l'histone acétyltransférase (HAT) MOF dont l'acétylation de la lysine 16 de l'histone 4 (H4K16) prend part à l'activation transcriptionnelle des gènes notamment *HOXA9* (**Dou et al., 2005**).

Le facteur PAFc associé à l'ARN polymérase II (ARN Pol II) permet le recrutement d'ubiquitine ligases responsables de la mono-ubiquitination de l'histone H2B résultant en l'activation transcriptionnelle (**Fig. 7. B**) (**Muntea et al., 2010**). De plus, via le domaine CxxC, MLL interagit aussi au sein du locus *HOXA9* sur un site nucléotidique riche en résidus CpG. Ainsi la présence de la protéine MLL permet la protection du locus de la méthylation de l'ADN et donc la préservation de son expression comme démontré pour le gène *HOXA9* (**Erfurth et al., 2009**).



**Figure 7: A. Représentation schématique de la structure de la protéine MLL sauvage (Wild-type MLL) et de ses domaines fonctionnels.** Le clivage de la protéine MLL (flèche bleue) aboutit à deux fragments protéiques MLL<sup>N</sup> et MLL<sup>C</sup> qui interagissent via les domaines FYRN ("FY-rich" domain N-terminal) et FYRC ("FY-rich" domain C-terminal) respectifs. La partie MLL<sup>N</sup> est composée de trois domaines AT-hook d'interaction sur des séquences AT-riches du petit sillon de l'ADN, deux motifs de localisations sub-nucléaire SNL1 et SNL2, une région homologue à l'ADN méthyltransférase (*DNMT1 homology region* ou domaine CxxC) qui se fixe spécifiquement sur l'ADN non méthylé), un site riche en acides aminés basiques (RD2), 4 homéodomaines de type PHD (*Plant HomeoDomain fingers*) incluant un bromodomaine atypique (Bromodomain) et un motif d'interaction de facteur de cellules hôte (HBM : *host cell factor-binding motif*). La région des points de cassures (BCR pour *Break-point Cluster Region*) correspond au site des différentes translocations chromosomiques impliquant le gène *MLL*. La seconde partie MLL<sup>C</sup> est constituée d'un domaine de transactivation (TAD) et d'un domaine SET (*Su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax*). **B. Protéines interagissant avec MLL.** MLL<sup>N</sup> permet le recrutement du suppresseur de tumeur Menin, via deux motifs d'interaction menin (MBM) et du complexe d'activation transcriptionnelle PAFc (*Polymerase associated factor complex*). Le domaine RD2 interagit avec le complexe corépresseur CtBP, protéines du groupe PcG HPC2, BMI1 et histone désacétylase HDAC1 via la cyclophiline 33 (Cyp33), protéine nucléaire d'interaction à l'ARN. Via le domaine TAD, MLL<sup>C</sup> recrute l'histone acétyltransférase CBP contribuant à l'acétylation des histones et la transcription des gènes. MLL<sup>C</sup> s'associe avec plusieurs coactivateurs transcriptionnels tels MOF (*Males absent On the First*) et le complexe protéique regroupant les protéines WDR5 (WD repeat-containing protein 5), RbBP5 (*Retinoblastoma binding protein 5*) et ASH2L (*absent, small or homeotic-like*) nécessaire à l'acétylation H4K16 et à une activité enzymatique maximale respectivement. LEDGF: *lens epithelial-derived growth factor*; HCF1, -2: *host cell factor*. **C. Modèle de modulation transcriptionnelle des gènes cibles via le complexe [MLL-protéines].** Au sein des CSHs et des progéniteurs hématopoïétiques, MLL maintient l'expression des gènes *HOX* et *MEIS*. Par contre lors de la différenciation, l'expression de la protéine ASB2 est induite menant à l'ubiquitination et à la dégradation de la protéine MLL. Ub: Ubiquitination ; Me: Méthylation ; Ac: Acétylation (D'après Muntea et al., 2012). **D. Implication de l'ARN non codant HOTTIP dans le maintien de l'activité transcriptionnelle des gènes du locus *HOXA*.** L'ARN HOTTIP recrute, au niveau du locus *HOXA*, le complexe «MLL-WDR5» par fixation de la protéine WDR5. Les modifications de la chromatine ainsi que sa conformation spatiale en boucles permettent le rapprochement entre l'ARN HOTTIP et le locus *HOXA* (D'après Guil et al., 2012).

Ces modifications épigénétiques contribuent alors au maintien de l'expression des gènes *HOX* lors du développement embryonnaire et au cours de l'hématopoïèse principalement dans les stades indifférenciés (CSHs et progéniteurs hématopoïétiques) (Muntea et al., 2012). Néanmoins ce maintien n'est pas définitif et évolue au cours de la différenciation hématopoïétique où MLL n'est plus recrutée au niveau des promoteurs de ses gènes cibles en partie à cause d'une diminution de la transcription du facteur PAFc mais aussi de l'induction de l'expression de la protéine ASB2 (*Ankirin repeat and SOCS box containing 2*) (Muntea et al., 2010). Cette dernière est une composante du complexe ubiquitine ligase ECSASB E3 qui permet la dégradation de la protéine MLL par ubiquitinylation et donc la diminution de son activité transcriptionnelle (Fig. 7. C) (Wang et al., 2012).

#### ii. Régulation transcriptionnelle: Implication de facteurs de transcription

D'autres facteurs de transcription influent aussi l'expression des gènes *HOX*. C'est le cas des facteurs de transcription CDX (*caudal-type homeobox transcription factor*) appartenant au groupe des gènes *HOX* de classe II. Ils sont essentiels au contrôle de l'expression de leurs homologues de classe I via l'intégration de multiples voies de signalisation. Bien que leurs fonctions exactes soient peu décrites, les modèles murins (*knockout* des gènes *cdx*) montrent leur importance pour la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques embryonnaires ainsi que dans l'expression des gènes *HOX* (Wang et al., 2008 ; Rawat et al., 2012). Cependant, l'expression de ces gènes est éteinte chez l'adulte, notamment dans les CSHs et les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes B ou T, contribuant *in fine* à une non activation, par les facteurs CDX, de l'expression des gènes *HOX* dans ces types cellulaires (Rawat et al., 2012).

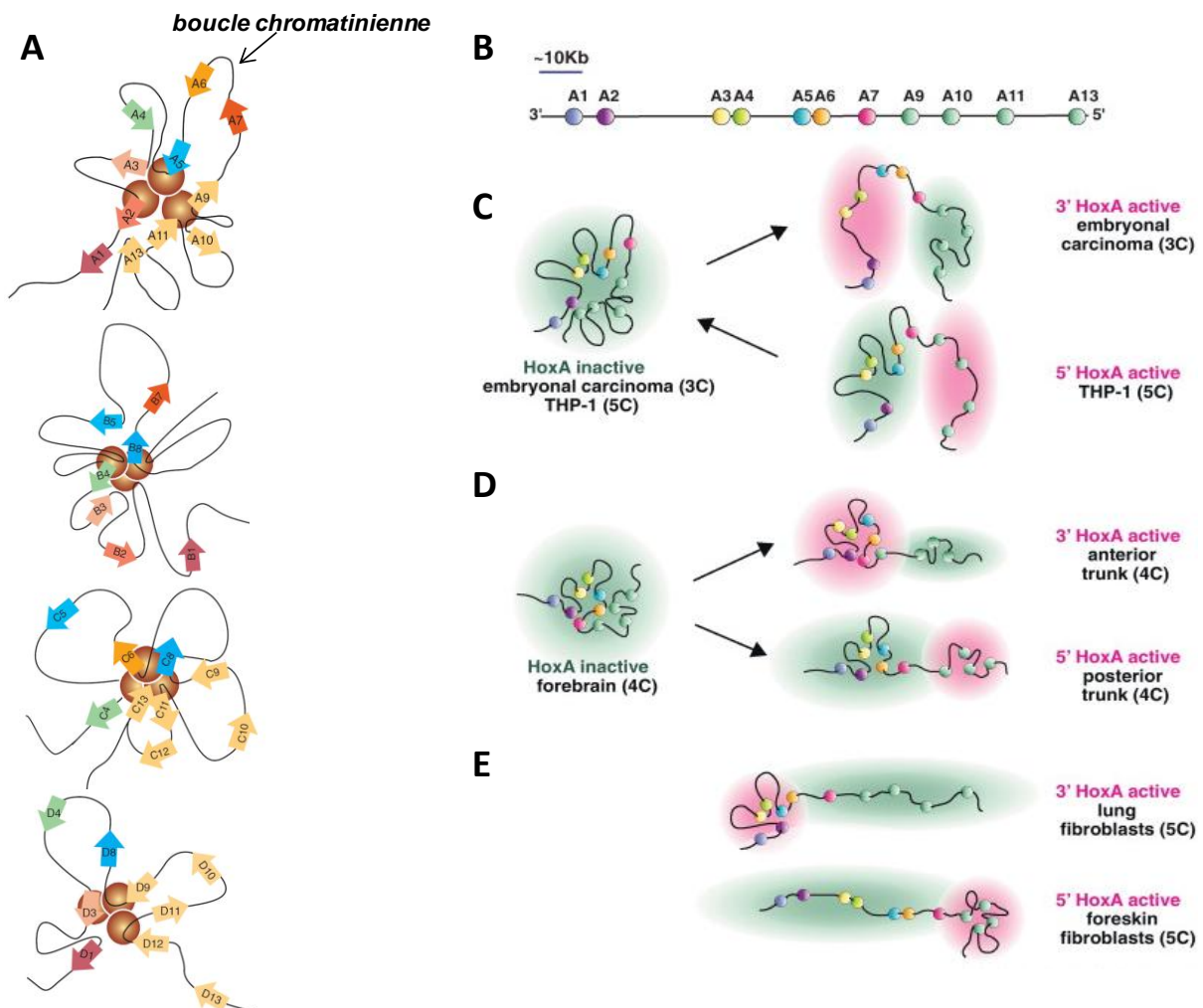
#### iii. Régulation post-transcriptionnelle: Implication des miARN

Les différents gènes *HOX* comptent au sein de leurs locus des gènes transcrits en miARNs (micro-ARNs) comme le *miARN-196b* situé entre les gènes *HOXA9* et *HOXA10*. Les miARN correspondent à de petits transcrits d'ARN (~ 22 nucléotides) non codants dont l'interaction directe et spécifique de sa séquence complémentaire (le plus souvent la région 3'UTR, 3' *untranslated region*, du transcrit d'ARNm cible) conduit à une répression de la traduction et/ou à la dégradation de l'ARNm. Dans le cas du *miARN-196b*, il induit la répression de l'expression d'*HOXA9* et de son cofacteur MEIS1, suggérant alors un autre niveau d'inactivation du facteur *HOXA9* au cours de l'hématopoïèse (Yekta et al., 2008 ; Li et al., 2012).

#### iv. Organisation spatiale de la chromatine et expression des gènes *HOX*

L'étude de la modulation de l'expression des gènes est le plus souvent restreinte à deux dimensions où les modifications du système [promoteur - gène] sont examinées au niveau local alors que

l'organisation fonctionnelle des gènes et des éléments les contrôlant n'est pas linéaire le long des chromosomes mais correspond davantage à un réseau tridimensionnel dynamique ayant des contacts physiques essentiels pour l'expression correcte des gènes. Cette structure a été étudiée pour l'expression des gènes *HOX* et consiste en une organisation 3D de la chromatine dépendante de l'activité transcriptionnelle où les gènes en position 5' du groupe A (*HOXA9*, *HOXA10*, *HOXA11* et *HOXA13*) présentent d'amples boucles chromatinienne entre les régions entourant chacun de ces gènes (**Fig. 8**). Ils sont ainsi regroupés lorsqu'ils ne sont pas exprimés au sein de cellules différenciées contrairement aux cellules indifférenciées où les modifications de l'architecture chromatinienne (déstructuration des boucles) corrélient avec l'expression des gènes *HOXA9*, *HOXA11* et *HOXA13* à l'écart du groupe (**Fig. 8**). Le facteur CTCF (*CTC-binding factor*), connu pour la régulation de gènes via la mise en place de boucles chromatinienne, serait dans ce contexte identifié en tant que médiateur des boucles d'ADN des groupes de gènes *HOX* étant donné la présence multiple de sites consensus d'interaction de ce facteur (**Fraser et al., 2009 ; Ferraiuolo et al., 2010 ; Dostie et al., 2012**).

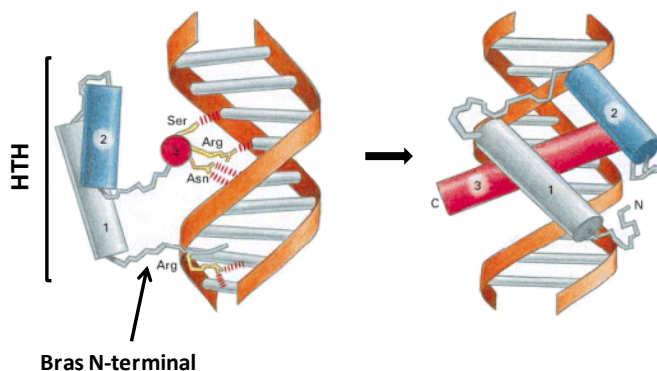


**Figure 8: A. Représentation schématique de l'organisation du groupe de gènes humains *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* et *HOXD* silencieux *in vivo*. Les cercles représentent les régions génomiques où de fortes interactions ont lieu entre les boucles chromatinienne (D'après Ferraiuolo et al., 2010). B. Représentation schématique du locus *HOXA*. C. D. et E. Modèles de conformations chromatinienne du locus *HOXA*. L'organisation spatiale de la chromatine a été déterminée par des techniques de « capture » de la conformation des chromosomes (3C, 4C ou 5C) selon le contexte cellulaire choisi et détaillé pour chaque modèle (D'après Dostie et al., 2012).**

## 2. HOXA9 : Facteur de transcription fonctionnel et spécificité de reconnaissance de l'ADN

### a. Facteur de Transcription

D'un point de vue moléculaire, les gènes *HOX* codent pour des facteurs de transcription dont l'interaction avec une séquence spécifique de l'ADN constitue leur fonction première requise pour la modulation de l'activité transcriptionnelle de manière directe ou indirecte via le recrutement ou non de la machinerie transcriptionnelle.



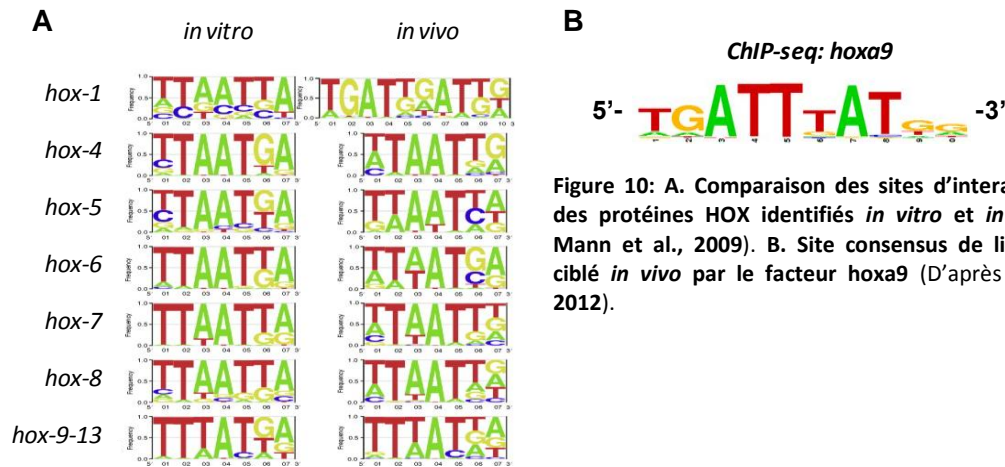
**Figure 9: Représentation de l'interaction de l'homéodomaine des protéines HOX avec la double hélice d'ADN.** L'homéodomaine est formé de 3 hélices  $\alpha$  et d'un bras aminoterminal qui entre en contact avec le petit sillon de la molécule d'ADN. En revanche, le motif hélice-tour-hélice (HTH) formé par les hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  interagit avec le grand sillon de l'ADN par l'hélice  $\alpha 3$ . Le bras aminoterminal interagit avec le petit sillon (D'après **Albert et al., 2004**).

Cette interaction avec l'ADN se fait via un domaine de fixation à l'ADN commun aux protéines HOX et nommé homéodomaine (**Albert et al., 2004**). Codé par 180 paires de bases, il est caractérisé par un motif Hélice-Tour-Hélice (HTH) constitué de 60 acides aminés représentant la signature moléculaire des protéines HOX étant donné l'homologie de séquence qui peut être supérieure à 90%. Le motif HTH est constitué de trois hélices  $\alpha$  (numérotée  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ) dont l'hélice  $\alpha 1$  favorise l'interaction à l'ADN du motif HTH et porte le bras aminoterminal essentiel à l'interaction avec l'ADN (**Fig. 9**). Ce dernier interagit au niveau du petit sillon de l'ADN par l'établissement de liaisons hydrogènes avec les bases et le squelette sucre-phosphate tandis que l'hélice  $\alpha 3$ , hélice de reconnaissance orientée par le motif HTH, entre en contact avec le grand sillon de la double hélice d'ADN.

### b. Séquence de reconnaissance de l'ADN

La séquence nucléotidique de reconnaissance par les diverses protéines HOX est défini de manière large comme un site « riche en paires de bases AT » de type 5'-ATNAA-3' (ou 5'-TTNAT-3') où la troisième base est spécifique à chaque protéine HOX (**Fig. 10.A**) (**Draganescu et al., 1995 ; Noyes et al., 2008**). La réalité de l'interaction montre une sélectivité de séquence plus grande. Pour le facteur

hoxa9 de récentes données de ChIP-seq ont identifié la base T comme nucléotide prédominant en position 3 (**Fig. 10. B**) (**Huang et al., 2012**). Bien que l'hélice  $\alpha 3$  de reconnaissance fût décrite comme l'élément majeur de cette interaction [ADN-protéines], l'interaction avec le petit sillon adjacent au site via le bras aminoterminal est indispensable. En effet, une inhibition de l'interaction [homéodomaine-ADN] est obtenue lorsque l'adénine subit une méthylation en position N3 dans le petit sillon, ce qui n'est pas constaté lors de la méthylation en position N7 des guanines dans le grand sillon (**Draganescu et al., 1995**).

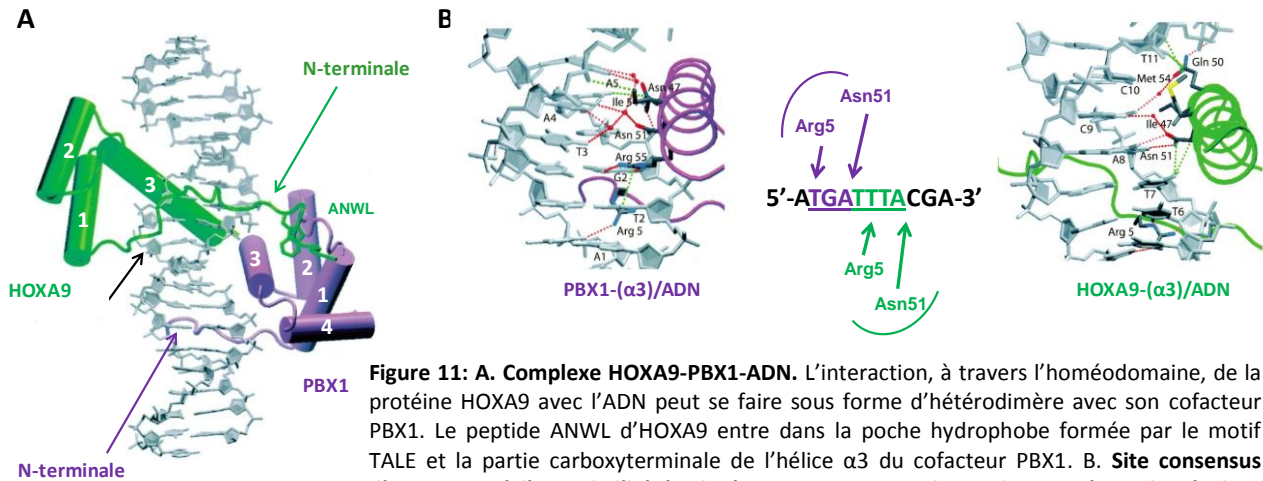


**Figure 10: A. Comparaison des sites d'interaction à l'ADN des protéines HOX identifiés *in vitro* et *in vivo* (D'après Mann et al., 2009). B. Site consensus de liaison à l'ADN ciblé *in vivo* par le facteur hoxa9 (D'après Huang et al., 2012).**

### c. HOXA9 et ses Cofacteurs

Comme bon nombre de facteurs de transcription ayant une certaine flexibilité dans leur sélectivité et leur spécificité, plusieurs études suggèrent la nécessité de cofacteurs pour accroître ces deux propriétés et ainsi moduler l'expression de gènes cibles (**Moens et al., 2006 ; Mann et al., 2009**). Ainsi, la spécificité de reconnaissance des protéines HOX est augmentée par l'interaction avec d'autres protéines jouant le rôle de cofacteurs des protéines HOX incluent dans la famille des protéines TALE (*Three Amino Acid Loop Extension*) tels PBX et MEIS. Ces protéines sont caractérisées par un homéodomaine qui diffère de celui des protéines HOX par la présence d'une quatrième hélice  $\alpha$  ( $\alpha 4$ ) en aval des trois hélices typiques de l'homéodomaine et de trois acides aminés supplémentaires à l'extrémité carboxyterminale de l'hélice  $\alpha 1$  (entre les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ). L'étude de la structure du complexe HOXA9-PBX1 a permis de déterminer un mode d'interaction protéine/protéine où les acides aminés ANWL (Alanine-Asparagine-Tryptophane-Leucine) situés en amont de l'homéodomaine de la protéine HOXA9 entrent en contact avec la poche hydrophobe formée par le motif TALE et la partie carboxyterminale de l'hélice  $\alpha 3$  du cofacteur PBX1 (**Fig. 11.A.**). Cette interaction est en partie consolidée par des liaisons hydrogènes établies entre le résidu tryptophane et l'un des trois acides aminés de l'insertion TALE (**Fig. 11.B.**) (**Wilson et al., 1999 ; LaRonde-LeBlanc et al., 2003**). Placés tête-bêche de chaque côté de la double hélice, ces deux homéodomaines

interagissent à travers leur hélice de reconnaissance  $\alpha 3$  respectives avec la séquence nucléotidique 5'-aATGATTTAcgac-3', où PBX1 reconnaît le site 5'-ATGA-3' et HOXA9 le site adjacent riche en paire de bases AT (**LaRonde-LeBlanc et al., 2003**).



**Figure 11: A. Complexe HOXA9-PBX1-ADN.** L'interaction, à travers l'homéodomaine, de la protéine HOXA9 avec l'ADN peut se faire sous forme d'hétérodimère avec son cofacteur PBX1. Le peptide ANWL d'HOXA9 entre dans la poche hydrophobe formée par le motif TALE et la partie carboxyterminale de l'hélice  $\alpha 3$  du cofacteur PBX1. **B. Site consensus d'interaction à l'ADN de l'hétérodimère HOXA9-PBX1 et les acides aminés impliqués dans la liaison.** Les liaisons hydrogènes sont indiquées en traits pointillés rouge et les contacts dans le petit sillon et le grand sillon de l'ADN s'effectuent via l'Arg5 (Arginine 5) et l'Asn51 (Asparagine 51), à la fois pour PBX1 (en violet) et HOXA9 (en vert). ANWL : motif Alanine-Asparagine-Tryptophane-Leucine ; Asn : Asparagine ; Arg : Arginine (D'après **LaRonde-LeBlanc et al., 2003**).

Généralement, les protéines HOX1-10 interagissent avec PBX1 alors que les facteurs HOX9-13 lient MEIS1 dont le site consensus de ce dernier est 5'-TGTC-3' (**Shen et al., 1996 ; Shen et al., 1997 ; Hung et al., 2012**). Les groupes paralogues HOX-9 et 10 ont donc la possibilité d'interagir en hétérodimère avec PBX ou MEIS. D'un point de vue moléculaire, cette interaction augmente la spécificité de reconnaissance et stabilise l'interaction du complexe à l'ADN sur son site consensus. A cela s'ajoute une interaction sous forme d'hétérotrimère de type HOXA9/MEIS/PBX reconnaissant la séquence 5'-ATGATTTATGGC-3' (**Shen et al., 1999**).

Ainsi, trois modes de liaisons des protéines HOX à la double hélice d'ADN sont envisageables, l'une sous forme monomérique présentant une plus faible spécificité contrairement aux autres, les autres sous forme hétérodimérique et hétérotrimérique, dotée d'une spécificité supérieure. Ces derniers (protéines HOX + Cofacteurs) soulignent un mode d'interaction coopératif à l'ADN permettant d'accroître à la fois la spécificité de reconnaissance, l'affinité du domaine de liaison à l'ADN et la transactivation (**Mann et al., 2009**).



#### d. Interaction et modification post-transcriptionnelle : modulation de l'activité de HOXA9

##### *i. Modification de la localisation cellulaire*

Dans certains cas, l'activité transcriptionnelle du facteur HOXA9 peut être régulée à la fois via sa séquestration et sa localisation cytoplasmique. Des études expérimentales ont révélé l'existence d'un complexe protéique [SMAD4/HOXA9] dont l'accumulation cytoplasmique permet d'une part la stabilisation du facteur au sein du cytoplasme et d'autre part la restriction de son activité nucléaire de liaison à l'ADN (**Wang et al., 2006 ; Quéré et al., 2011**). Activé par le TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ), la protéine SMAD4 interagit directement avec l'homéodomaine d'HOXA9, ce qui contribuerait à la différenciation des CSHs en cellules matures nécessitant la diminution de l'activité transcriptionnelle du facteur.

La localisation subcellulaire du facteur HOXA9 peut aussi être modulée par d'autres facteurs tels que la thrombopoïétine (TPO) dont la présence augmente la localisation nucléaire du facteur HOXA9 via l'induction de son association avec le cofacteur MEIS (**Kirito et al., 2004**).

##### *ii. Phosphorylation*

L'activité transcriptionnelle du facteur HOXA9 peut également être modulée par certains processus physiologiques tels que la phosphorylation. En effet, HOXA9 présente deux sites de phosphorylation par la PKC (*Protein Kinase C*) : la sérine 204 (S204) et la thréonine 205 (T205) constituant le site consensus STRK situé à l'extrémité aminoterminal de l'homéodomaine. La phosphorylation de la sérine 204 altère considérablement la capacité d'interaction à l'ADN d'HOXA9. L'activation de cette phosphorylation dans des cellules immortalisées par HOXA9 provoque leur différenciation (**Vijapurkar et al., 2004**).

##### *iii. Ubiquitination*

L'ubiquitination, tout comme la phosphorylation, constitue un mode de régulation affectant l'activité du facteur HOXA9. La protéine CUL-4A (cullin-4A) interagit spécifiquement avec HOXA9 et induit ainsi son ubiquitination et sa dégradation cellulaire (**Zhang et al., 2003**). La protéolyse de ce facteur constitue alors une forme de contrôle de la différenciation hématopoïétique via l'atténuation de son activité transcriptionnelle.

### 3. Fonctions physiologiques des facteurs HOX

#### a. Développement embryonnaire

Définis originellement comme des architectes du développement embryonnaire, les gènes *HOX* sont indispensables à l'établissement de l'axe antéro-postérieur chez l'embryon.

La plupart des fonctions décrites sur les gènes *HOX* résultent de l'observation de l'impact de leurs mutations sur le développement embryonnaire. Selon les résultats, ils peuvent être inclus dans deux classes distinctes :

- classe 1 : celle-ci provoque la modification d'une structure en une autre structure fonctionnelle,
- classe 2 : elle aboutit à la perte ou l'altération d'un organe ou d'une structure sans transformation de ce dernier en un autre similaire (**Hombria et al., 2003**).

Le premier concept est illustré par les transformations homéotiques observées aussi bien chez la drosophile que la souris avec la modification des haltères en ailes (lors de la mutation du gène *ubx* chez la drosophile) ou de vertèbres sacrées en lombaires (mutations des gènes paralogues *hox11* chez la souris). Par contre, l'absence des gènes *hoxa/hoxd* chez la souris aboutit à l'absence de membres distaux (à l'exemple du radius et du cubitus) représentant le second concept (**Foronda et al., 2009**).

Néanmoins, il n'existe pas de règle « un gène *HOX* pour un segment ou une fonction », et c'est davantage un groupe de gènes qui déterminent telle ou telle fonction. Ainsi il est difficile de déduire la fonction d'un seul gène à travers sa mutation notamment lorsque des phénomènes de compensation peuvent fausser l'interprétation phénotypique. C'est le cas des doubles mutants paralogues *hoxa9/hoxd9* chez les souris résultant en une altération de l'humérus et dont le phénotype est similaire au triple mutant *hox10* (*hoxa10/c10/d10*) (**Fromental-Ramain et al., 1996 ; Wellik et al., 2003**). Les souris *hoxa9<sup>+/-</sup>* ou *hoxa9<sup>-/-</sup>* sont viables et fertiles sans distinction phénotypique externe vis-à-vis des souris sauvages. Toutefois, les mutants *hoxa9<sup>-/-</sup>* présentent une paire de côtes supplémentaires correspondant à la transformation de la première vertèbre lombaire en vertèbre thoracique et suggérant ainsi l'implication de ce gène dans le développement du squelette (**Fromental-Ramain et al., 1996 ; Chen et al., 1997**).

En dehors du développement squelettique, d'autres tissus nécessitent la présence du facteur HOXA9 à l'exemple des reins ou du système hématopoïétique (**Dintilhac et al., 2004 ; Sauvageau et al., 1994 ; Magnusson, et al., 2007**).

## b. Hématopoïèse

D'un point de vue biologique, en dehors de son rôle dans l'embryogénèse pour l'établissement de l'axe antéropostérieur, les gènes *HOX* sont exprimés au niveau du système hématopoïétique, expression alors indépendante des règles de colinéarité spatio-temporelle (**Fig. 4**).

Le système hématopoïétique permet la formation de l'ensemble des cellules sanguines matures à partir de cellules souches (les CSHs) présentes exclusivement dans la moelle osseuse chez l'adulte. Cette rare population de cellules multipotentes, estimée à moins de 0,01% des cellules de la moelle osseuse, doit maintenir tout au long de la vie un équilibre homéostatique entre son auto-renouvellement et sa différenciation en multiples lignées hématopoïétiques (**Walasek et al., 2012**). 30 à 50 jours sont nécessaires à la division des CSHs chez la souris alors que les CSHs humaines se divisent approximativement tous les 175 à 350 jours. Cet équilibre phénotypique, oscillant entre la nécessité d'un autorenouvellement permanent et un renouvellement des cellules sanguines matures constant, dépend étroitement du patron d'expression de gènes régulés à la fois par des signaux extérieurs, des facteurs de transcription et des modifications épigénétiques (**Doulatov et al., 2012**). De nombreux facteurs de transcription sont associés au déterminisme des CSHs, notamment *HOXB4*. La surexpression par transduction rétrovirale du gène *hoxb4* au sein de CSHs murines intensifie leurs nombres (**Antonchuk et al., 2002**). Néanmoins, chez des modèles humains de CSHs CD34<sup>+</sup>, sa surexpression a un avantage numérique limité (2 à 4 fois plus) en comparaison aux modèles murins (**Amsellem et al., 2003**).

De manière générale, l'implication des facteurs *HOX* au cours de l'hématopoïèse normale a été déterminée et l'est encore à travers l'utilisation de modèle *in cellulo* et/ou *in vivo* traduisant une perte (knockout, siRNA...) ou un gain (activation, surexpression...) de fonction du gène au sein de cellules souches ou de progéniteurs hématopoïétiques comme résumé dans le **Tableau 1**. Certains gènes sont requis pour le maintien du statut « souche » ou « progéniteur » hématopoïétique ainsi que pour le potentiel prolifératif tels *HOXA9* et *HOXB4*. En effet le système hématopoïétique de souris invalidées pour le gène *hoxa9* (*hoxa9*<sup>-/-</sup>) montre une diminution du nombre de granulocytes et de lymphocytes circulants ainsi qu'une baisse des progéniteurs myéloïdes, lymphoïdes et érythroïdes (**Lawrence et al., 1997** ; **Magnusson et al., 2007**). A contrario, la surexpression de la protéine *hoxa9* dans la moelle osseuse murine donne lieu à l'expansion des CSHs avec une inhibition partielle de la différenciation des lymphocytes pré-B mais n'affecte en aucun cas le développement des lymphocytes T (**Thorsteinsdottir et al., 2002**). Ces données suggèrent ainsi un rôle précoce de cette protéine.

Gènes HOX	Gain de Fonction	Perte de fonction
<i>HOXA5</i>	- ↑ Progéniteurs Myéloïdes - Arrêt Différenciation Erythroïdes	- ↑ Progéniteurs Erythroïdes - ↓ Cellules Myélomonocytaires
<i>hoxa7</i>		- ↓ Progéniteurs Mégakaryocytaires / Erythroïdes - Réticulocytose - Thrombocytopénie
<i>hoxa9</i>	- ↑ Expansion CSHs - ↑ Prolifération Progéniteurs Myéloïdes - Arrêt Différenciation Erythroïdes - ↓ Différenciation Cellules pré-B	- ↓↓ CMP, GMP, CLP - ↓↓ précurseurs lymphoïdes - ↓↓ capacité de repopulation - ↓ nombre cellules / taille rate
<i>HOXA10</i>	- ↑↑ Cellules blastiques et Myélopoïèse - ↓ Différenciation Cellules pre-B - Arrêt Différenciation Erythroïde	
<i>hoxb3</i>	- Arrêt Différenciation Lymphocytes B et T	- ↓↓ Progéniteurs cellules B - ↓↓ nombre cellules moelle osseuse
<i>HOXB4 / hoxb4</i>	- ↑↑ Expansion CSHs	- ↓↓ nombres cellules / taille organes hématopoïétiques - ↓ CSHs / PHs - ↑ expression <i>hoxb</i>
<i>hoxb3/b4</i>		- ↓↓ CSHs / PHs
<i>hoxb6</i>	- ↑ Expansion CSHs - ↑ Prolifération précurseurs myéloïdes - ↓ Erythropoïèse / Lymphopoïèse	- ↑ Progéniteurs Erythroïdes précoces
<i>hoxc3</i>		- ↓ Progéniteurs Erythroïdes
<i>HOXC4</i>	- ↑ Précurseurs Myéloïdes - ↑ Progéniteurs Erythroïdes	
<i>hoxc8</i>		- ↓↓ Potentiel de formation de colonies Erythroïdes/Granulocytes/Macrophages

**Tableau 1: Récapitulatif des différentes études réalisées sur les fonctions des gènes *hox*.** Les conséquences, sur le système hématopoïétique, du gain ou de la perte de fonction du gène sont ainsi décrits dans le tableau. CSHs : Cellules Souches Hématopoïétiques ; CMP : Progéniteurs Myéloïdes Communs ; GMP : Précurseurs Granulocytes/Monocytes ; CLP : Précurseurs Lymphoïdes Communs ; PHs : Progéniteurs Hématopoïétiques (D'après **Argiropoulos et al., 2007**).

Bien que moins décrites, d'autres fonctions sont attribuées au facteur de transcription HOXA9 comme la promotion de l'angiogenèse via la régulation directe de l'expression du gène cible *EphB4* (**Bruhl et al., 2004**). Celui ci code pour un récepteur à domaine tyrosine kinase dont l'augmentation de l'expression active la migration des cellules endothéliales et la formation de vaisseaux. HOXA9 est également impliqué dans le développement du tractus urogénital au stade embryonnaire et son expression est maintenue chez l'adulte contribuant au développement des glandes mammaires (au cours de la lactation) et à la plasticité tissulaire de l'endomètre lors des cycles œstriens et des grossesses (**Taylor et al., 1997; Chen et al., 1999**).

*Etant donné le rôle crucial tenu par les protéines HOX, en particulier au sein du système hématopoïétique, c'est donc sans surprise que de multiples données expérimentales montrent l'existence d'une corrélation entre la dérégulation de l'expression de ces gènes et nombres de phénotypes leucémiques.*

#### 4. HOXA9 et la cancérogenèse

##### a. HOXA9 et Leucémies : Facteurs Pronostics ?

Le plus fréquent des gènes *HOX* étudié en cancérologie est le gène *HOXA9* étant donné son implication croissante dans les leucémies. Les premières études de souris BXH-2, modèle murin développant spontanément des LAMs via une intégration rétrovirale endogène, ont montré la surexpression des gènes *hoxa9*, *hoxa7* et de leur cofacteur *meis1* traduisant une intégration au sein de leurs locus (Nakamara et al., 1996a ; Nakamara et al., 1996b). En effet, parmi plus de 6800 gènes évalués, *HOXA9* est le seul gène dont la corrélation entre sa surexpression et le faible pronostic (en terme d'échec aux traitements) de patients atteint de LAM est la plus significative justifiant ainsi son statut de marqueur pronostic (Golub et al., 1999). Plusieurs LAM défavorables ou ayant des statuts cytogénétiques intermédiaires présentent des niveaux d'expression de gènes *HOX* similaires à celui mesurée au sein de cellules CD34<sup>+</sup> normales suggérant un lien étroit entre cette néo-expression et le phénotype indifférenciée des cellules leucémiques. A l'inverse, la faible expression du gène *HOXA9* est liée à un meilleur pronostic en terme de réponse aux thérapies (Andreeff et al., 2008). L'altération de son expression n'est pas un phénomène moléculaire isolé et est souvent concomitante à d'autres altérations telles les mutations de tyrosines kinases (FLT3...) également de faible pronostic dans des cas de LAM.

Depuis cette implication n'a cessé d'être démontrée autant vis-à-vis de son potentiel oncogénique au sein des LAM mais aussi dans d'autres groupes de leucémies. La dérégulation de son expression est dépeinte de deux manières, l'une où il devient anormalement surexprimé et l'autre où le gène subit une translocation réciproque t(7;11) (p15;15) fusionnant avec le gène codant pour la nucléoporine NUP98.

## b. Leucémies et HOXA9 : Altération fréquente de son expression

### *i. Syndrome myélodysplasique*

Le syndrome myélodysplasique (SMD) est une pathologie hétérogène caractérisée par une dysplasie (anomalie des cellules), une hématopoïèse inefficace et une cytopénie (déficience en éléments cellulaires du sang). Ce syndrome peut être initial (SMD « *de novo* ») ou être le résultat de chimiothérapies ou radiothérapies administrées antérieurement (SMD-t: SMD lié à une thérapie). Malheureusement, 20 à 40 % des cas de SMD évoluent en LAM (Gale et al., 2009). D'un point de vue moléculaire, de nombreuses altérations génétiques corrèlent avec la surexpression des gènes *HOX* dont certains comme *HOXA9*, *HOXA11* et *HOXD13* sont eux-mêmes impliqués dans des translocations avec la nucléoporine *NUP98* (Gough et al., 2011). D'autres mécanismes moléculaires peuvent indirectement moduler l'expression des gènes *HOX* comme l'illustre les mutations du gène *ASXL1* (*Addition of Sex Combs-Like 1*, codant pour une protéine du groupe PcG) détectées dans 15 à 25% des patients atteints de SMD et 10 à 15% de néoplasmes myéloprolifératifs et LAM, et associées à une survie défavorable. Ces mutations aboutissent indirectement à une perte du marqueur répressif épigénétique H3K27me3 au sein des promoteurs du groupe de gène *HOXA* et donc à une surexpression de ces derniers en particulier *HOXA9* (Abdel-Wahab et al., 2012). D'autres mutations touchant les gènes *IDH1* et *IDH2* (*isocitrate deshydrogenase 1 and 2*) présentent dans 4 à 12% des SMD (les mutations *IDH1* étant associées à un mauvais pronostic) peuvent contribuer aussi à la dérégulation de leur expression en interférant avec la fonction des histones déméthylases causant l'augmentation du marqueur épigénétique H3K79me2 favorable à une chromatine transcriptionnellement active (Xu et al., 2011).

### *ii. Leucémie aigue myéloïde*

Les LAM sont caractérisées par une multiplication incontrôlée de blastes qui envahissent dans un premier temps la moelle osseuse (insuffisance médullaire) puis dans la circulation sanguine, et par voie de conséquence une baisse de la production de cellules sanguines matures et fonctionnelles. Cette pathologie peut survenir à tout âge, néanmoins seuls 25% des cas sont diagnostiqués avant 25 ans et l'âge moyen lors du diagnostic est de 65 ans. Cette pathologie est souvent associée à deux altérations génétiques majeures distinguant ainsi les LAM de classe I et les LAM de classe II. Le premier groupe est caractérisé par des mutations impactant les voies de signalisation proliférative et la prolifération des CSHs ou des précurseurs. Le plus souvent ce sont les voies de signalisation impliquant des kinases qui sont les plus touchées tels FLT3, KIT, NRAS/KRAS et JAK/STAT. Le second groupe fait référence à l'altération de gènes codant pour des facteurs de transcription hématopoïétiques dont la protéine oncogène résultante mène à un blocage de la différenciation hématopoïétique et confère aux précurseurs hématopoïétiques des propriétés d'autorenouvellement

(Kelly et al., 2002). Néanmoins, les LAM restent très hétérogènes autant d'un point de vue morphologique, cytogénétique et moléculaire que pronostic. L'aspect cytogénétique et moléculaire est à l'heure actuelle le plus fort des facteurs pronostics permettant de classifier les LAM en trois groupes distincts selon le niveau de gravité: **1.** LAM avec les translocations t(15;17) (PML-RAR $\alpha$ ), t(8;21) (AML1-ETO) ou inv(16) (inversion du chromosome 16) caractérisée par un pronostic favorable ; **2.** LAM (40-50% des cas) avec un caryotype normal (LAM-CN) qui fait référence à un pronostic intermédiaire et **3.** LAM (10 à 20% des cas) ayant un caryotype complexe dont le pronostic est défavorable (Grimwade et al., 1998 ; Buccisano et al., 2012). A cette classification moléculaire s'est ajouté le profil d'expression génique de patients atteints de LAM. Concernant les gènes *HOX* et leurs cofacteurs, leur surexpression (*HOXA4*, *HOXA9*, *HOXA10*, *PBX3* et *MEIS*) corrèle davantage avec les groupes cytogénétiques à caryotype normal et complexe (Bullinger et al., 2004).

Parmi ces facteurs de transcription, *HOXA9* est l'un des plus touchés avec une surexpression dans plus de 60% des LAM (Fig. 12). Certaines altérations génétiques décrites pour les SMD sont détectées dans les LAM avec pour conséquence la surexpression du facteur *HOXA9*. Les mutations du gène de la nucléophosmine 1 (*NPM1*) représentent les altérations les plus communes des LAM de l'adulte : plus de 35% des LAM totales et 55% des LAM-CN mais moins fréquences dans les LAM pédiatriques (8 à 10% des LAM et ~15% des LAM-CN) (Falini et al., 2005 ; Thiede et al., 2006 ; Brown et al., 2007). Protéine impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires dont la duplication du centrosome, ses mutations corrèlent souvent avec la surexpression des gènes *HOXA4*, *A6*, *A7* et *A9* mais aussi ceux du groupe *HOXB2*, *B3*, *B5* et *B6*. La surexpression du cofacteur *MEIS1* s'ajoute aussi à cette signature transcriptomique (Mullighan, et al., 2007).

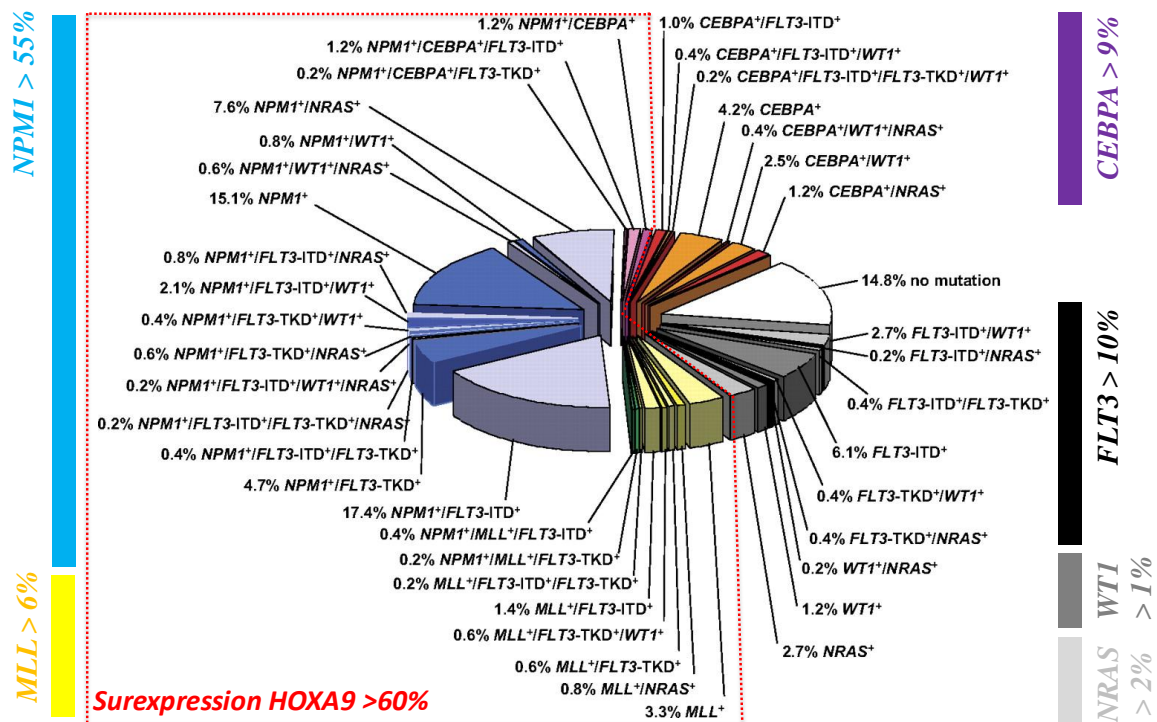


Figure 12: Diagramme illustrant l'hétérogénéité moléculaire des LAMs à caryotype normal basée sur la détection des altérations des gènes *NPM1* (nucléophosmine 1), *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)- $\alpha$ ), *MLL* (mixed-lineage leukemia), *FLT3* (*fms*-related tyrosine kinase 3, ITD: Internal Tandem Duplication et mutations au niveau des codons TKD: Tyrosine Kinase Domain D835 et I836) et *WT1* (Wilms' tumor suppressor gene 1). Les données proviennent d'une analyse mutationnelles sur 485 patients atteint de LAM de caryotype normal (D'après Döhner et al., 2010).

De manière similaire, la translocation t(8;16) *MYST3-CREBBP* et les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* (observées dans ~20% des LAM) sont associées à une surexpression des gènes *HOXA* (**Camós et al., 2006 ; Xu et al., 2011**). De multiples partenaires protéiques fusionnant avec le gène *NUP98* (ex : *NSD1*, *PMX1*, *JARID1A*, *PHF23*...) sont décrits dans les LAM en lien avec une surexpression des gènes *HOXA5*, *A7*, *A9* et *A10*. En particulier, dans le cas de *NUP98-NSD1* (t(5;11), observée dans 5% des LAM, la répression de l'expression des gènes du locus *HOXA* est inhibée via le maintien de marqueurs épigénétiques favorables à la transcription du locus (**Wang et al., 2007; Gough et al., 2011**). Ce même maintien transcriptionnel a récemment été décrit pour les LAM associées à un polymorphisme nucléotidique du gène codant pour le répresseur transcriptionnel *GFI1* (*Growth Factor Independant 1*) et ayant pour conséquence la modification d'une sérine en une asparagine en position 36. Ce polymorphisme détecté dans 11% des LAM aboutit à l'expression de la protéine *GFI136N* qui perd sa capacité d'interaction sur les promoteurs des ses gènes cibles (dont *HOXA9*, *MEIS1*, *PBX1* font partis) et ne peut alors initier les modifications des histones nécessaires à une répression transcriptionnelle (**Khandanpour et al., 2012**).

L'expression aberrante de *CDX2* et *CDX4* est également un événement fréquent (respectivement 90% et 25% des LAM) et est associée à la dérégulation des gènes *HOXA5*, *A7*, *A9* et *A10*) et *HOXB3*, *B6*, *B8* (**Bansal et al., 2006 ; Rawat et al., 2008, 2012**). En effet, la surexpression de *CDX2*, par transduction rétrovirale au sein de progéniteurs hématopoïétiques murins conduit à une augmentation de l'expression des gènes *hox* leucémogènes tels *hoxa7*, *hoxa9* ou encore *hoxa10* et est capable d'induire des LAM chez des modèles murins (**Rawat et al., 2008, 2012**).

Enfin, les réarrangements du gène *MLL* ainsi que ses duplications induisent la surexpression des gènes *HOX* (paragraphe **A.4.d**).

### iii. LAL

La dérégulation des gènes *HOX* a également été décrite au sein de leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) de type B ou T (LAL-B ou LAL-T) en particulier lorsque des translocations du gène *MLL* sont impliquées. Tel est l'exemple des LAL-T et LAL-B arborant la protéine de fusion *MLL-ENL* corrélant avec la surexpression des gènes *HOXA9* et *HOXA10* ainsi que leur cofacteur *MEIS1* ou de la fusion *MLL-AF4* (au sein des LAL-B) avec la surexpression des gènes *HOXA5*, *HOXA9* et *MEIS1* (**Ferrando et al., 2003 ; Rozovskaia et al., 2001 ; Krivtsov et al., 2008**). Ces gènes sont également surexprimés dans des LAL-T caractérisées par la translocation t(10;11) *CALM-AF10* (*Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukemia-ALL Fused gene from chromosome 10*) ou le résultat de l'apparition de la protéine chimère *HOX-TCR* au sein de LAL-T, où les gènes *HOX* (en particulier ceux du groupe A) sont impliqués directement dans des fusions géniques avec le gène *TCR* (*T Cell Receptor* codant pour le récepteur TCR des lymphocytes T) (**Dik et al., 2005 ; Soulier et al., 2005**).



Des inversions du chromosome 7 (*inv(7)p15q34*) induisent également une surexpression des gènes *HOXA9* et *HOXA10* au sein de LAL-T (**Speleman et al., 2005**).

La dérégulation des gènes *HOX* de classe II n'est pas en reste au sein des LAL comme l'illustre la translocation *t(1;19)* où le gène *E2A* est fusionné au gène *PBX1*. Le facteur de transcription de fusion généré *E2A-PBX1* est présent dans 3 à 5% des LAL-B et 25% des LAL-pré-B pédiatriques (**O'Neil et al., 2007**). Cette fusion corrèle à la surexpression de gènes du groupe *hoxa*, notamment *hoxa9* dont sa collaboration dans la survenue du phénotype leucémique de type T a été démontrée *in vivo* (**Bijl et al., 2005 ; Bijl et al., 2008**). De même, l'expression aberrante des gènes *HOX11* (translocations *t(10;14)* ou *t(7;10)*) et *HOX11L2* (translocation *t(5;14)*) est retrouvée respectivement dans 5% des LAL-T pédiatriques / 30% LAL-T adultes et 20% des LAL-T de l'enfant / 5% LAL-T adultes (**Teitell et al., 2009**). Comme pour *HOXA9*, la surexpression de *MEIS1/2* est conjointe à celle de *HOX11* dans certaines LAL-T (**Milech et al., 2010**).

#### *iv. Myélomes Multiples*

Le myélome multiple (MM) correspond à une leucémie en règle générale incurable touchant les cellules B et caractérisée par une prolifération incontrôlée des plasmocytes au sein de la moelle osseuse. En termes de mortalité, cette pathologie est la deuxième hémopathie maligne devant les leucémies aigues et correspond à elle seule à approximativement 10% des hémopathies malignes (**Kyle et al., 2008**). L'expression des gènes du locus *HOXA* est dérégulée chez presque 10% des patients atteints de MM (**Hudlebusch et al., 2004**). Elle semble étroitement liée, notamment pour l'expression de *HOXA9*, à un sous-type de MM caractérisée par une absence de translocation de l'immunoglobuline IgH. L'extinction de son expression par shRNA suffit à réduire la survie de cellules de MM définissant ainsi *HOXA9* comme oncogène indispensable au maintien tumoral des MM (**Chapman et al., 2011**). Dans ce contexte pathologique, la dérégulation de l'expression du facteur *HOXA9* pourrait s'expliquer, d'une part, par la faible présence ou l'absence du marqueur répressif H3K27me3 décrit dans plusieurs lignées de MM et, d'autre part, par la présence d'amplifications du locus *HOXA* chez plus de 5% des patients atteints de MM (**Chapman et al., 2011**).

#### *v. Leucémies mégakaryocytaires*

Les leucémies aigues mégakaryocytaires (LAMK) représentent un sous type hétérogène de LAM souvent associé à un mauvais pronostic et plus fréquent chez l'enfant que chez l'adulte. Ces leucémies présentent nombres d'altérations génétiques et phénotypiques dont la surexpression des gènes *HOX*. En effet, un large groupe de LAMK, n'étant pas associé au syndrome de Down (trisomie 21), présente une surexpression des gènes *HOXA9*, *HOXA10* et du cofacteur *MEIS1* et celle-ci est conjointe à la description d'altérations génétiques touchant les gènes *MLL* ou *NUP98* (**Thiollier et al., 2012**).

### c. Cofacteurs d'HOXA9: des accélérateurs de leucémogénèse

D'un point de vue moléculaire, HOXA9 agit avec de nombreux cofacteurs et la dérégulation de l'expression de ces mêmes partenaires est fréquemment décrite dans les leucémies, accentuant pour certains la pathologie comme pour MEIS1. En effet, HOXA9 seul est faiblement oncogénique et plus de 90% des leucémies chez les souris BXH-2 qui sont associées à une surexpression de ce facteur présentent, comme second site d'intégration viral, le locus *meis1* (Nakamura et al., 1996a). Surexprimé au sein de cellules de moelle osseuse murine, *hoxa9* peut induire une LAM après une période de latence de plusieurs mois (>6mois) alors qu'en présence de *meis1a* cette période est drastiquement réduite et suffisante pour la transformation des cellules de moelle osseuse (~67 jours). Cette valeur moyenne est au moins deux fois inférieure à celle nécessaire pour la protéine de fusion leucémogène *e2a-pbx1* lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules primaires de moelle osseuse (Kroon et al., 1998). En effet MEIS1 est souvent surexprimée de manière concomitante avec HOXA7 et HOXA9 suggérant un mode d'action coopératif dans le développement des leucémies (Fig. 13) (Lawrence et al., 1999 ; Nakamura et al., 1996c).

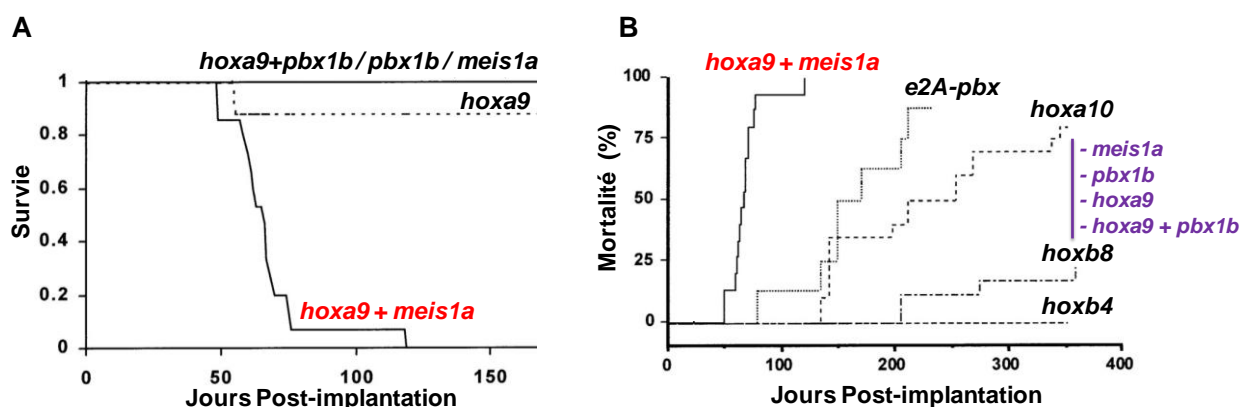


Figure 13: A. Courbe de survie de souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse transduites par rétrovirus permettant la surexpression de *hoxa9*, *pbx1b*, *meis1a*, *hoxa9+pbx1a* ou *hoxa9+meis1a*. B. Comparaison des courbes de pourcentages de mortalité de souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse transduites par différents rétrovirus permettant la surexpression de *hoxa9+meis1a* (courbe de survie présentée en A), *e2a-pbx*, *hoxa10*, *hoxb8* ou *hoxb4*. Chez des souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse surexprimant *meis1a*, *pbx1b*, *hoxa9* ou *hoxa9+pbx1b* (violet), l'incidence des leucémies est plus faible que celle observée pour *hoxa10* (D'après Kroon et al., 1998).

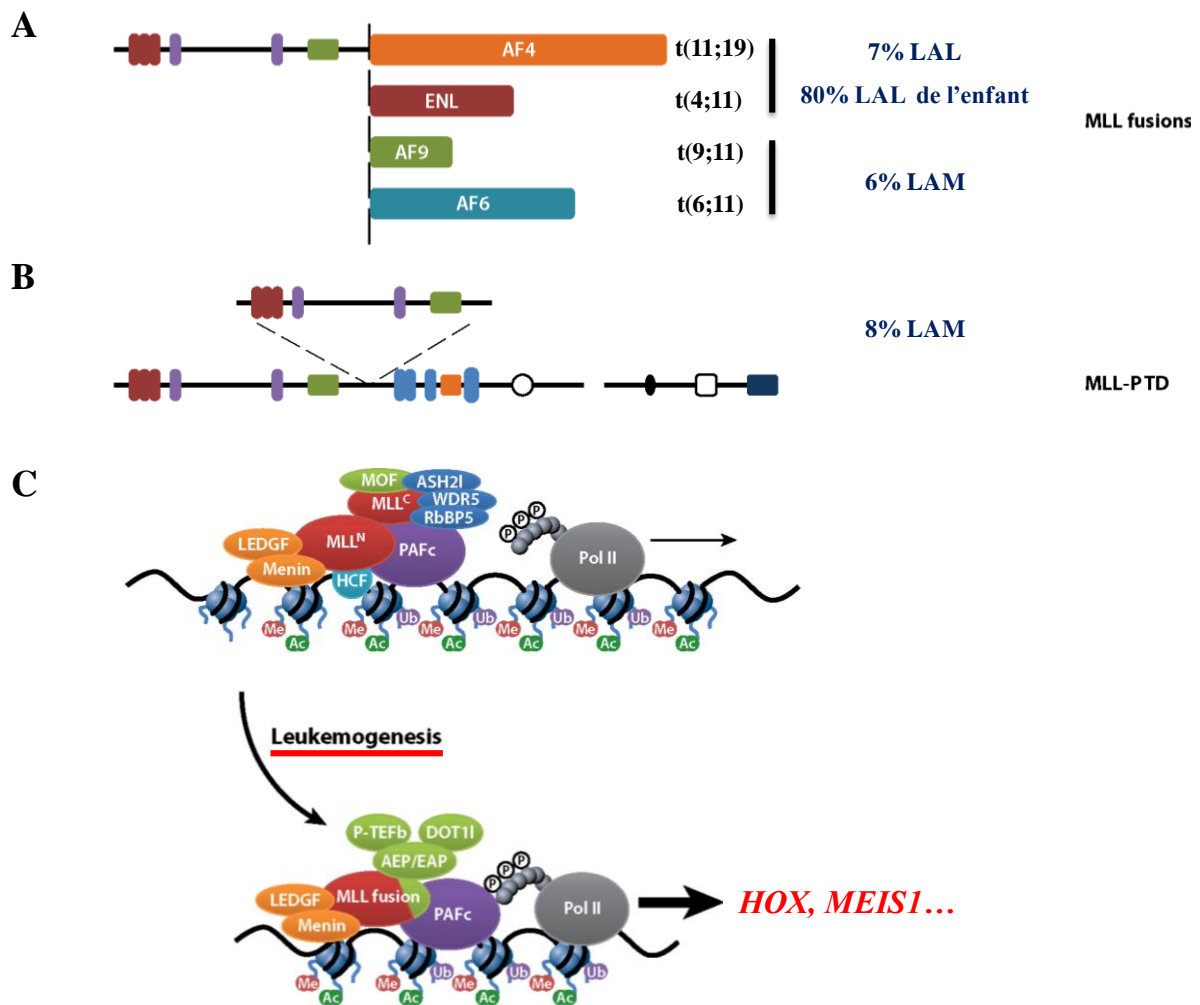
Récemment, Li et al., ont mis en évidence la surexpression concomitante et exclusive du cofacteur *PBX3* (et non *PBX1* ni *PBX2*) avec *HOXA9* dans divers sous-types de leucémies en particulier celles dont le caryotype anormale est caractérisé par des réarrangements du gène *MLL* et de pronostic défavorable (Liu et al., 2012a). Essentiel au caractère transformant de ces leucémies, sa déplétion suffit à réduire le potentiel transformant et immortalisant de progéniteurs de moelle osseuse de souris transduits par le gène de fusion *MLL-AF9*. De même, *PBX3* est considéré comme un accélérateur de

leucémogénèse puisque sa co-surexpression avec *hoxa9* chez des souris réduit significativement le temps de survenue des LAM (Li et al., 2012b).

d. Surexpression des gènes *HOX* et réarrangements *MLL*

Comme étayé précédemment pour les MM, les modifications épigénétiques peuvent contribuer à la réactivation des gènes *HOX* à l'instar des leucémies associées à des remaniements du gène *MLL*. D'un point de vue moléculaire, ces altérations génétiques ont comme point commun la fusion de la partie aminoterminal de la protéine MLL, comprenant le domaine de fixation à l'ADN AT-hook, à la partie carboxyterminale d'un partenaire protéique variable. La perte du domaine SET fait la particularité des protéines de fusion MLL associées aux leucémies, ainsi que la perte de la région PHD/bromodomaine interagissant avec ASB2 traduisant ainsi une absence de protéolyse de la protéine MLL via sa mono-ubiquitination (Muntea et al., 2010). Toutefois, l'oncogénicité des fusions MLL n'est pas seulement liée à une perte de domaines fonctionnels mais implique également ses divers partenaires dont la plupart sont impliqués dans un complexe permettant l'élongation de la transcription (Fig. 14).

Au niveau transcriptomique, ces altérations génétiques présentent souvent des surexpressions des gènes du groupe *HOXA* notamment *HOXA4*, *A5*, *A7*, *A9* et *A10*. En effet la surexpression du facteur *HOXA9* est observée au sein de LAL et de LAM de sous-types MLL associée à un mauvais pronostic et dépeint comme des leucémies agressives (Armstrong et al., 2002 ; Krivsov et al., 2006). Tel est l'exemple des leucémies présentant la fusion *MLL-AF9*, où *AF9* (*ALL fused gene from chromosome 9*) codant pour une protéine nucléaire, associées à la surexpression des gènes *HOXA5*, -9 ou -10 (Krivsov et al., 2006). Impliqué dans plus de 70 translocations différentes, ces réarrangements constituent 5% des cas de LAM et 22% des LAL (Krivsov et al., 2007; Argiropoulos et al., 2007). Représentant plus de 70% des leucémies de l'enfant en bas âge (< 2 ans), ce sous-type de leucémies est de très mauvais pronostic: les LAL de sous-type MLL de l'enfant sont caractérisées par un taux de survie globale inférieur à 50%. Chez l'adulte, ces remaniements sont fréquemment observés dans des leucémies secondaires découlant d'un traitement par des inhibiteurs de topoisomérases, tels que des dérivés d'anthracyclines. A l'altération de l'expression de *HOXA9* s'ajoute l'accélérateur de leucémogénèse *MEIS1* dont la surexpression est souvent concomitante à celle d'*HOXA9* dans nombres de leucémies associées à des réarrangements *MLL* et qui dans certains cas est essentielle à l'induction et au maintien de la leucémogénèse médiés par les fusions MLL (Armstrong et al., 2002 ; Ferrando et al., 2003 ; Wong et al., 2007).



**Figure 14: A. Protéines de fusions résultant du remaniement du gène *MLL*.** Les translocations chromosomiques impliquant le gène *MLL* aboutissent à des protéines chimères de fusions *MLL* incluant la partie aminoterminal de *MLL* jusqu'à la région BCR suivit par un des diverses partenaires indiqués (AF4: *ALL-fused gene for chromosome 4*, ENL: *eleven nineteen leukemia*, AF9, AF6...). **B. Duplications *MLL*.** Le gène *MLL* est également sujet de des duplications internes et partielles en tandem (*MLL-PTD*). **C. Protéines de fusions *MLL* et leucémogénèse.** Les protéines de fusions *MLL* résultantes peuvent alors recruter des complexes d'activation transcriptionnelle selon le partenaire. Ces complexes peuvent contenir le facteur d'élongation P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*), requis pour la phosphorylation du domaine carboxyterminale de l'ARN Pol II. Pour certaines fusions (tel que *MLL-AF10*) l'histone méthyltransférase (H3K79) nommée DOT1L (*Disruptor of telomeric silencing H3 methyltransferase*) est par ailleurs recrutée accentuant l'activité transcriptionnelle. AEP/EAP: AF4/ENL/P-TEFb / P-TEFb/AF4/ENL (D'après Muntea et al., 2012).

Récemment, He et al. ont montré l'implication de la forme tronquée du facteur *HOXA9*, *HOXA9T* (dépourvu de l'homéodomaine) dans la transformation de progéniteurs hématopoïétiques et que sa surexpression est associée aux leucémies arborant des réarrangements *MLL* (He et al., 2012).

Contrairement aux fusions *MLL*, des duplications partielles en tandem (*MLL-PTD*) de ce même gène ont été identifiées uniquement dans les LAM et les SMD. Initialement découvert dans une LAM *de novo* caractérisée par un caryotype normal ou une trisomie 11, cette altération génétique consiste en une duplication partielle et en tandem dans la région 5' de certains exons du gène *MLL* dans le sens 5'-3' (Caligiuri et al., 2004). 4 à 8% des LAM présentent ces *MLL-PTD* souvent associées à un mauvais pronostic (Dohner et al., 2002). Ces altérations sont aussi associées à la dérégulation de l'expression

de certains gènes *hox* comme le montre des modèles murins où la présence de *MLL-PTD* corrèle avec la surexpression des gènes *hoxa7*, *hoxa9* et *hoxa10* (Dorrance et al., 2006).

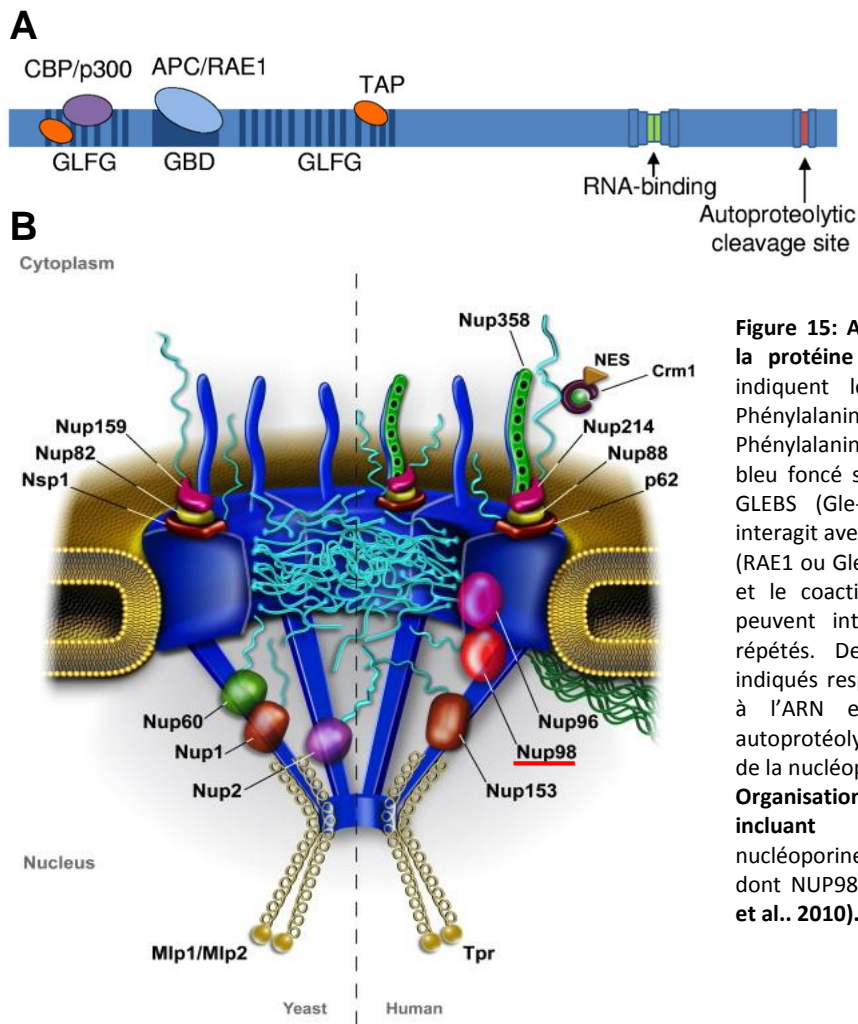
En 2009, Armstrong et al. ont clairement démontré la nécessité d'une surexpression du facteur HOXA9 pour le maintien et la survie de cellules leucémiques de sous-types MLL. Son inhibition, *in cellulo* et *in vivo*, suffit à réduire le potentiel leucémogène du facteur MLL (Faber et al., 2009).

***HOXA9 est donc un élément clé indispensable au phénotype leucémique MLL et constitue ainsi une cible thérapeutique de choix pour les leucémies associée à des remaniements du gène MLL.***

#### e. Translocation impliquant HOXA9 : NUP98-HOXA9

Le gène *NUP98* est un gène ubiquitaire codant pour la nucléoporine NUP98 (de 98 KDa) constitutive du complexe du pore nucléaire. Ce gène est constitué de plusieurs domaines d'interaction protéines/protéines riches en sites FG/GLFG (Phénylalanine-Glycine /Glycine-Leucine-Phénylalanine-Glycine). Parmi ces sites, certains sont reconnus par des coactivateurs transcriptionnels tels CBP/p300, par le facteur d'exportation de l'ARNm TAP ou RAE1 sur le site GLEBS (*Gle-2 binding sequence*) exclusif à ce dernier. La partie carboxyterminale contient un domaine d'interaction à l'ARN et un site d'autoprotéolyse nécessaire à sa maturation protéique (Fig. 15.A.). Fonctionnellement, le complexe multi-protéique du pore nucléaire assure le trafic bidirectionnel des protéines et des ARNs entre le cytoplasme et le noyau (Fig. 15.B.) (Iwamoto et al., 2010). Outre son statut de membre du pore nucléaire et de protéine chaperone dans le transport et l'export de particules biologiques, la protéine NUP98 peut se localiser au sein de « corps nucléaires GLFG » et sa motilité cellulaire dépendrait de l'activité transcriptionnelle médiée par l'ARN polymérase (Griffis et al., 2002 ; Capelson et al., 2010). De plus, cette protéine interagit avec la chromatine sur des sites spécifiques et son niveau d'expression influe considérablement sur l'activité de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la différenciation (Capelson et al., 2010 ; Kalverda et al., 2010).

L'implication de la protéine de fusion NUP98-HOXA9 dans les hémopathies malignes fut mise en évidence lors de la caractérisation de la translocation t(7;11)(p15; p15.4) chez des patients atteints de LAM: la région aminoterminal de la protéine NUP98 incluant les sites FG/GCFG est fusionnée avec la région carboxyterminale de HOXA9 comportant l'homéodomaine (Nakamura et al., 1996b ; Borrow et al., 1996). Depuis, d'autres translocations incluant NUP98 ont été décrites dont certaines impliquent divers membres de la famille des gènes *HOX* (Fig. 16.B). Dans tous les cas, la protéine chimère résultante conserve les séquences répétitives de type FG/GLFG et l'homéodomaine des protéines HOX (Gough et al., 2011).



**Figure 15: A. Représentation schématique de la protéine NUP98.** Les traits bleus foncés indiquent les motifs GLFG (ou FG/GLFG : Phénylalanine-Glycine/Glycine-Leucine-Phénylalanine-Glycine) répétés et le rectangle bleu foncé schématise le domaine de fixation GLEBS (Gle-2 binding sequence, GBD) qui interagit avec le facteur d'exportation des ARNs (RAE1 ou Gle-2). Le cofacteur transporteur TAP et le coactivateur transcriptionnel CBP/p300 peuvent interagir avec les motifs GLFG/FG répétés. De couleur verte et rouge sont indiqués respectivement les sites d'interaction à l'ARN et d'autoprotéolyse. Ce clivage autoprotéolytique est nécessaire à l'intégration de la nucléoporine au sein du pore nucléaire. **B. Organisation structurale du pore nucléaire incluant NUP98 (rouge).** Plusieurs nucléoporines composent le pore nucléaire dont NUP98 associé à NUP96 (D'après Köhler et al.. 2010).

En termes d'incidence, l'étude du Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH) évalue à 35% la part des patients ayant une hémopathie maligne associée à une anomalie de la région 11q15, présentant des fusions NUP98. Au sein des LAM, les fusions impliquant NUP98 sont relativement rare et constitue 1 à 2 % des cas (Romana et al., 2006). Le plus commun des partenaires est HOXA9, où la fusion résultante est associée chez des patients atteints de LAM à faible pronostic à la fois en terme de survie globale et de rechute (Chou et al., 2009). Par ailleurs, plusieurs fusions NUP98 (tel NUP98-HOXD13, -NSD1, -JARID1A, -PHF23...) corréleraient avec la surexpression de HOXA9 qui dès lors est reliée à un faible pronostic dans les LAM (Pineault et al., 2003 ; Wang et al., 2007 ; Wang et al., 2009 ; Golub et al., 1999 ; Andreeff et al., 2008). Hormis les LAM, cette même altération fut détectée dans les SMD ainsi que des LMC (Hatano et al., 1999 ; Wong et al., 1999 ; Ahuja et al., 2001). En effet, NUP98-HOXA9 a été observé au sein de LMC en crise blastique (forme agressive de la LMC qui aboutit à un arrêt de la différenciation) et dont la surexpression du facteur HOXA9 module directement l'expression de la protéine Musashi-2 nécessaire au développement de cette crise (Ito et al., 2010).

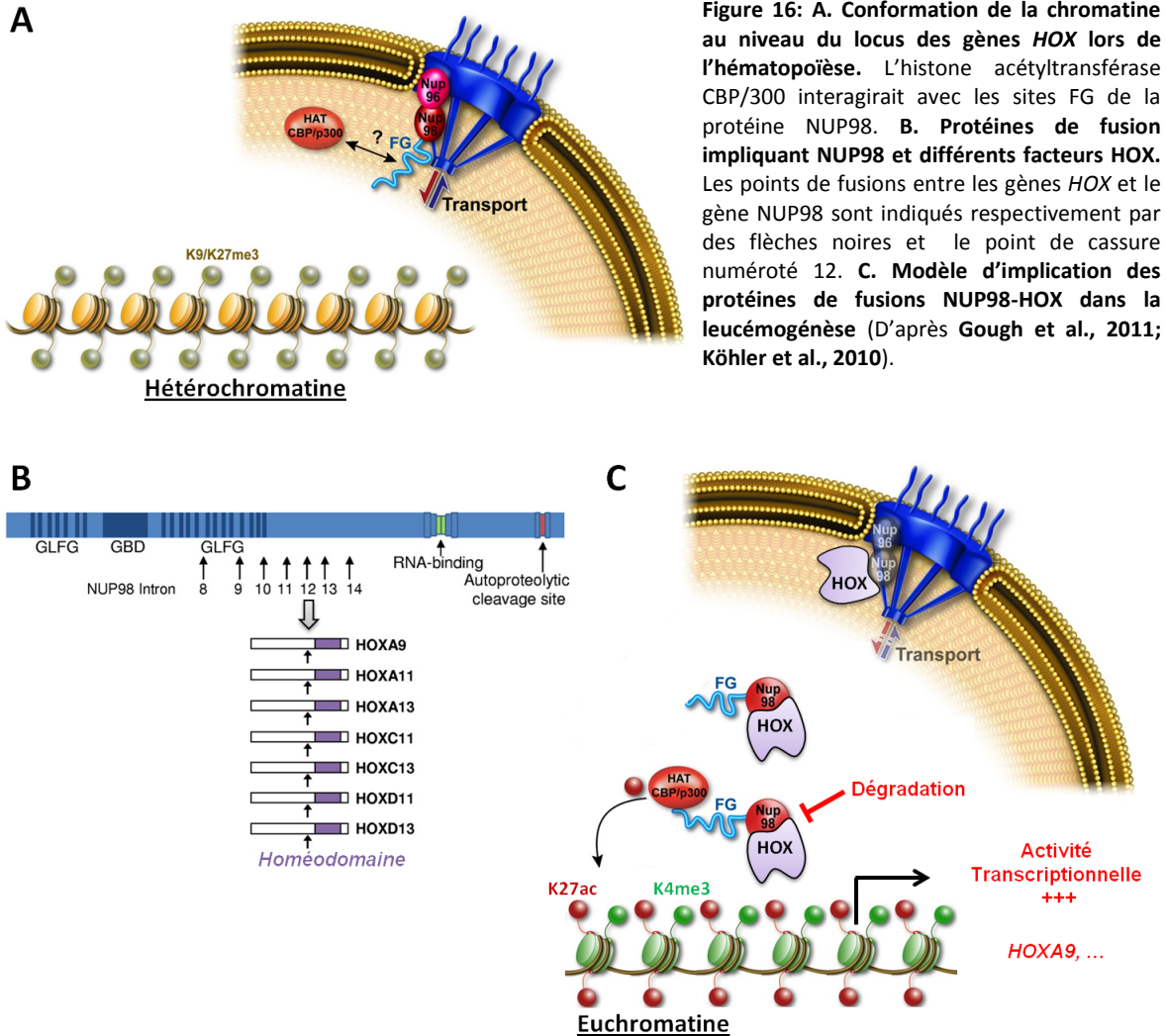


Figure 16: A. Conformation de la chromatine au niveau du locus des gènes *HOX* lors de l'hématopoïèse. L'histone acétyltransférase CBP/300 interagirait avec les sites FG de la protéine NUP98. B. Protéines de fusion impliquant NUP98 et différents facteurs HOX. Les points de fusions entre les gènes *HOX* et le gène NUP98 sont indiqués respectivement par des flèches noires et le point de cassure numéroté 12. C. Modèle d'implication des protéines de fusions NUP98-HOX dans la leucémogénèse (D'après Gough et al., 2011; Köhler et al., 2010).

Par la suite, de nombreuses données expérimentales ont mis en avant le potentiel leucémogène détenu par ces protéines de fusion et notamment le lien étroit avec HOXA9. Dans la plupart des modèles murins, l'introduction de la protéine chimère NUP98-HOXA9 induit de manière progressive l'apparition de syndrômes myéloprolifératifs évoluant en LAM après une période de latence (de 230 à 450 jours) (Kroon et al, 2001 ; Iwasaki et al., 2005 ; Moore et al., 2007). Et comme pour les modèles HOXA9, l'addition du cofacteur MEIS1 réduit drastiquement ce temps de latence à 142 jours (Kroon et al, 2001).

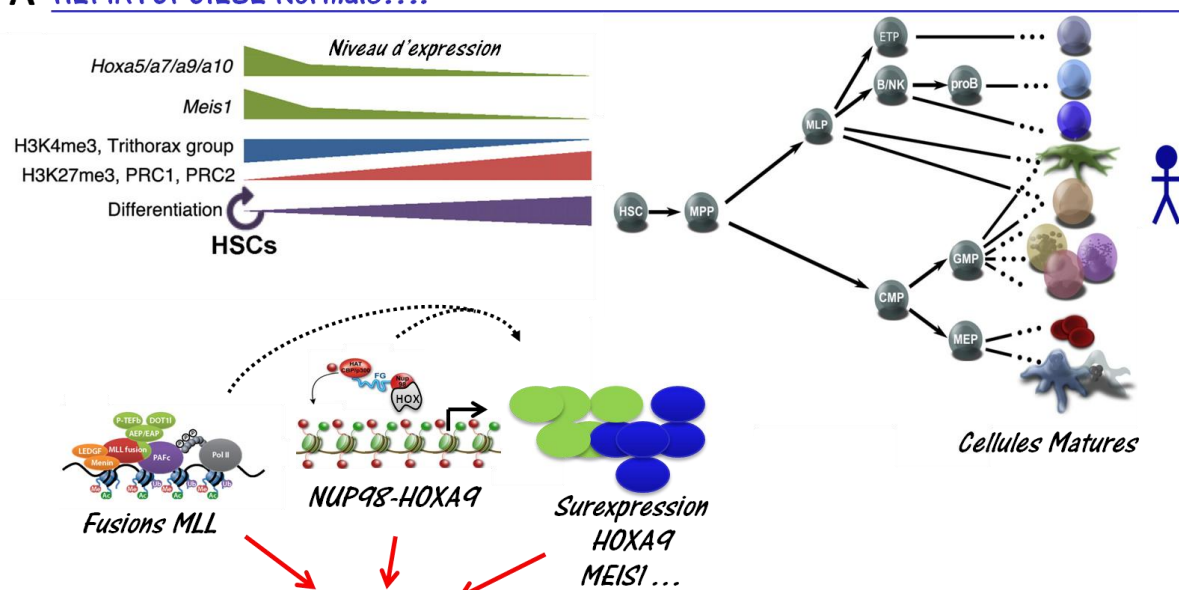
Dans ce contexte pathologique et selon les modèles mécanistiques décrits, la protéine de fusion NUP98-HOXA9 interagirait directement avec la chromatine à travers l'homéodomaine conservé du facteur HOXA9 où, via le recrutement du coactivateur transcriptionnelle CBP/p300 (une histone acétyl transférase), le locus du gène cible (tel *HOXA9*) est alors acétylé, favorable à une conformation transcriptionnelle active (Fig. 16.C) (Kasper et al., 1999 ; Yung et al., 2011). Ainsi, l'expression du gène n'étant soumise à aucune répression physiologique, elle est dérégulée ce qui aboutit à la fois à l'induction de la prolifération et au blocage de la différenciation de CSHs (Pineault et al., 2004 ; Takeda et al., 2006). Par ailleurs, l'activité leucémogène de NUP98-HOXA9 s'explique aussi par la

production d'un facteur de transcription aberrant dont l'activité transcriptionnelle, dépendante du domaine de fixation à l'ADN de HOXA9, est plus importante que celle de la protéine HOXA9 seule (Ghannam et al., 2004). Outre l'aspect transcriptionnel, la contribution au phénotype leucémogène serait en partie due au maintien de la stabilité de la protéine chimère NUP98-HOXA9 dont le temps de demi-vie est augmenté d'un facteur 3 par rapport à celle du facteur HOXA9 seul (Calvo et al., 2002). Cette stabilité protéique a pour origine la résistance à l'activité enzymatique de l'ubiquitine ligase CUL-4A capable en condition physiologique de médier la protéolyse de HOXA9 (Fig. 16.C) (Zhang et al., 2003). La protéine de fusion NUP98-HOXA9 de par son activité constitue alors un des mécanismes par lequel l'expression des gènes *HOX*, et en particulier *HOXA9*, est maintenue dans le phénotype leucémique.

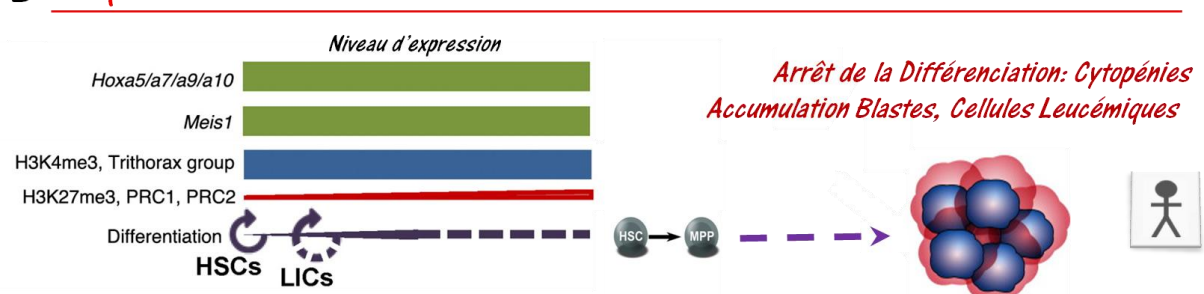
### 5. Leucémies : gènes cibles et domaine d'interaction à l'ADN

Ainsi, la dérégulation de l'expression des gènes *HOX*, notamment *HOXA9*, est souvent associée au phénotype leucémique via leur surexpression (altérations épigénétiques, des facteurs régulant son expression...), la surexpression de cofacteurs (*MEIS1*...) ou encore à travers la formation de protéines chimères (NUP98-HOXA9) (Fig. 17).

#### A HEMATOPOIESE Normale....



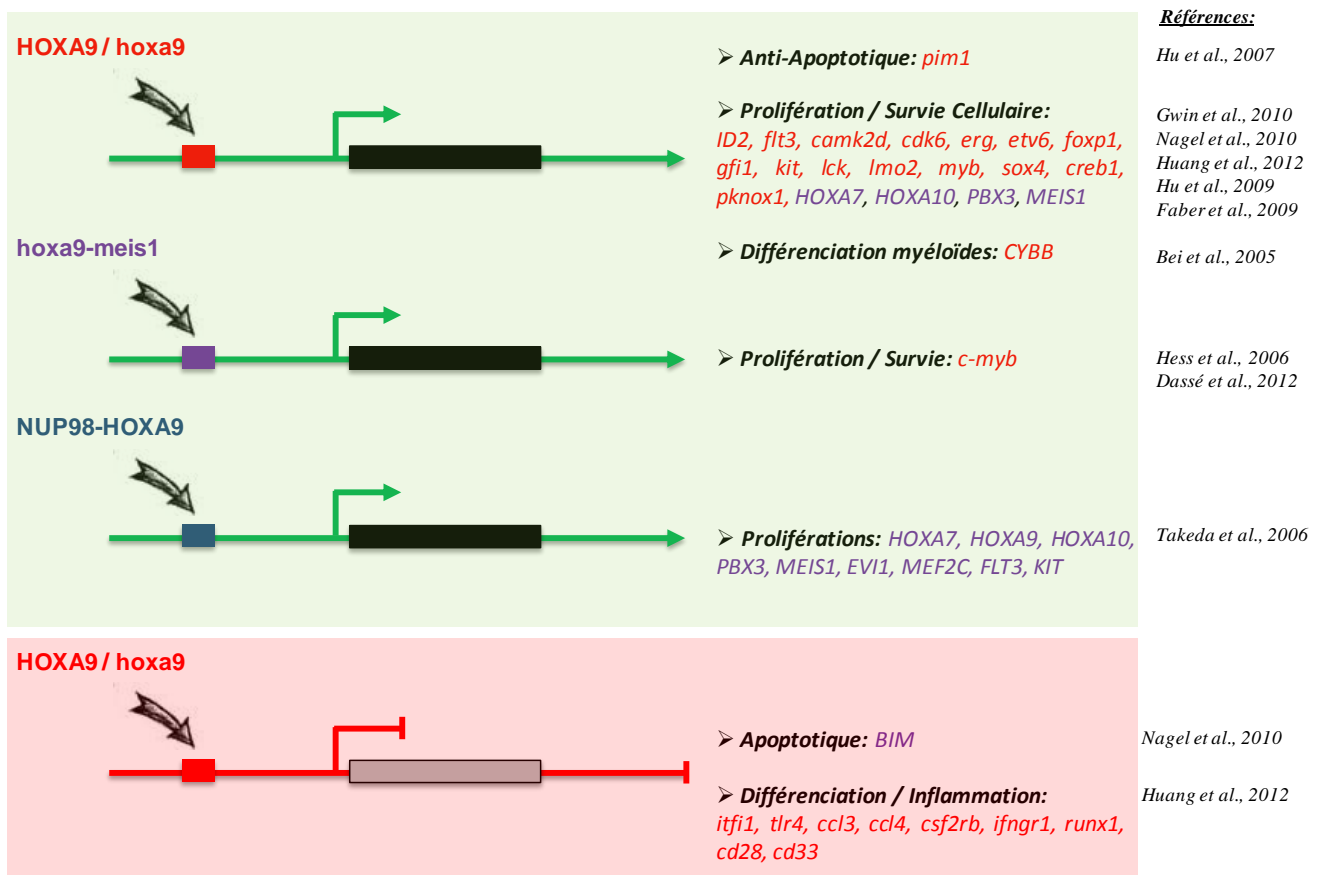
#### B ... qui évolue en LEUCEMIE





**Figure 17: De l'hématopoïèse normale à la leucémie: implication des gènes HOX.** **A.** Lors de l'hématopoïèse normale, l'expression des gènes HOX (notamment HOXA5, -7, -9 et -10) diminue au cours de la différenciation des CSHs (HSCs) en cellules matures fonctionnelles. Cette diminution corrèle avec celle de son cofacteur MEIS1 et de la présence des marqueurs épigénétiques « actifs » (H3K4me3...) déposés par le groupe protéique Trithorax (Trithorax group) contrairement à l'augmentation des marqueurs « répressifs » (H3K27me3...) déposés par les complexes protéiques PRC1 et PRC2 (Polycomb Repressor Complex). **B.** La dérégulation de l'expression des gènes HOX (résultat des fusions MLL, de la protéine chimère NUP98-HOXA9 et d'autres altérations moléculaires) aboutit à une surexpression continue des gènes HOXA5, -7, -9, -10, MEIS1 et de la présence du marqueur H3K4me3. Le marqueur répressif H3K27me3 n'est pas ou peu présent. Ces altérations contribuent alors au blocage de la différenciation des CSHs et à l'apparition de cellules leucémiques (LICs: Leukemia-Initiating cells).

Bien que le mécanisme exact par lequel cette surexpression contribue à ce phénotype soit très peu décrit, certains effecteurs cibles de ces gènes ont été révélés en partie par ChIP-chip et ChIP-seq. Parmi cette signature transcriptomique, nombres de gènes HOX sont inclus témoignant de l'existence d'une autorégulation. En effet, HOXA9 régule positivement la transcription des gènes HOXA7, HOXA10 et de ses cofacteurs MEIS1 et PBX3 (Faber et al., 2009). Plusieurs gènes sont ainsi exprimés ou réprimés en réponse à l'interaction à l'ADN du facteur HOXA9 tels des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (FLT3...) ou d'autres liés à l'inhibition de l'apoptose (PIM1...) (Fig. 18).



**Figure 18: Gènes cibles du facteur HOXA9 / hoxa9, de l'hétérodimère hoxa9-meis1 et de la protéine chimère NUP98-HOXA9.** Les flèches vertes indiquent une activation de l'expression contrairement à la répression transcriptionnelle en rouge. Les gènes notés en rouge font référence à une régulation directe alors que la notation violette indique une régulation indirecte (*minuscule italique* : gène murin, *MASJUSCULE italique*: gène humain).

A travers cette signature transcriptomique, son activité transcriptionnelle est alors synonyme de promotion du phénotype leucémique. En effet, l'inhibition de sa fixation à l'ADN suffit à induire la perte de son effet leucémogène. Les cellules ne prolifèrent alors plus de manière incontrôlée, se différencient et finissent par mourir (**Vijapurkar et al., 2004**). Par ailleurs la forme tronquée HOXA9T est dans l'incapacité de transformer des progéniteurs de moelle osseuse de souris *in vitro*, contrairement à son isoforme HOXA9 incluant l'homéodomaine essentiel au phénotype leucémique (**He et al., 2012 ; Breitinger et al., 2012**)

*Ainsi cibler l'interaction à l'ADN du facteur HOXA9 est l'une des stratégies thérapeutiques qui contribuerait à la modulation de l'expression des gènes cibles favorisant le phénotype leucémique afin de mener les cellules tumorales vers la différenciation et/ou la mort cellulaire.*

## 6. HOX et autres pathologies

La dérégulation de l'expression des gènes *HOX* n'est pas exclusive aux leucémies et nombreuses de tumeurs solides impliquent ces gènes. En effet, les carcinomes épidermoïdes de l'oesophage présentent une surexpression des gènes *HOX*, notamment *HOXA9*, ainsi que les carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale dont la surexpression de *HOXA10* est associée à un mauvais pronostic en terme de progression tumorale (**Chen et al., 2005; Yamatoji et al., 2010**). Surexprimés chez l'oesophage de Barrett (complication du reflux gastrointestinal pouvant évoluer vers un carcinome oesophagien) les gènes du groupe *HOXB*, *HOXB5-7*, contribuent au développement de cette pathologie (**di Pietro et al., 2012**). En terme de pronostic, la surexpression du gène *HOXA9* est également associée à un mauvais pronostic (en terme de survie) au sein des glioblastomes (tumeurs cérébrales les plus fréquentes) (**Costa et al., 2010**). Les carcinomes ovariens, prostatiques, hépatocellulaires, pancréatiques et bronchiques non à petites cellules ne sont pas en reste dans l'altération des gènes *HOX* puisque leur surexpression a été fréquemment caractérisée à l'exemple de *HOXB2* qui promeut le potentiel métastatique des cancers bronchiques et *HOXC8* associé à la perte de différenciation des carcinomes prostatiques (**Waltergny et al., 2002 ; Plowright et al., 2009 ; Morgan et al., 2010 ; Kelly et al., 2011; Cillo et al., 2011; Gray et al., 2011**).

En revanche, la surexpression du facteur HOXA9 réduit la progression tumorale de cellules cancéreuses du sein, fonctionnant ainsi comme un suppresseur de tumeur via la régulation directe de l'expression de *BRCA1* (*Breast cancer 1, early onset*) décrit en tant que suppresseur de tumeur (**Gilbert et al., 2010**). Toutefois, la description phénotypique des effets du triple knockout *hoxa9/hoxb9/hoxd9* murin n'indiquait qu'une hypoplasie des glandes mammaires seulement sous induction de grossesse ou de lactation et les souris ne présentaient pas de tumeurs (**Chen et al., 1999**).

## 7. Traitements actuels et usuels des Leucémies

Actuellement, les traitements existants reposent sur des chimiothérapies conventionnelles à large spectre dont leur cytotoxicité reste prépondérante et leur efficacité restreinte en fonction du type de leucémie et du patient. Le traitement des LAM, fut développé il y a plus de 40 ans incluant la combinaison d'aracytine (ara-C : antimétabolite) et d'anthracycline (inhibiteur de topoisomérase II). Administré chez des patients de moins de 60 ans, il permet la rémission complète d'environ 70 à 80% des patients mais ce pourcentage diminue de moitié en termes de rechute et de survie globale à 5 ans. Chez les plus de 60 ans, seuls 40 à 50% des patients peuvent atteindre des rémissions complètes mais le taux de guérison reste inférieur à 10% et la médiane de survie ne dépasse pas 1 ans. Au-delà, ce taux devient quasiment nul. La transplantation autologue ou allogénique de CSHs (prélèvement de moelle osseuse) reste une option alternative aux traitements mais n'est pas applicable à l'ensemble des patients (fonction souvent de l'âge, de sa santé, de la compatibilité donneur-receveur...), à l'exemple des allogreffes de moelle osseuse indiquées préférentiellement chez des patients de moins de 55, avec un caryotype défavorable, en première rémission complète (Tallman et al., 2005 ; Döhner et al., 2010 ; O'Brien et al., 2008 ; Cornell et al., 2012). La greffe constitue à l'heure actuelle la thérapie la plus efficace mais implique de nombreux risques provenant essentiellement de l'aplasie médullaire effectuée chez le receveur avant injection des CSHs. Des risques de rejets, d'infections mais aussi de persistance des cellules malignes, comme en témoignent les rechutes, sont souvent documentés. Néanmoins plus de 40% des patients n'ont pas d'anomalies cytogénétiques détectables (caryotype normal) et sont classés dans le groupe de pronostic intermédiaire dont la prise en charge thérapeutique est l'une des plus délicates. D'autant plus que comme toutes chimiothérapies, les effets cytotoxiques restent prépondérants et malgré cette administration la majorité des patients décèdent de cette pathologie essentiellement dus aux rechutes et résistances aux traitements.

*En conséquence l'un des grands défis du développement de thérapie ciblée pour les leucémies est d'une part la mise en évidence d'une cible moléculaire pertinente dont l'altération de son activité est commune ou atteint un grand nombre de phénotype leucémique et d'autre part nécessite l'existence d'outils moléculaires capable d'atteindre cette cible tout en limitant les effets secondaires.*

## 8. Ciblage moléculaire des facteurs HOX

### *a. Cible directe ?*

Bien que très rares et exempt d'application clinique usuelle, les thérapies ciblées aux facteurs de transcription HOX sont depuis peu à l'étude. L'une d'entre elle cible l'interaction des protéines HOX avec le cofacteur PBX via l'utilisation d'un peptide (HXR9), inhibiteur compétitif du motif hexapeptide des protéines HOX reconnu par le cofacteur PBX (**Morgan et al., 2007**). Jusqu'à présent, évalué *in vitro* et *in vivo*, ce peptide module le phénotype tumoral de mélanomes, cancer du poumon, cancer ovariens, myélomes, cancer du sein et de leucémies associées à des réarrangements du gène *MLL* (**Morgan et al., 2007 ; Plowright, et al., 2009 ; Morgan et al., 2010 ; Daniels et al., 2010 ; Morgan et al., 2012 ; Liu et al., 2012**).

Une autre s'intéresse, à l'identique de ce projet de recherche, à l'inhibition directe de l'interaction à l'ADN des facteurs HOX. Les seules données préliminaires concernent le facteur HOXA13 dont l'inhibition de son interaction à l'ADN n'a été démontrée qu'*in vitro* via l'utilisation de dérivés des lactames carboxamides (**Ng et al., 2007**).

### *b. Cible Indirecte ?*

A l'identique, les voies moléculaires accentuant ou à l'origine du processus leucémogène peuvent faire l'objet de thérapies ciblées. En effet cibler un acteur clé de l'activation des gènes *HOX* suffirait probablement à enrayer les leucémies dépendantes de ces facteurs. C'est ainsi que de petites molécules (MI-2, MI-2-2) ont été développées en tant qu'inhibiteur de l'interaction menin/MLL, complexe requis pour les fonctions leucémogène des fusions *MLL*. *In vitro* et *in vivo* cette inhibition est capable de diminuer l'expression de leurs gènes cibles notamment HOXA9 et MEIS1 et d'induire la différenciation des cellules leucémiques (**Grembecka et al., 2012 ; Shi et al., 2012**). Cette modulation transcriptionnelle est aussi constatée via l'inhibition de l'activité enzymatique de l'histone méthyltransférase DOT1L recrutée par *MLL*. L'inhibiteur EPZ004777, empêche ainsi la méthylation H3K79me2, marqueur d'activation transcriptionnelle, diminuant le potentiel transformant des fusions *MLL* via la diminution de l'expression de HOXA9 et MEIS1 (**Daigle et al., 2011 ; Chen et al., 2012**).

## B. ERG : De l'implication embryonnaire à l'oncogène prostatique et leucémique

### 1. Du gène au facteur de transcription fonctionnel

#### a. ERG : un membre de la famille des gènes *ETS*

Cette famille composée de nombreux gènes code pour des facteurs de transcription regroupés sur la base d'homologies de séquences. Celles-ci tiennent leurs origines de la découverte en 1983 d'un des oncogènes du virus leucémique E26 : l'oncogène *v-ets* (*E-twenty-six specific*) présentant des homologies de séquences avec de nombreux gènes tels *ETS-1*, *ets-1*, *ETS-2*, *ets-2*, *ERG*, *ELK-1* ou encore *pu.1* (Leprince et al., 1983 ; Nunn et al., 1983 ; Watson et al., 1988 ; Gunther et al., 1990 ; Boulukos et al., 1988 ; Reddy et al., 1987 ; Rao et al., 1989 ; Klemsz et al., 1990). Au total, 27 et 28 membres de la famille des gènes *ETS*, localisés sur différents chromosomes, ont été respectivement identifiés par la suite chez le génome murin et humain. Ils peuvent être subdivisés en 12 sous-familles en fonction de l'homologie de séquence du domaine ETS et/ou d'autres domaines fonctionnels (tel le domaine PNT : *pointed*) (Fig. 19) (Laudet et al., 1999 ; Hollenhorst et al., 2007).

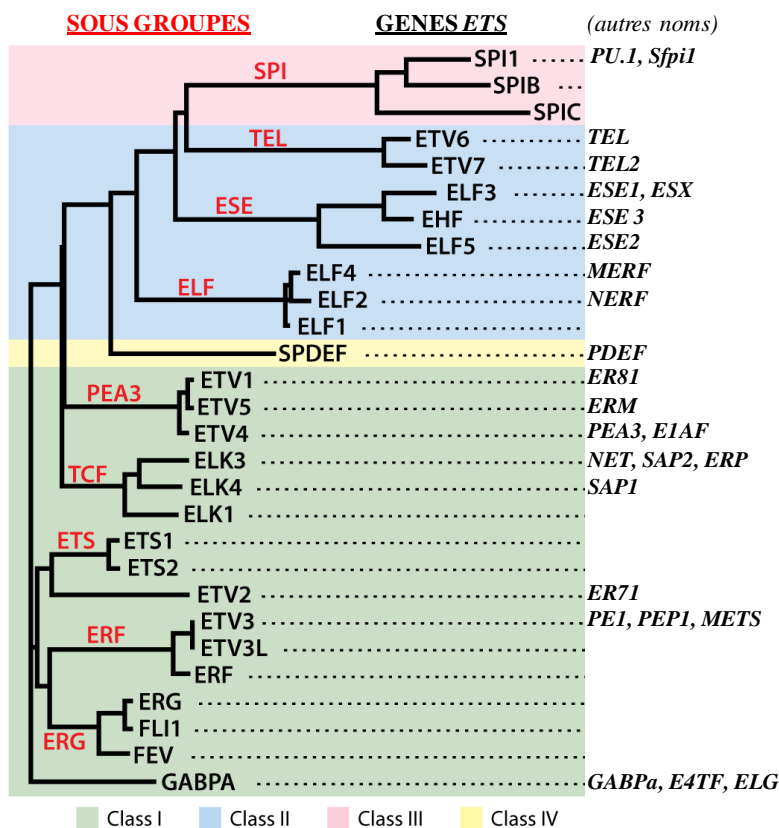
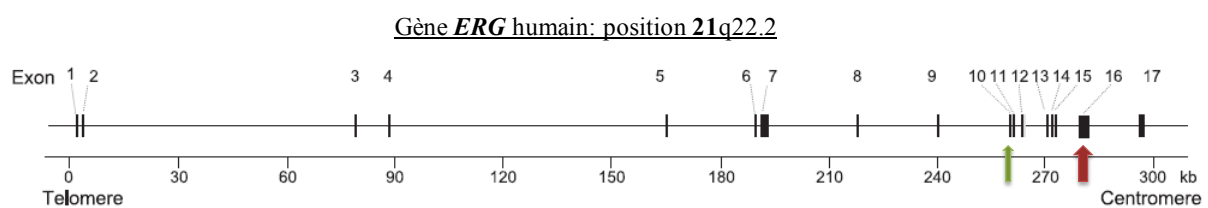


Figure 19: Dendrogramme basé sur le degré d'homologie des séquences codantes pour le domaine ETS des 28 gènes *ETS* humains. Les gènes dont l'homologie de séquences sont très proches sont inclus au sein d'un même sous-groupe en rouge. Une autre classification s'ajoute à celle-ci représentée par les couleurs de fond correspondant chacune à une classe distincte. Cette dernière classification se réfère à l'analogie de la séquence d'ADN reconnue par le domaine ETS (D'après Hollenhorst et al., 2011).

Dans les deux cas, ces analyses phylogénétiques font des facteurs de transcription ERG, FLI-1 (*Friend Leukemia virus Integration 1*) et FEV (*Fifth Ewing sarcoma Variant*) des membres du sous-groupe ERG, témoignant ainsi d'une étroite similitude du domaine ETS. ERG et FLI-1 ont notamment en commun un autre domaine fonctionnel dont l'homologie des deux protéines de 68% atteint 98% lorsque que la comparaison est restreinte au domaine ETS (**Watson et al., 1992**).

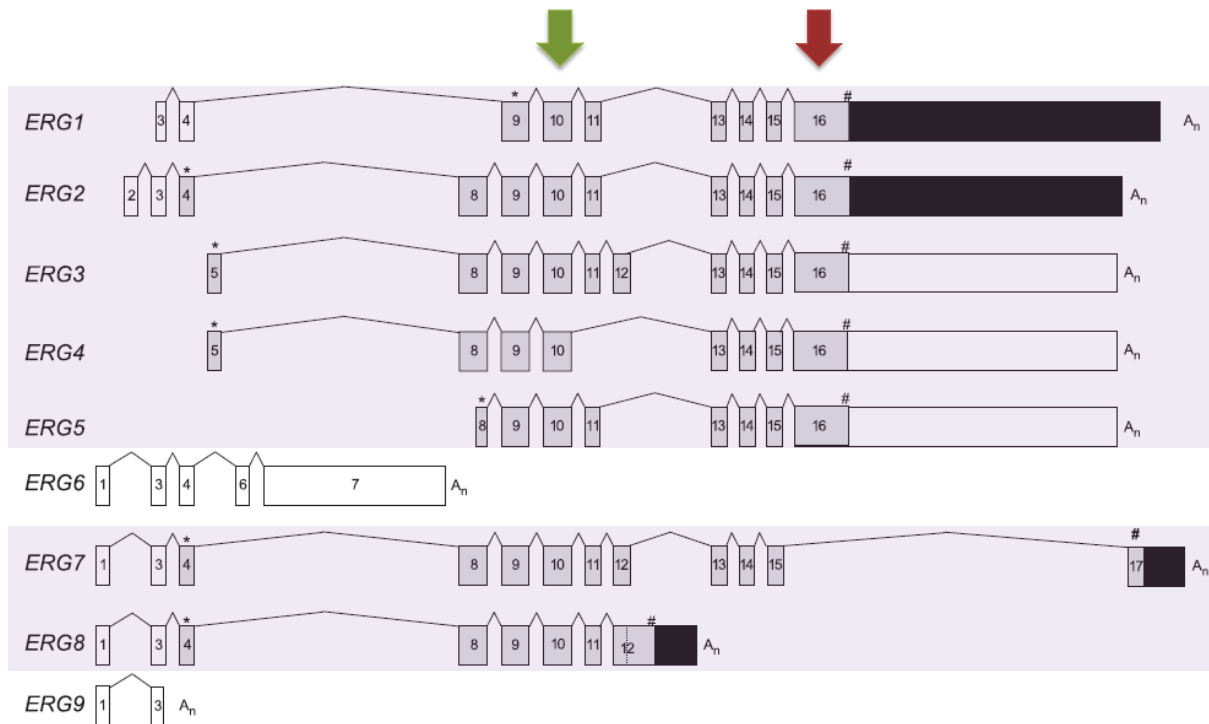
D'un point de vue génétique, ces deux facteurs diffèrent autant par leur localisation que par leur organisation génomique. Le gène *ERG* est situé sur le chromosome 21 (position 21q22.2) et contient 17 exons d'une longueur totale d'environ 300 Kpb alors que le gène *FLI-1*, constitué de 9 exons est localisé sur le chromosome 11 (position 11q24.3) et s'étend sur approximativement 200 Kpb (**Fig. 20**) (**Rao et al., 1987 ; Watson et al., 1992**).



**Figure 20: Schéma représentant l'organisation génomique du gène humain *ERG* situé sur le chromosome 21.** Les exons sont représentés par des rectangles noirs, ceux codant pour les domaines fonctionnels PNT et ETS sont indiqués par des flèches vertes et rouges respectivement (D'après **Owczarek et al., 2004**).

#### b. Expression du gène ERG

Pas moins de neuf transcrits du gène *ERG* ont été identifiés (nommé ERG-1 à ERG-9), générés par divers épissages alternatifs, dont sept sont traduits en protéines (**Fig. 21**) (**Hewett et al., 2001 ; Owczarek et al., 2004**). Les cinq premiers isoformes: *ERG-1* (p41), *ERG-2* (p52), *ERG-3* (p55), *ERG-4* (p49) et *ERG-5* (p38) codent pour des protéines fonctionnelles capables d'interagir avec l'ADN à travers leur domaine de fixation ETS et correspondent à des activateurs transcriptionnels (**Duterque-Coquillaud et al., 1993 ; Hewett et al., 2001**).



**Figure 21: Structure des différents transcrits codés par le gène *ERG*.** Les transcrits sur fond violet correspondent aux ARNm qui seront traduits en protéines. Les domaines fonctionnels PNT et ETS sont indiqués par des flèches vertes et rouges respectivement. (\*) indique le codon « start » et (#) indique le codon « stop ». A<sub>n</sub> correspond à la « queue polyA » (D'après **Owczarek et al., 2004**).

De manière générale, l'expression des gènes ETS n'est pas limitée à un seul tissu, de même qu'aucun des membres de cette famille n'expose de profil d'expression restreint à un type cellulaire unique. Mesurées par RT-PCR dans plus d'une vingtaine de tissus humains et de lignées cellulaires, les niveaux d'ARNm des 27 membres de la famille des gènes *ETS* sont exprimés, pour le tiers, dans chaque échantillon, et pour la moitié, dans l'ensemble des types cellulaires. Ils ont donc été classés comme gènes ubiquitaires (**Hollenhorst et al., 2004**). Toutefois, les membres du sous-groupe ERG ont une expression plus restreinte à certains types cellulaires incluant les cellules endothéliales (**Dhordain et al., 2005 ; Hewett et al., 2001 ; Khachigian et al., 1994**) et les cellules hématopoïétiques (**Hollenhorst et al., 2004**).

Au cours du développement embryonnaire, l'ARNm *erg* est exprimé chez la souris au sein des tissus dérivant du mésoderme (telles les cellules endothéliales), les régions précartilagineuses et urogénitales (**Vlaeminck-Guillem et al., 2000 ; Maroulakou et al., 2000**). *Erg* est fortement exprimé durant la vascularisation à la fois au niveau de l'endothélium intra- et extra-embryonnaire. Cette expression diminue par la suite, une fois les capillaires de l'embryon formés (**Vlaeminck-Guillem et al., 2000**). La protéine ERG est aussi détectée au cours du développement embryonnaire dans les cellules endothéliales, les tissus hématopoïétiques et précartilagineux (**Mohamed et al., 2010**).

Au niveau du tissu hématopoïétique, l'expression de *erg* est aussi bien mesurée dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) adultes que les lignées hématopoïétiques qui en découlent comme la lignée mégakaryocytaire (**Rainis et al., 2005 ; Loughran et al., 2008 ; Kruse et al., 2009 ; Taoudi et**

al., 2011). Il est aussi fortement exprimé au sein des progéniteurs lymphoïdes B et T immatures, expression qui perdure, plus faiblement au sein des cellules B matures. Son expression s'éteint progressivement au cours de la différenciation des cellules T, suggérant l'existence d'un lien entre la différenciation des cellules lymphoïdes de type T et la baisse de l'expression du gène (Fig. 22) (Rivera et al., 1993 ; Anderson et al., 1999).

Son expression n'est pas commune à l'ensemble des tissus épithéliaux, comme l'épithélium prostatique où aucune expression de la protéine n'est détectée chez la souris adulte (Mohamed et al., 2010).

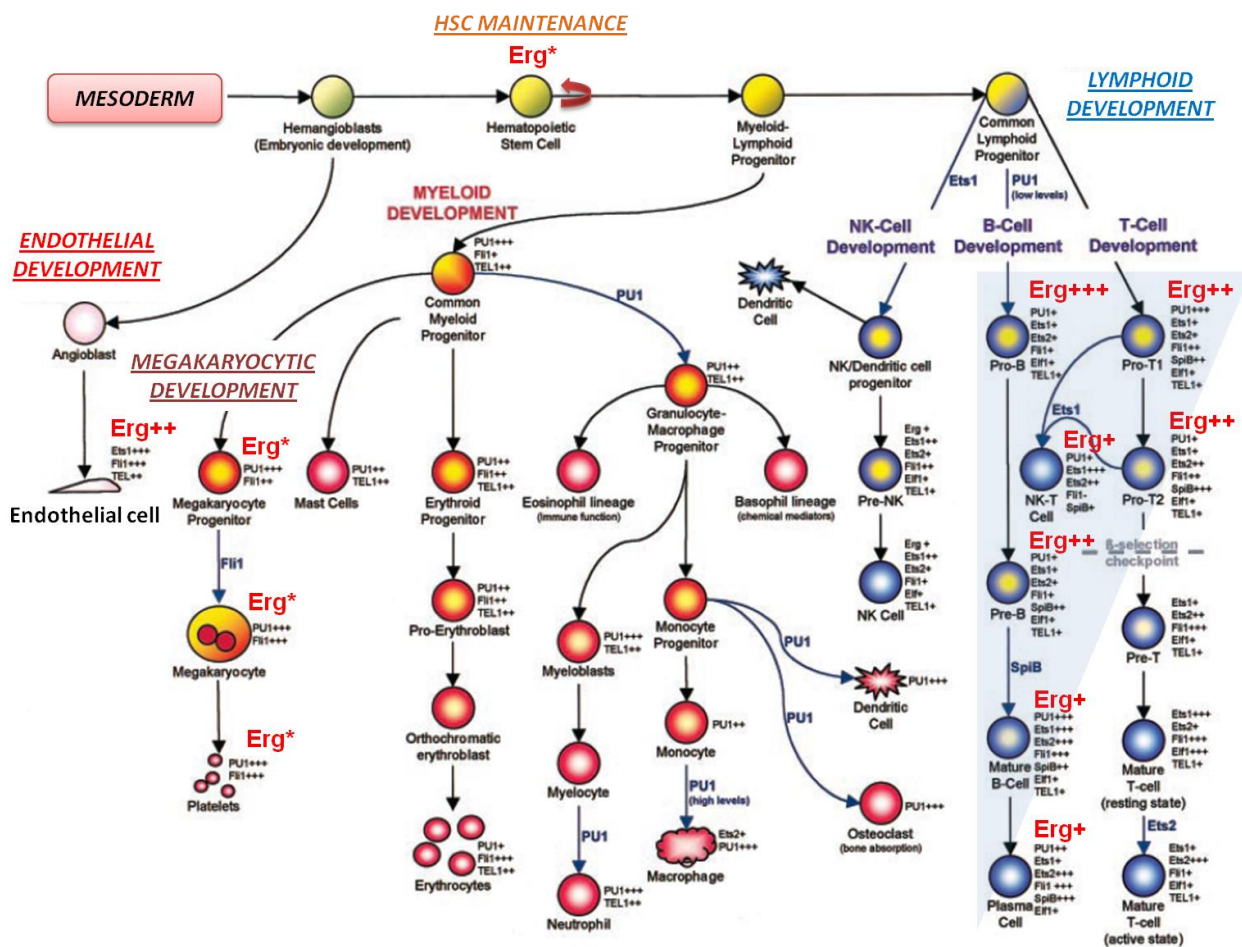


Figure 22: Représentation schématique du niveau d'expression des gènes *ETS* au cours du développement des cellules endothéliales et hématopoïétiques. Les niveaux d'expression des gènes sont indiqués ainsi : (+) faible, (++) moyenne et (+++) forte expression (D'après Maroulakou et al., 2000). *Erg\** : des données récentes montrent l'expression de ce facteur au cours du développement mégakaryocytaire et dans la maintenance des cellules souches hématopoïétiques (HSC : *Hematopoietic Stem Cell*). Néanmoins puisque les quantifications ne sont pas mentionnées, le niveau d'expression n'est pas indiqué et ne peut être mis en comparaison (D'après Rainis et al., 2005 ; Loughran et al., 2008 ; Taoudi et al., 2011).

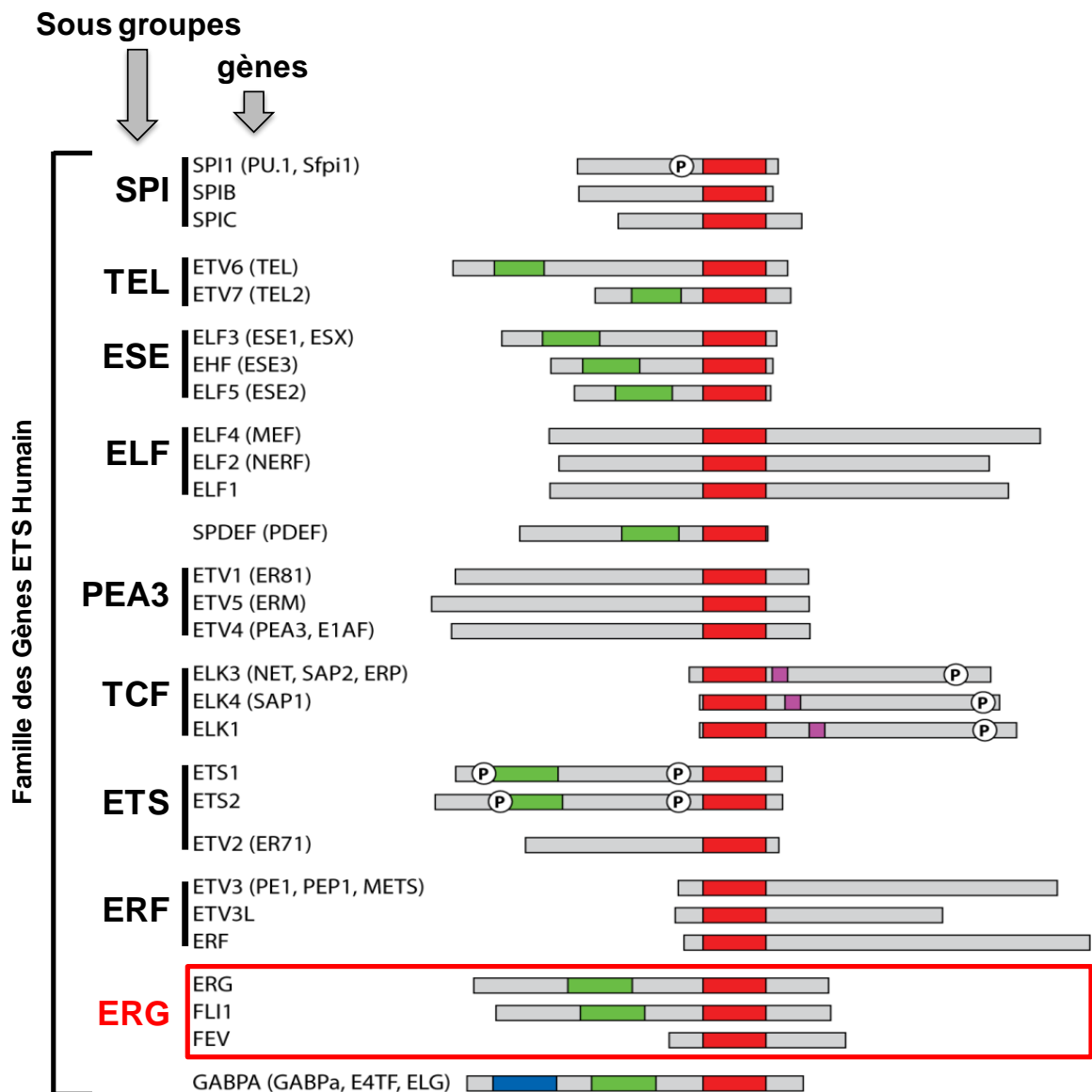
Il est à noter que certains isoformes, tels *ERG-2* et *ERG-3*, présentent des niveaux d'expression plus importants dans les cellules endothéliales et les progéniteurs hématopoïétiques de la lignée myéloïde



et lymphoïde. L'isoforme *ERG-3* prédomine à la fois dans les cellules hématopoïétiques normales et malignes (Rainis et al., 2005) mais aussi dans les cellules endothéliales (Hewett et al., 2001).

c. ERG : Facteur de transcription fonctionnel et spécificité de reconnaissance de l'ADN

La mise en place de cette famille de facteur de transcription s'est faite principalement autour de l'homologie de séquence du domaine d'interaction à l'ADN, nommé le domaine ETS (Fig. 23).



**Figure 23: Représentation schématique des domaines fonctionnels et structuraux des 28 membres de la famille des facteurs de transcription ETS.** Le domaine d'interaction à l'ADN (*ETS domain*) est schématisé par un rectangle rouge, le domaine PNT (*PNT domain*) par un rectangle vert, le domaine OST (*OST domain*) par un rectangle bleu et la boîte-B (*B-box*) par un rectangle violet. Les cercles incluant la lettre P symbolisent des sites potentiels de phosphorylation (D'après Hollenhorst et al., 2011).

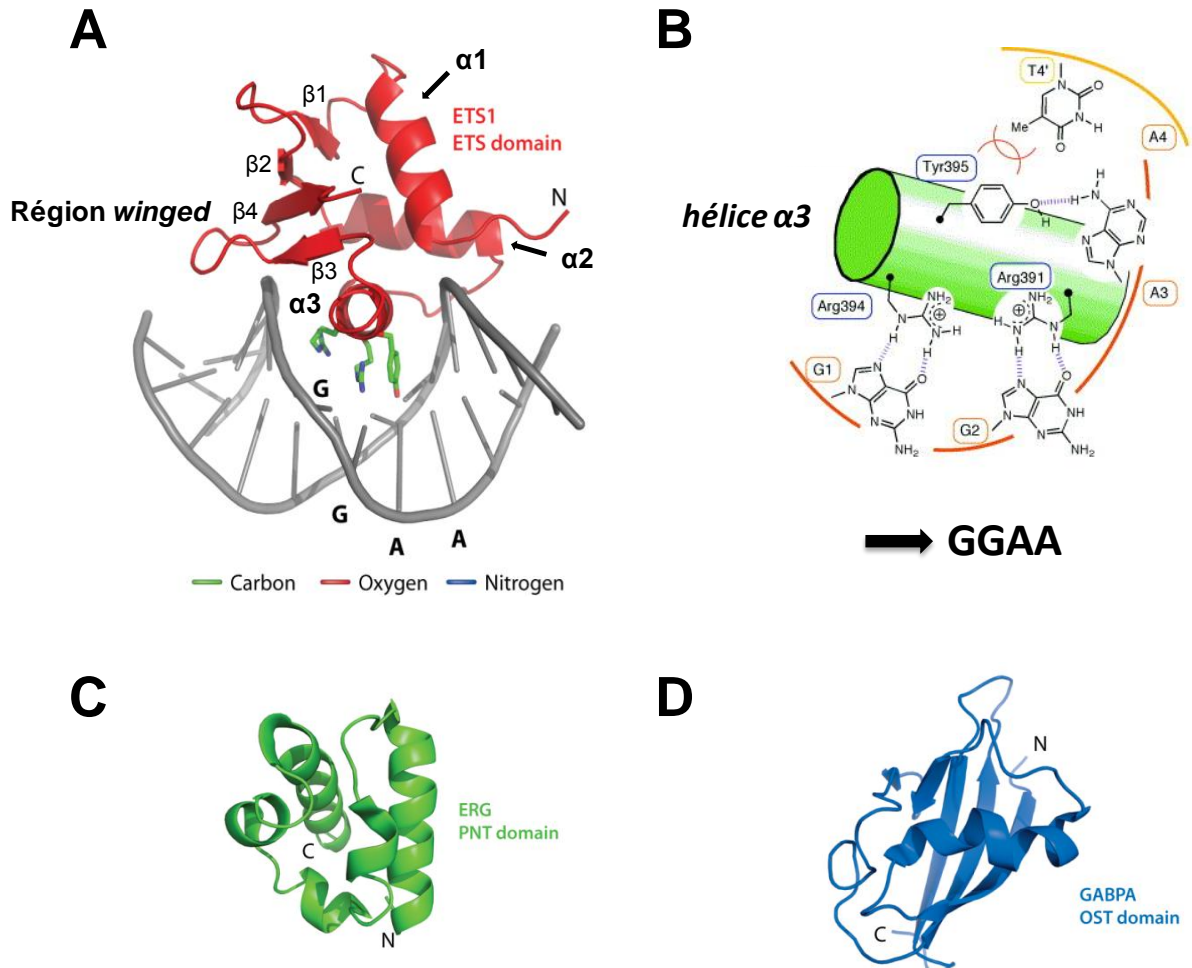
Le domaine ETS, d'environ 85 résidus d'acides aminés, forme un motif « *winged* » hélice-tour-hélice (wHTH) constitué de 3 hélices  $\alpha$  et 4 feuillets  $\beta$  et reconnaît le motif EBS (ETS Binding Site) correspondant à une séquence d'ADN qui peut s'étaler sur 12 à 15 pb mais qui le plus souvent est restreinte à environ 9 pb avec un cœur central invariant 5'-GGA(A/T)-3' (séquence EBS minimale) (Karim et al., 1990 ; Nye et al., 1992). Le motif wHTH correspond à une variante du motif HTH où, en plus des trois hélices  $\alpha$  caractéristiques, deux grandes boucles sont formées par l'enchaînement consécutif de deux feuillets  $\beta$  lui donnant parfois le nom « d'hélice ailée » (« *winged helix* ») (Fig. 24.A).

L'interface ETS/ADN est caractérisée à la fois par une lecture directe, impliquant des contacts [acides aminés du domaine ETS – bases de l'ADN], et des lectures indirectes qui jouent sur l'orientation séquence-spécifique du squelette phosphodiester. En effet, l'orientation de ce motif et sa disposition tridimensionnelle permet à l'hélice  $\alpha 3$  d'interagir avec le grand sillon de la double hélice d'ADN où, comme l'interaction ETS1/ADN, des liaisons hydrogènes sont établies entre les acides aminés R391 (arginine 391), R394 (arginine 394) et Y395 (tyrosine 395) et les bases guanines G2 et G1 et l'adénine A3 respectivement (Fig. 24.B). Le groupement  $\text{NH}_2$  et l'atome d'azote secondaire de l'Arg394 interagissent respectivement avec l'atome d'oxygène en position O6 et l'atome d'azote en position N7 de la guanine G1. A l'inverse, pour l'Arg391, le groupement amine lie l'azote N7 et l'azote secondaire interagit avec l'oxygène O6 de la guanine G2. A cela s'ajoute la liaison entre le groupement hydroxyle de la Tyr395 et l'atome d'azote en position N6 de l'adénine A3 (Obika et al., 2003). Les interactions hydrophobiques et électrostatiques, via une molécule d'eau, sont également impliquées dans ce complexe et sont principalement fournies par les résidus d'acides aminés situés entre le « coude » formé par les hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  ainsi qu'au sein de « l'hélice ailée » façonnée par l'orientation des feuillets  $\beta 3$  et  $\beta 4$ .

A ce jour, aucune donnée cristallographique de l'interaction à l'ADN du facteur ERG n'est publiée, mais étant donné l'homologie de structure du domaine ETS au sein des différents membres de cette famille, l'interface ERG/ADN devrait être semblable à l'interface ETS-1/ADN et FL1-1/ADN. En effet, son homologue le plus proche, FLI-1, présente à l'identique un complexe impliquant deux arginines (Arg337 et Arg340) et une tyrosine (Tyr341) dans l'établissement de contacts directs avec la séquence EBS minimale 5'-GGA(A/T) (Liang et al., 1994).

Pour l'ensemble des protéines ETS, les interactions avec les deux guanines sont invariables et constituent les contacts directs. Cependant, aucune interaction directe n'est décrite avec les bases de l'ADN situées de part et d'autre du site EBS minimal 5'-GGA(A/T)-3' suggérant que la spécificité de séquence de reconnaissance et d'interaction avec le site EBS complet repose sur des liaisons indirectes telles que les interactions électrostatiques. Celles-ci contribueraient à l'orientation et à la conformation du complexe ETS/ADN pour une interaction efficace et fonctionnelle, associée à une distorsion locale de la double hélice d'ADN selon le complexe formé (Szymczyzna et al., 2000 ; Obika et al., 2000). En effet, il a été montré que la seule modification des bases nucléotidiques situées de part et d'autre du

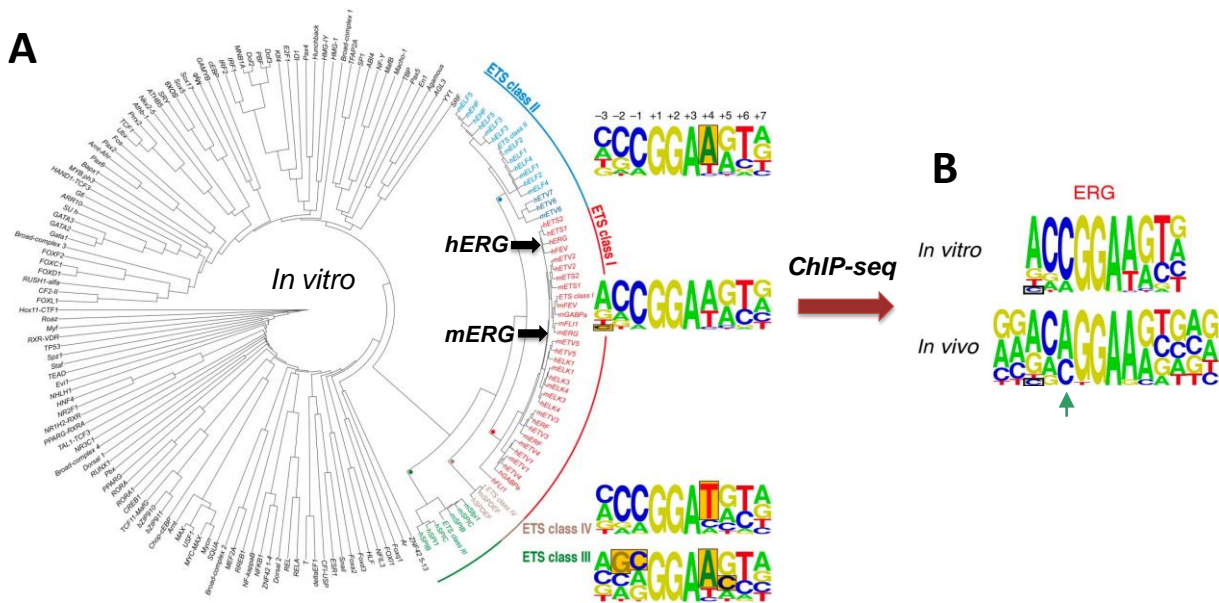
site EBS minimal réussit à accroître l'affinité d'interaction à l'ADN du facteur PU-1 (Poon et al., 2003).



**Figure 24:** A. Modélisation structurale de l'interaction à l'ADN du domaine ETS du facteur de transcription ETS-1 avec la séquence d'ADN EBS. L'ADN [d(TAGTGCCGAAATGT)]<sub>2</sub> a été utilisé pour la structure cristallographique du complexe.  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  correspondent aux hélices  $\alpha 1/2/3$  du domaine ETS et  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$  correspondent aux feuillets  $\beta 1/2/3$  du domaine ETS. B. Représentation schématique des liaisons hydrogènes établies entre les acides aminés arginine 394 (Arg394), 391 (Arg391) et la tyrosine 395 (Tyr395) de l'hélice  $\alpha 3$  avec les guanines G1 et G2 et l'adénine A3 du site GGAA minimal. C. Modélisation du domaine PNT du facteur ERG. D. Modélisation du domaine OST du facteur GABPA (GABP $\alpha$ ). N : extrémité aminoterminal ; C : extrémité carboxyterminale. (A/C/D: D'après Hollenhorst et al., 2011 ; B: D'après Obika et al., 2003).

En 2010, Wei et al. se sont intéressés aux profils des sites d'interaction à l'ADN de l'ensemble des facteurs ETS humains et murins sur la base d'analyses *in vivo* et *in vitro* du génome entier (Wei et al., 2010). Ces expérimentations ont permis de mettre en avant une nouvelle classification des facteurs de transcription ETS selon leurs sites d'interaction préférentiels, comme indiqué sur les figures 19 et 23. La séquence la plus redondante correspondant au site 5'-accGGA(A/T)gt conserve la séquence invariante 5'-GGA(A/T) et est entourée de part et d'autre de bases plus ou moins variables selon l'affinité de liaison du facteur envers cette base. Pas moins de la moitié des facteurs ETS présente ce

même consensus étant donc inclus dans la classe I tels ERG et FLI-1. Les autres classes (II, III ou IV) diffèrent sur une ou plusieurs bases (**Fig. 25. A**) (**Wei et al., 2010**).



**Figure 25: A. Classification des facteurs de transcription ETS en fonction des sites d'interaction EBS préférés.** L'ensemble des facteurs est intégré dans 4 classes distinctes associées à un site EBS défini sur la base des affinités d'interactions obtenues *in vitro* pour chaque facteur. **B. Comparaison entre les sites EBS déterminés *in vitro* et *in vivo* pour le facteur ERG.** L'analyse par ChIP-seq des sites d'interaction du facteur ERG a permis de mettre en avant ce consensus. La principale différence entre les deux sites porte sur la base en position -1 (flèche verte) où la base A prend le dessus sur la base C *in vivo* (D'après **Wei et al., 2010**).

Obtenu par ChIP-seq, le site consensus de ERG est globalement proche de celui déterminé *in vitro*, avec un site EBS minimal 5'-GGAA préférentiellement suivi en 3' de la séquence 5'-GT. Néanmoins la base A en position -1 est prédominante *in vivo* à la base C identifiée *in vitro* (**Fig. 25. B**).

Il est intéressant de noter que cette classification n'est pas strictement fermée et que certains facteurs de transcription (notamment ceux associés à la biologie du cancer, en particulier ERG) ne sont pas restreints à une seule classe. Cette remarque se base sur les interactions acides aminés / ADN pouvant moduler la spécificité d'interaction au site EBS, en particulier sur les bases adjacentes au site EBS minimal (**Wei et al., 2010**). Enfin, les partenaires protéiques recrutés tels des cofacteurs peuvent contribuer à cette spécificité.

Au final, la formation des complexes [facteurs de transcription ETS/ADN] impliquent à la fois des données structurales, biochimiques et biologiques, qui mènent ou non à une interaction hautement spécifique et affine, et permet à la fois de discriminer entre différents sites consensus pour un facteur ETS unique et entre de multiples facteurs ETS pour un site unique.

#### d. Autres domaines fonctionnels annexes au domaine ETS

D'autres domaines fonctionnels font partie intégrante de certaines protéines ETS tel le domaine PNT, le domaine OST ou la boîte B. De manière générale, ces domaines peuvent participer à la fonction biologique et contribuent à la hiérarchisation structurale de cette famille.

##### *i. Domaine PNT*

Ce domaine est composé d'environ 80 acides aminés, et est conservé dans 1/3 des protéines ETS dont ERG et FLI-1. Comme déterminé pour le facteur ERG par des données de résonnance magnétique nucléaire (RMN), le domaine PNT est composé de 4 hélices  $\alpha$  ( $\alpha_2$  à  $\alpha_5$ ) et d'une hélice  $\alpha_2'$  plus courte, commune à plusieurs domaines PNT des facteurs de transcription ETS (ETS-1, TEL ou encore GABP $\alpha$ ) et similaire au domaine SAM (*Sterile  $\alpha$  motif*) d'interaction protéique identifié dans plus de 400 protéines différentes (**Fig. 24.C**) (**Mackereth et al., 2004**). Pour certains une autre hélice  $\alpha$  s'ajoute en position aminoterminal (ETS-1 et GABP $\alpha$ ) (**Slupsky et al., 1998**).

D'un point de vue fonctionnel, ce domaine permet l'auto-association du facteur ETV-6, l'interaction protéine-protéine entre ETS-1 et ERK-2 (*Extracellular signal Regulated Kinase – 2*) ou encore la liaison du facteur ETS-2 avec la protéine d'interaction CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*) (**Mackereth et al., 2004**). Ces interactions permettent d'interférer dans les fonctions biologiques des facteurs ETS comme ETV6, où son oligomérisation est essentielle à l'activation constitutive de l'activité d'une protéine kinase et des propriétés mitogènes du récepteur PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*) (**Jousset et al., 1997**). De plus, en tant que répresseur transcriptionnel, le facteur ETV6 contournerait cette faible affinité (sous forme de monomère) en interagissant à l'ADN sous forme de polymère coopératif (**Green et al., 2010**).

Cependant, bien que ce domaine soit présent dans certaines protéines ETS, son implication biologique reste encore inconnue pour les facteurs ERG et GABP $\alpha$ .

##### *ii. B-box*

Le motif B-box est principalement retrouvé au sein des facteurs du sous-groupe TCF et constitue un motif d'interaction protéine – protéine requis pour la formation d'un complexe ternaire avec le facteur de réponse au sérum SRF (*serum response factor*). Ce complexe ternaire permet d'augmenter l'activité de liaison envers des sites d'ADN définis (**Buchwalter G et al., 2004**).

##### *iii. Domaine OST*

Ce domaine OST (*On-Sight*) récemment identifié chez le facteur GABP $\alpha$  est représenté par un enchaînement anti-parallèle de 5 feuillets  $\beta$  traversé par une hélice  $\alpha$ . La mise en évidence de

l'interaction du domaine OST avec le coactivateur CBP/p300 (*histone acétyltransférase*) en fait un acteur de la machinerie transcriptionnelle (**Fig. 24. D**) (**Kang et al., 2008**).

#### e. Interaction et modification post-transcriptionnelle

##### *i. Phosphorylation et glycosylation*

Plusieurs facteurs de transcription ETS sont sujets à des phosphorylations (schématisées sur la **figure 23**) en réponse à divers signaux en amont. Ces modifications ont un impact sur leurs activités. L'exemple le mieux décrit est le phénomène d'auto-inhibition du facteur ETS-1 qui est renforcé par des phosphorylations calcium-dépendantes de la protéine (**Cowley et al., 2000**). La disposition des sérines, cibles des phosphorylations, est distante du domaine ETS mais proche des éléments structuraux requis et suffit à renforcer la configuration inhibitrice du facteur ETS par stabilisation électrostatique entre les groupements phosphates des phosphosérines et les résidus basiques du module inhibiteur formé de plusieurs hélices  $\alpha$ . Ainsi, l'interaction à l'ADN du facteur ETS-1 est réprimée par la charge énergétique trop importante requise pour une modification conformationnelle du module inhibiteur nécessaire à la formation du complexe ETS/ADN (**Cowley et al., 2000**).

D'autres membres de la famille ETS sont phosphorylés suite à l'activation de voies de signalisation (exemple de la voie des MAPK). Certaines de ces phosphorylations augmentent l'activité du facteur, d'autres peuvent moduler sa stabilité ou réduire son affinité pour l'ADN (**Tootle et al., 2005**). L'activation de la PKC conduirait à la phosphorylation de l'isoforme ERG-2 mais les conséquences de cette phosphorylation restent inconnues.

Contrairement à la phosphorylation, l'implication de la glycosylation dans la modulation de l'activité des facteurs de transcription ETS est moins documentée. Elle est observée uniquement pour ELF-1 et peut être conjointe à sa phosphorylation. Ces phosphorylations et glycosylations différentielles d'ELF-1 modulent sa localisation cellulaire, ses interactions protéine/protéine et augmentent l'interaction protéine/ADN (**Juang et al., 2002**).

##### *ii. Acétylation, ubiquitination et sumoylation*

L'acétylation, l'ubiquitination et la sumoylation ont tous pour cibles des lysines et sont communément décrites dans la modulation de l'activité des facteurs de transcription. Chez les facteurs ETS, le facteur ETV-6 est sumoylé par l'ajout du polypeptide SUMO sur une lysine constitutive du domaine PNT. Cette modification induit une relocalisation d'ETV6 du noyau vers les « corps nucléaires », structures transitoires formées durant la phase S du cycle cellulaire. Délocalisé du noyau, il perd ainsi son activité de répresseur transcriptionnel (**Chakrabarti et al., 2000**). Régulé par sumoylation, le facteur ETV-4 l'est aussi par acétylation. L'acétylation, médiée par le coactivateur CBP/p300, accroît son

activité transcriptionnelle alors que la polyubiquitinylation induit sa dégradation via le protéasome (Guo et al., 2009 ; Guo et al., 2011).

## 2. Fonctions physiologiques du facteur ERG

Tous ces mécanismes contribuent de près ou de loin au rôle essentiel tenu par ces protéines : l'activation ou la répression de la transcription de gènes cibles. Diverses fonctions cellulaires ont été décrites pour l'ensemble de la famille des gènes *ETS* bien que leur homologie de séquence soit très forte. Ces fonctions ont été pour la plupart décrites après délétion du gène, ou sont le résultat de mutations du gène affectant son activité transcriptionnelle.

Pour le facteur ERG, son expression et les gènes cibles qui sont documentés font de ce facteur un acteur clé:

- du développement embryonnaire
- de la différenciation endothéliale et de l'angiogenèse
- du maintien des CSHs et de l'hématopoïèse

### a. Développement embryonnaire

Au cours du développement embryonnaire, son expression implique une régulation spatiotemporelle. En effet, il est séquentiellement exprimé dans les cellules endothéliales des îlots sanguins du sac vitellin, lors du développement vasculaire et ensuite dans les chondrocytes du cartilage en développement (Vlaeminck-Guillem et al., 2000). Dans un modèle d'embryogenèse murine récent, ERG a été impliqué dans la morphogenèse des valves cardiaques par régulation directe de l'expression de deux répresseurs transcriptionnels Snail-1 et Snail-2 influant sur la transformation des cellules mésenchymateuses en cellules endocardiques fonctionnelles (Vijayaraj et al., 2012).

### b. Différenciation endothéliale et angiogenèse

Dans les stades précoces du développement embryonnaire, le facteur ERG est décrit comme régulateur transcriptionnel de la différenciation des cellules souches embryonnaires (CSE) en lignées progénitrices endothéliales. Lorsque son expression est réduite par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens ou de shRNA, le nombre de cellules endothéliales est nettement diminué et la formation des structures vasculaires est altérée (McLaughlin et al., 2001 ; Nikolova-Krstevski et al., 2009). En effet, plusieurs gènes cibles associent ce phénotype à la régulation par ERG de l'expression de protéines comme le facteur von Willebrand (vWF), une glycoprotéine intervenant dans l'adhésion et l'agrégation des plaquettes au niveau de l'endothélium interne (Schwachtgen et al., 1997). La molécule d'adhésion vasculaire endothéliale (*VE-cadhérine*) fait aussi partie de ces gènes. Sa

régulation directe par ERG contribue à l'angiogenèse et à la survie de cellules endothéliales (**Birdsey et al., 2008**). La migration des cellules endothéliales via la régulation de la dynamique du cytosquelette correspond aussi à une autre propriété physiologique de ERG. Ce dernier module *in vivo* l'acétylation de la tubuline via l'activation directe de l'expression de l'histone déacétylase-6 (HDAC6) (**Birdsey et al., 2012**). A ces cibles directes s'ajoutent l'endogline, une glycoprotéine dont l'expression est essentielle au développement normal des vaisseaux sanguins et RhoJ, membre de la famille des Rho-GTPases, dont l'expression est nécessaire à la formation du lumen des vaisseaux sanguins (**Pimanda et al., 2006 ; Yuan et al., 2011**). L'intégrité de cette structure dépend de l'expression de la claudine-5, protéine transmembranaire des jonctions serrées cible de ERG, qui préserve l'intégrité de la barrière physique formée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (**Yuan et al., 2012**).

Enfin, toujours dans le contexte des cellules endothéliales, le facteur ERG présente des effets anti-inflammatoires par répression directe de l'expression de l'interleukine 8 (IL-8) et de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1), molécules pro-inflammatoires capables de contribuer au recrutement des leucocytes circulant dans les tissus (**Yuan et al., 2009 ; Sperone et al., 2011 ; Dryden et al., 2012**).

L'ensemble de ces mécanismes transcriptionnels ayant pour origine l'activité biologique du facteur de transcription ERG font de ce dernier un régulateur clé de la différenciation des cellules endothéliales et de l'intégrité structurale et fonctionnelle des vaisseaux sanguins.

### c. Hématopoïèse

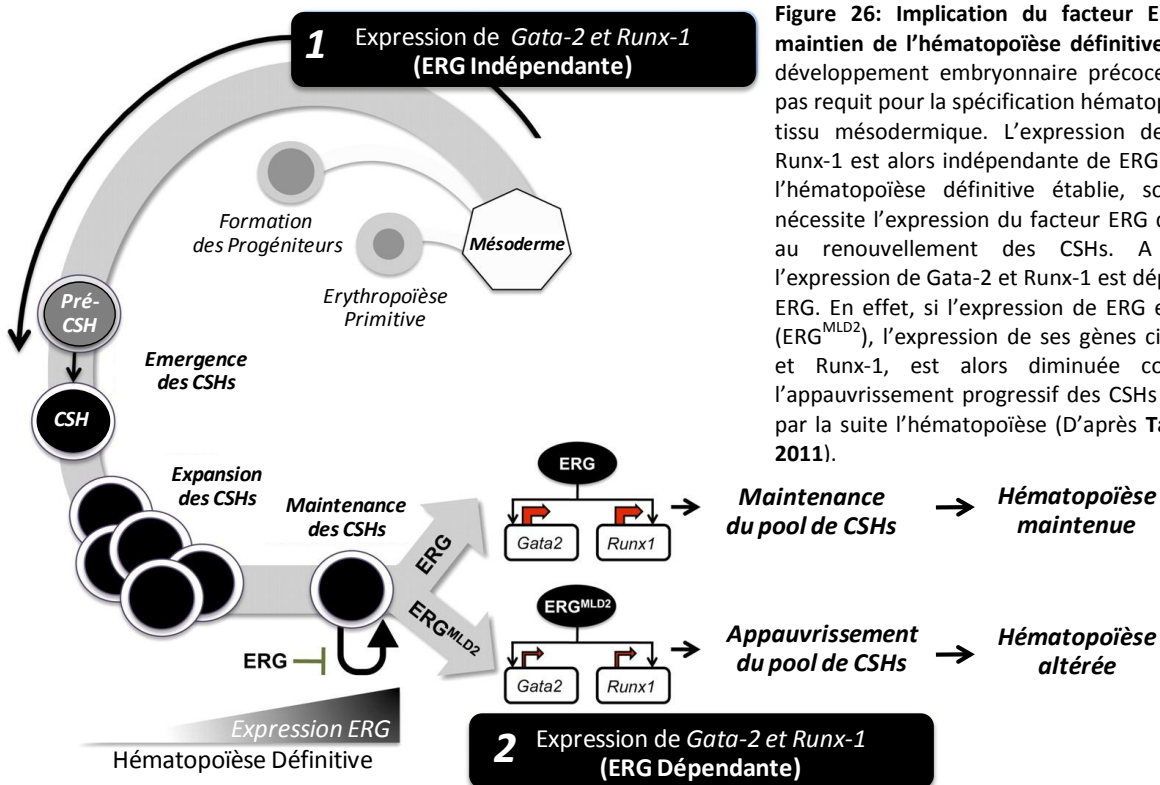
Plusieurs fonctions du facteur ERG lui ont été attribuées suite à l'analyse d'un modèle murin caractérisé par une mutation du gène *erg* qui ne perturbe pas son interaction à l'ADN mais ses capacités de transactivation pour l'expression de ses gènes cibles (**Loughran et al., 2008**).

En effet, ERG n'intervient pas lors du développement embryonnaire précoce et la spécification du tissu mésodermique en cellules souches hématopoïétiques (CSHs), mais il est nécessaire à la mise en place de l'hématopoïèse définitive chez l'embryon et pour la régulation et le maintien d'un pool de CSHs chez l'adulte (**Loughran et al., 2008**). Cette dernière fonction désigne ERG en tant que régulateur critique du nombre de CSHs lors d'un stress hématopoïétique, permettant ainsi le maintien d'un auto-renouvellement massif lorsque les besoins physiologiques s'en font sentir. Dans ce contexte expérimental, ce stress a été induit par une transplantation de moëlle osseuse, un renouvellement de l'hématopoïèse après une irradiation myélo-suppressive ou une déficience du récepteur de surface c-Mpl dont la thrombopoïétine, ligand de ce récepteur, régule la quiescence des CSHs et inversement, augmente leur renouvellement lorsqu'il est altéré (**Ng et al., 2011**).

D'un point de vue moléculaire, deux gènes cibles de ERG expliquent en partie ces phénotypes: les facteurs de transcription Runx-1 et Gata-2. Au cours du développement embryonnaire précoce,



l'émergence des CSHs requière l'expression de Runx-1 et Gata-2 indépendamment du facteur ERG. Une fois le système hématopoïétique mis en place, ERG intervient pour maintenir le renouvellement des CSHs. L'expression des facteurs Runx-1 et Gata-2 est alors gouvernée directement par ERG (Taoudi et al., 2011). A ce stade une diminution de l'expression de ERG n'altérerait pas l'hématopoïèse mise en place à partir d'une seule CSH, mais le pool de CSHs s'épuiserait rapidement par perte du maintien de son auto-renouvellement (Fig. 26).



**Figure 26: Implication du facteur ERG dans le maintien de l'hématopoïèse définitive.** 1. Lors du développement embryonnaire précoce, ERG n'est pas requis pour la spécification hématopoïétique du tissu mésodermique. L'expression de Gata-2 et Runx-1 est alors indépendante de ERG. 2. Une fois l'hématopoïèse définitive établie, son maintien nécessite l'expression du facteur ERG qui participe au renouvellement des CSHs. A ce stade, l'expression de Gata-2 et Runx-1 est dépendante de ERG. En effet, si l'expression de ERG est invalidée (ERG<sup>MLD2</sup>), l'expression de ses gènes cibles, Gata-2 et Runx-1, est alors diminuée conduisant à l'appauvrissement progressif des CSHs qui altérera par la suite l'hématopoïèse (D'après Taoudi et al., 2011).

Hormis le maintien des CSHs, ERG jouerait un rôle dans le blocage de la différenciation des lignées lymphocytaires B et T. La diminution progressive de son expression est corrélée à la différenciation de ces lignées en cellules matures (Anderson et al., 1999).

En conclusion, ERG participerait davantage au maintien des cellules hématopoïétiques indifférenciées et la diminution de son expression serait nécessaire à la différenciation des cellules immatures.

### 3. ERG et la cancérogenèse

#### a. ERG et Cancer Prostatique

Bien qu'en condition physiologique son expression n'ait pas été décrite au cours du développement des glandes prostatiques chez l'embryon ni au niveau de l'épithélium prostatique chez l'adulte, sa surexpression est néanmoins souvent décrite au sein de carcinomes prostatiques en comparaison aux tissus bénins (Petrovics et al., 2005 ; Rostad et al., 2007).

#### i. Cancer Prostatique

Le cancer de la prostate est le plus fréquent des cancers non cutanés chez l'homme avec plus de 190000 nouveaux cas chaque année (15% de l'ensemble des cancers masculins) en Europe avec un taux de mortalité atteignant 80000 décès par an (Bracarda et al., 2005). Au niveau biologique, 70 à 75% des cancers de la prostate touchent la zone périphérique de la glande, 15% dérivent de la zone centrale et 10 à 15% proviennent de la zone transitoire. Au total 95% de ces cancers correspondent à des adénocarcinomes (Bracarda et al., 2005).

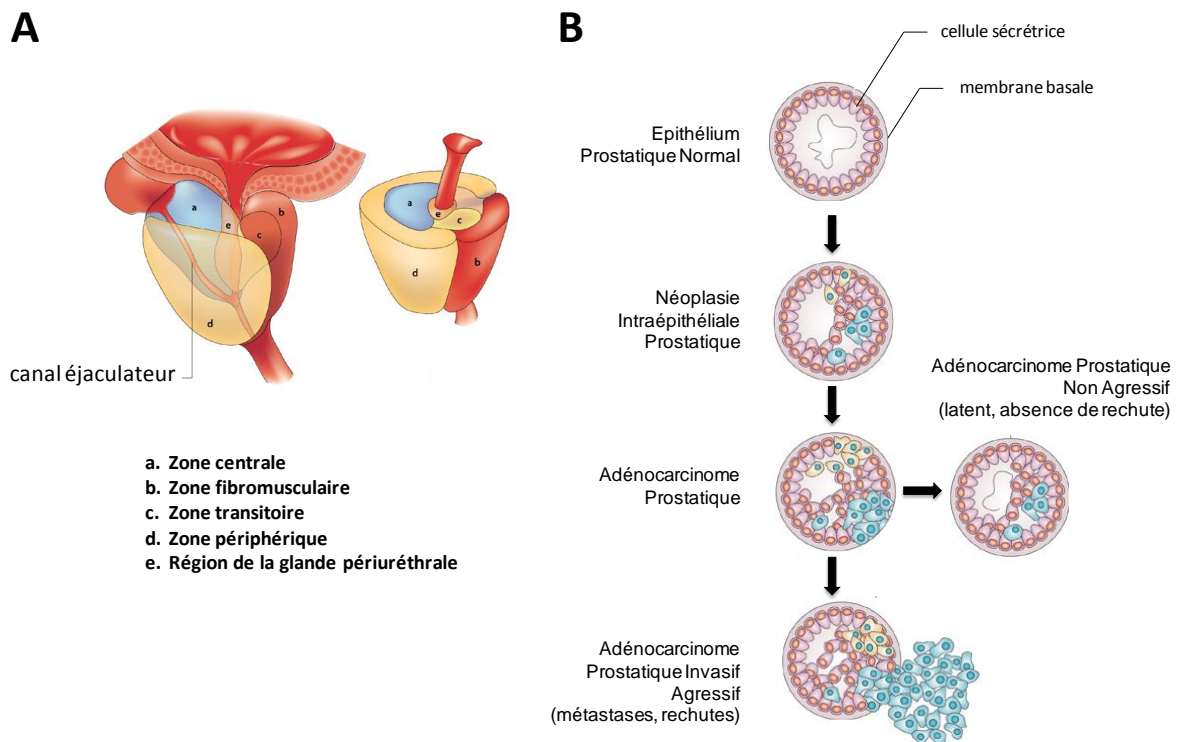


Figure 27: A. Représentation schématique des différentes zones du tissu prostatique. B. Evolution biologique du cancer de la prostate (D'après De Marzo et al., 2007 ; Witte et al., 2009).

Une fois le cancer initié, celui-ci peut évoluer vers un stade latent où la pathologie n'est pas ou peu détectable et peut donc être facilement occultée. Par contre, il peut tout aussi bien évoluer vers un

stade agressif où la dissémination des cellules cancéreuses aboutit à des métastases principalement au niveau du tissu osseux (**Fig. 27**). Moins fréquents, d'autres sites métastatiques sont décrits tels les ganglions, le foie ou le poumon (**Kumar-Sinha et al., 2008**).

Au sein d'un tissu prostatique peut régner une hétérogénéité tissulaire dont les altérations génétiques, le dysfonctionnement des voies de signalisations ou de tout autre mécanisme biologique conduit à l'apparition de cellules cancéreuses plus ou moins agressives. L'une de ces altérations implique le facteur de transcription ERG.

#### *ii. Détection de la surexpression du facteur ERG*

Comme pour tout cancer, le profil d'expression génique a donc été établi afin de mettre en avant les disparités transcriptomiques existantes entre le tissu cancéreux et le tissu sain. Ceci a permis la découverte de l'un des oncogènes les plus souvent surexprimés au sein du tissu cancéreux : le facteur ERG (**Petrovics et al., 2005 ; Rostad et al., 2007**). Identifié par puce à ADN et confirmé par Q-RT-PCR, ERG est surexprimé dans plus de 78% des tissus prostatiques cancéreux (étude sur 55 échantillons de patients, **Petrovics et al., 2005**). Parmi la famille des facteurs de transcription ETS, ERG reste l'oncogène prédominant en terme de surexpression. Celle-ci est 20 à 100 fois supérieure dans le tissu cancéreux par rapport au tissu bénin et cela dans plus de 50% des patients (étude sur 52 échantillons de patients, **Rostad et al., 2007**). Récemment, à ces données, s'ajoute la localisation tissulaire de cette surexpression principalement décrite dans la zone périphérique des glandes prostatiques cancéreuses, zone dont sont issues la majorité des adénocarcinomes (**Shaikhibrahim et al., 2012**). La surexpression du facteur ERG et sa localisation tissulaire suggèrent l'existence d'un lien étroit entre la dérégulation de son expression et la progression du cancer de la prostate.

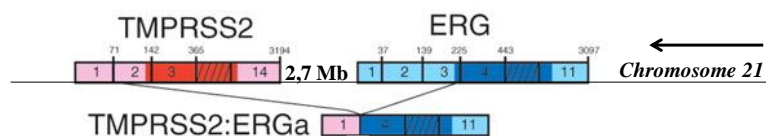
#### *iii. Surexpression ayant pour origine la translocation TMPRSS2-ERG*

##### *➤ Translocation TMPRSS2-ERG*

L'une des fusions découverte en 2005 par l'équipe de Scott Tomlins est venue préciser le mécanisme moléculaire contribuant à la surexpression du facteur ERG. Deux fusions géniques furent identifiées *TMPRSS2-ERG* et *TMPRSS2-ETV-1* (**Tomlins et al., 2005 ; Scheble et al., 2010**). L'incidence de 50 à 80% de la fusion *TMPRSS2-ERG* et sa limitation au cas de la prostate en font la fusion caractéristique de ce dernier (**Tomlins et al., 2005 ; Soller et al., 2006 ; Kumar-Sinha et al., 2008**). Parmi les fusions impliquant *TMPRSS2* et les facteurs de la famille *ETS*, *ERG* est prépondérant et est retrouvé dans plus de 90% des fusions alors qu'*ETV-1*, *ETV-4* et *ETV-5* sont beaucoup plus rares (1 à 5%) (**Tomlins et al., 2005 ; Kumar-Sinha et al., 2008**). Dans certaines cohortes ces fusions ont été associées à un mauvais pronostic, témoin d'une tumeur plus agressive (**Nam et al., 2007 ; Demichelis et al., 2007**). La découverte de duplications de la fusion du gène *TMPRSS2* avec deux ou plusieurs copies de la partie 3' du gène *ERG* est aussi corrélée à un mauvais pronostic (**Attard et al., 2008**).

➤ Mécanisme moléculaire et implication dans la pathologie

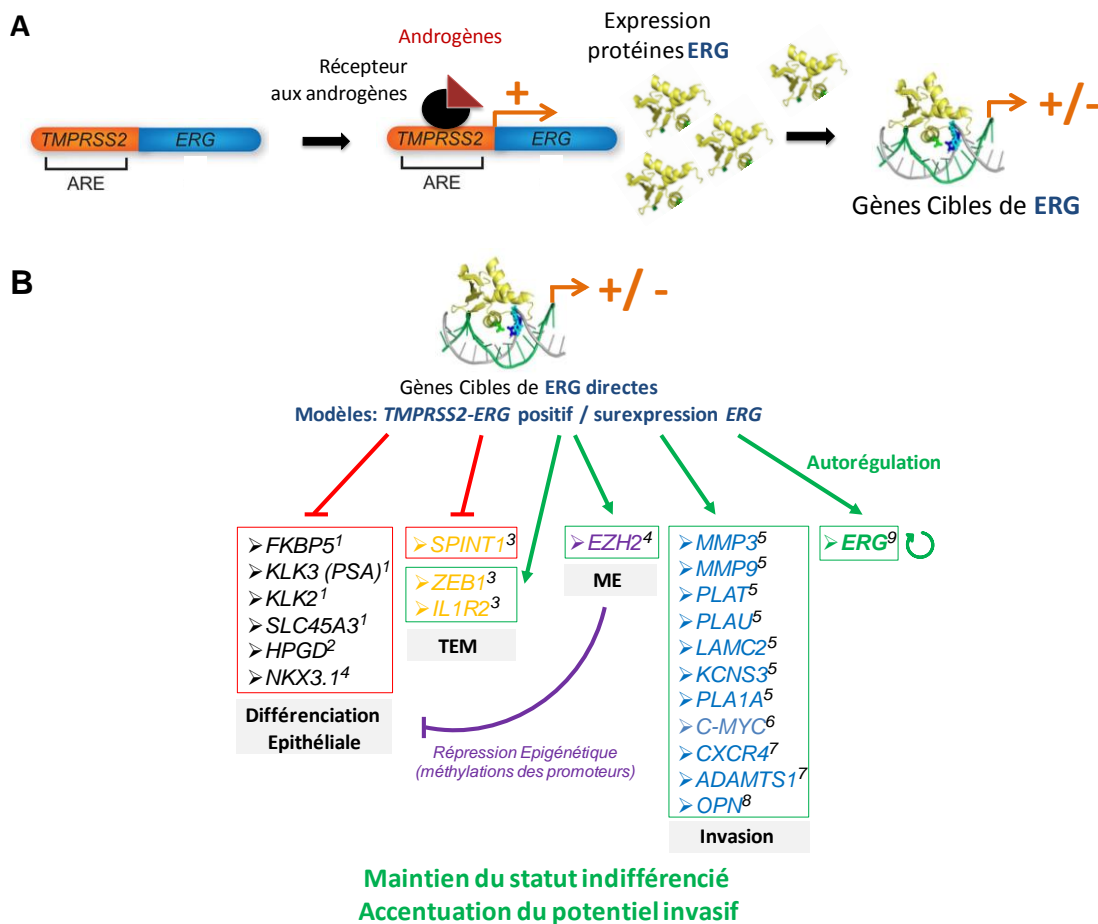
D'un point de vue moléculaire, cette fusion relie l'extrémité 5'UTR (*untranslated region* : région non transcrite) du gène *TMPRSS2*, gène codant pour une sérine protéase transmembranaire sensible aux androgènes et spécifique du tissu prostatique, à la partie codante du gène *ERG* (**Fig. 28**).



**Figure 28: Représentation schématique de la fusion *TMPRSS2-ERG*.** Les régions non transcrites sont représentées en rose (pour *TMPRSS2*) et bleu clair (pour *ERG*) et les régions transcrites sont indiquées en rouge (pour *TMPRSS2*) et bleu foncé (pour *ERG*). Les exons codants non indiqués sont représentés par des rectangles hachurés. *ARE* : *Androgen Responses Elements* (D'après Tomlins et al., 2005).

La fusion aboutit à l'expression d'une protéine ERG complète ou déletée de quelques acides aminés aminoterminaux. La protéine ERG contient donc son domaine ETS, domaine d'interaction à l'ADN, et son domaine transactivateur. Par conséquent, la fusion de ces gènes aboutit à l'expression du gène ERG sous le contrôle du promoteur du gène *TMPRSS2*, promoteur contenant des éléments de réponses aux androgènes (*ARE* pour *Androgen Responses Elements*). Les récepteurs aux androgènes entraînent la différenciation épithéliale, et son hyper-activation par des mutations génétiques favorise la tumorigénèse. D'autres altérations moléculaires (comme la fusion *TMPRSS2-ERG*) sont nécessaire à la progression tumorale et métastatique à travers la reprogrammation épigénétique (médié par EZH2) et la dédifférenciation épithéliale du tissu prostatique. Dans le contexte du cas du cancer de la prostate hormono-dépendant, l'expression du facteur ERG est sous la régulation des androgènes et est donc fortement activée, ce qui provoque la modulation beaucoup plus intense des gènes cibles de ERG (**Fig. 29. A**).

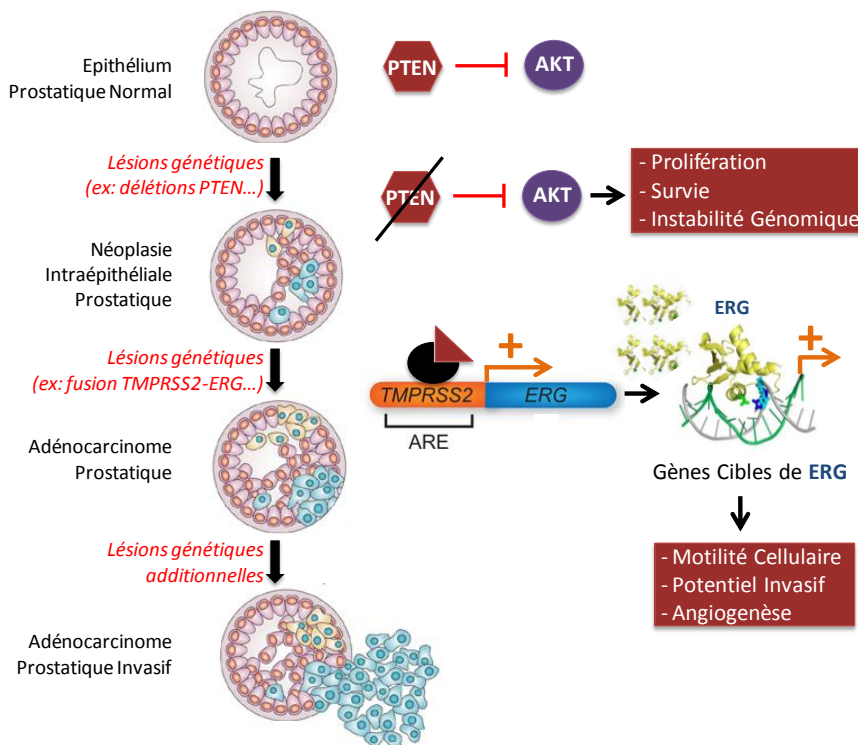
Les différents gènes cibles directs du facteur ERG déterminés par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sont en cohérence avec le phénotype invasif observé dans des adénocarcinomes prostatiques où sa surexpression, dans un contexte pathologique, provoque l'activation de gènes impliqués dans la migration cellulaire, l'angiogenèse ou la répression de gènes nécessaires à la différenciation des cellules épithéliales. L'ensemble de ces modulations transcriptionnelles contribue ainsi au maintien du statut indifférencié de l'adénocarcinome prostatique facilitant sa progression tumorale (**Fig. 29. B**).



**Figure 29: A. Fusion *TMPRSS2-ERG* et modulation de l'expression de ERG et de ses gènes cibles. ARE : Androgen Responses Element (D'après Witte et al., 2009). B. Implication dans le développement du cancer de la prostate de quelques gènes cibles du facteur ERG, identifiés par CHIP au sein de modèles cellulaires positifs pour la fusion *TMPRSS2-ERG* ou surexprimant ERG. TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse, ME: Modulation Epigénétique (1. Yu et al., 2010 ; 2. Mohamed et al., 2011 ; 3. Leshem et al., 2011 ; 4. Kunderfranco et al., 2010 ; 5. Tomlins et al., 2008 ; 6. Sun et al., 2008 ; 7. Carver et al. 2009 ; 8. Flajollet et al., 2011 ; 9. Mani et al., 2011).**

Bien que cette fusion génétique ait une incidence conséquente dans le cancer de la prostate, elle ne peut conduire à elle seule à l'apparition de l'adénocarcinome prostatique. Des expérimentations *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de souris montrent que cette fusion ou la surexpression de ERG contribuent certes au potentiel invasif de la tumeur mais ne suffisent pas à la transformation de cellules prostatiques bénignes (Tomlins et al., 2008 ; Klezovitch et al., 2008 ; Casey et al., 2012). Ceci suggère l'implication de ces événements moléculaires comme des altérations conjointes à d'autres mécanismes cellulaires telle l'activation de voies de signalisation impliquant PTEN (*Phosphatases and TENing homolog*), protéine phosphatase décrite comme suppresseur de tumeur. Celle-ci a pour cible des protéines clés de voies de signalisations régulant la prolifération ou la survie cellulaire. Son inactivation est souvent décrite dans les cancers. En effet, nombre d'adénocarcinomes prostatiques *TMPRSS2-ERG*-positifs présentent une expression de PTEN réduite ou absente. La faible activité de PTEN diminue son action répressive sur les voies de signalisation proliférative (comme la voie

PI3K/AKT) accentuant la progression tumorale vers un adénocarcinome invasif (**Fig. 30**) (**Carvey et al., 2009 ; King et al., 2009 ; Zong et al., 2009**).



**Figure 30: Modèle d'évolution du cancer de la prostate impliquant à la fois une altération des voies de signalisation en tant qu'élément initiateur et une altération génétique caractérisée par la fusion *TMPRSS2-ERG* accentuant la progression tumorale vers un adénocarcinome prostatique plus invasif (D'après Squire et al., 2009 ; Witte et al., 2009).**

Des altérations additionnelles peuvent aussi contribuer à cette progression tumorale comme la dérégulation de la réponse aux androgènes à travers la surexpression de son récepteur (**Zong et al., 2009 ; Yu et al., 2010 ; Chng et al., 2012**).

#### 4. ERG et Leucémies

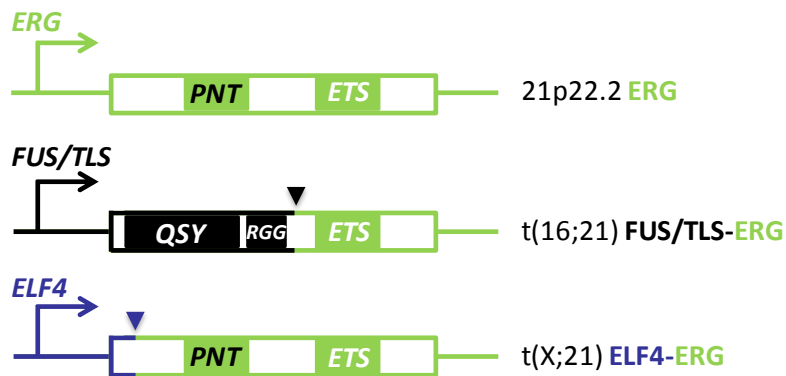
Le cancer de la prostate n'est pas le seul tissu tumoral témoin de translocations et/ou surexpression de ERG. Bon nombre de leucémies présente ce dysfonctionnement à l'instar des leucémies aiguës myéloïdes touchant la lignée mégacaryocytaire (LAM-K) ou érythrocytaire (Erythroleucémie) ou encore des LAL de type T (LAL-T).

##### a. LAM

En clinique, une surexpression du facteur ERG est fréquemment associée à un mauvais pronostic des LAM-CN et certaines LAMs à caryotype complexe (**Marcucci et al., 2005 ; Metzeler et al., 2009 ; Baldus et al., 2004**).

Outre sa surexpression, plusieurs translocations impliquent ERG. C'est le cas de la fusion *TLS/FUS-ERG* t(16;21), où le gène *TLS* (*FUS, fused in sarcoma*) code pour une protéine d'interaction à l'ARN;

et la fusion *ELF4-ERG* t(X;21), où le gène *ELF4* est un membre de la famille des facteurs ETS (**Choi et al., 2006 ; Kim et al., 2009 ; Moore et al., 2006**). Ces deux translocations mettent en jeu l'extrémité 5' du gène *TLS/FUS* ou *ELF4* qui fusionne avec la partie 3' du gène *ERG*, comprenant son domaine ETS (**Fig. 31**). L'expression des protéines de fusion est ainsi sous le contrôle des promoteurs du gène *TLS/FUS* et *ELF4*.



**Figure 31: Représentation schématique du gène *ERG* et de ses translocations.** Les triangles indiquent les points de cassures et les flèches renseignent sur le promoteur du gène qui dirige l'expression de *ERG* ou des translocations. *ETS* correspond au domaine d'interaction à l'ADN. QSY : domaine riche en glutamine-sérine-tyrosine, RGG: séquence répétée arginine-glycine-glycine.

La fusion *TLS/FUS-ERG*, relativement rare et détectée dans les LAM-K, est capable de bloquer la différenciation de progéniteurs myéloïdes et de promouvoir leur prolifération. Néanmoins, l'induction directe de leucémies n'est pas décrite pour cette fusion qui nécessite vraisemblablement d'autres altérations coopératives (**Pan et al., 2008 ; Warner et al., 2005**).

Par ailleurs, la surexpression du facteur *ERG*, par l'augmentation du nombre de copies de son gène, dans des progéniteurs hématopoïétiques contribue au développement des LAM-K avec un arrêt de la différenciation mégacaryocytaire et dont le phénotype est causé par la mutation du facteur de transcription *GATA-1* (**Rainis et al., 2005 ; Salek-Ardakani et al., 2009 ; Stankiewicz et al., 2009**). Ce phénotype leucémique est présent chez 10% des enfants atteints du syndrome de Down (trisomie 21, chromosome porteur du gène *ERG*) qui peuvent présenter dès leur naissance des leucémies mégacaryocytaires transitoires évoluant en LAM-K chez 1/5 des patients.

#### b. LAL

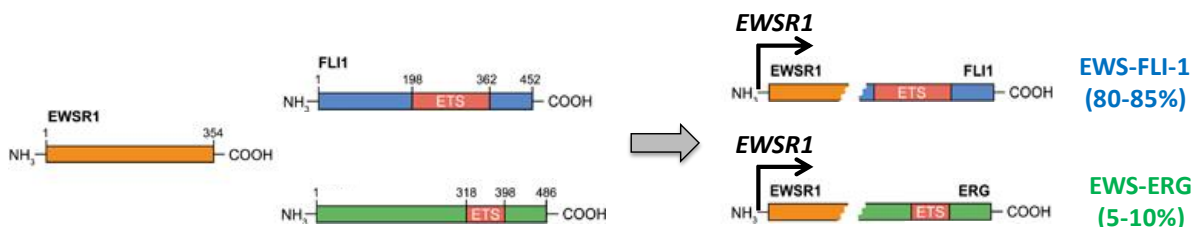
A l'identique, la surexpression de *ERG* est décrite dans les LAL-T et est souvent associée à un mauvais pronostic en terme de rechute et de survie (**Baldus et al., 2006**). Dans les LAL-T, *ERG* est également exprimé sous forme de protéine de fusion *TLS/FUS-ERG* (**Kanazawa et al., 2005**). Sa surexpression contribue au développement de LAL-T et son extinction réduit le caractère prolifération des leucémies suggérant ainsi une contribution oncogénique du facteur *ERG* dans le phénotype leucémique (**Thoms et al., 2011**). L'altération de son expression peut également être en lien avec des modulations transcriptionnelles telles l'activation de facteurs de transcription (SCL, LYL-1, LMO-L...) au sein des cellules humaines de LAL-T alors que ces mêmes oncogènes sont inactifs dans les cellules T normales (**Thoms et al., 2011**).

Contrairement aux carcinomes prostatiques où l'implication de ERG a une plus forte incidence, peu de données expérimentales décrivent comment la surexpression et/ou la translocation de ce facteur impacte le système hématopoïétique et en quelle mesure ce phénomène contribue au statut leucémique. Néanmoins, sa surexpression *in vivo* provoque à la fois une LAL-T (expansion des cellules T et des progéniteurs hématopoïétiques accompagnée d'une altération de leur différenciation), une érythroleucémie (accumulation d'érythroblastes) et régule l'expression de protéines nécessaires à son potentiel oncogène (Kinsey et al., 2006 ; Smith et al., 2006). A l'inverse, l'extinction de son expression atténue la prolifération des cellules leucémiques humaines (Tzuzuki et al., 2011 ; Carmichael et al., 2012).

*Ainsi, si ERG est nécessaire au maintien du statut indifférencié du carcinome prostatique et des cellules leucémiques, il ne suffit pas à lui seul pour induire le processus tumoral et leucémique.*

### c. ERG et Sarcomes d'Ewing

Les sarcomes d'Ewing correspondent à une forme de tumeur primaire touchant préférentiellement l'os, principalement ceux des membres inférieurs et sont essentiellement diagnostiqués chez de jeunes adultes. Environ 1/4 des sarcomes d'Ewing surviennent dans les tissus mous plutôt que l'os et presque 1/4 des patients présentent des métastases détectables au diagnostic, essentiellement pulmonaires. 5 à 10% des sarcomes d'Ewing présentent la translocation t(11;21) *EWSR1-ERG*. Ce réarrangement inclut la partie 3' du gène *EWSR1* (*Ewing sarcoma breakpoint region 1*, codant pour la partie aminotermine de la protéine EWS, un membre de la famille des protéines TET) fusionné avec la partie 5' du gène *ERG*, incluant le domaine ETS (Fig. 32) (Sorensen et al., 1994). L'expression de la protéine de fusion résultante est alors guidée par la régulation de l'expression de EWS, dont son promoteur est actif de manière ubiquitaire. Par ailleurs, la partie aminotermine de ce partenaire fournit un domaine de transactivation très actif suggérant une expression conséquente de la protéine de fusion et dont le domaine ETS lui permet de conserver sa capacité d'interaction à l'ADN.



**Figure 32: Représentation schématique des deux fusions prédominantes au sein du sarcome d'Ewing (80 à 85% pour la fusion EWS-FLI-1 et 5 à 10% pour EWS-ERG). Dans les deux cas le domaine ETS d'interaction à l'ADN est conservé et l'expression des gènes de fusion est contrôlée par le promoteur du gène *EWSR1* (D'après Wang et al., 2012).**



Cette protéine de fusion est capable d'induire la transformation *in vivo* de progéniteurs mésenchymateux en sarcomes mais aussi de précurseurs lymphocytaires en cellules T leucémiques (Codrington et al., 2005).

Les sarcomes d'Ewing peuvent parfois présenter la fusion *TLS/FUS-ERG*, impliquée dans les LAM, mais l'incidence de cette fusion est très faible (Shing et al., 2003).

## 5. Autres facteurs ETS en cancérologie

La fusion *EWRSI-ERG* est plus rare que la fusion t(11;22) *EWRSI-FLI-1* que présente plus de 80% des sarcomes d'Ewing devenant ainsi l'altération de référence de cette pathologie (Fig. 32) (Ordóñez et al., 2009). La présence de cette protéine de fusion semble être critique pour le phénotype tumoral puisque son extinction par siRNA diminue la prolifération de cellules de sarcomes d'Ewing (Dohjima et al., 2003). EWS-FLI-1 est à la fois un activateur transcriptionnel (hérité de la partie FLI-1) et un partenaire protéique (hérité de la partie EWS). La fusion de ces deux fonctions permet l'interaction avec des facteurs de transcription du complexe de base tels l'ARN polymérase II, l'ARN hélicase A (RHA) ou encore le corépresseur protéique NROB1 (*nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1*). En tant que facteur de transcription, il induit la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (ex : *p21...*), la régulation transcriptionnelle (ex : *EZH2...*) et la répression de gènes nécessaires au processus apoptotique (ex: *caspase 3...*), gènes dont l'expression contribue au phénotype tumoral (Erkizan et al., 2010). Toujours à l'échelle génomique, cette protéine de fusion orchestre et maintient une architecture chromatinienne favorable à la transcription de gènes à travers la déplétion des structures nucléosomiques (Patel et al., 2012).

Par ailleurs, le processus cancérogène, davantage étudié pour la fusion EWS-FLI-1, serait probablement similaire à l'oncogène EWS-ERG, de part la similitude des phénotypes observés en clinique (Ginsberg et al., 1999).

Le gène *FLI-1* est aussi impliqué dans la fusion t(1;11) *SLC45A3-FLI-1* à l'instar d'autres membres de la famille ETS tels *ETV1*, *ETV4* ou encore *ETV5* avec le gène *TMPRSS2* dépeint dans le cancer de la prostate mais leurs incidences sont beaucoup plus faibles que celle de la fusion *TMPRSS2-ERG* (Paulo et al., 2011; Rubin et al., 2011).

## 6. Cancer de la prostate et sarcome d'Ewing: traitements actuels.

De nos jours, le cancer de la prostate et le sarcome d'Ewing sont toujours traités par des chimiothérapies conventionnelles ou par hormonothérapie.

Plusieurs options thérapeutiques sont disponibles pour le cancer de la prostate qui diffère selon le diagnostic établi. Il est évalué par le dosage d'un marqueur tumoral, l'antigène spécifique de la

prostate (PSA), correspondant à une sérine protéase sécrétée par les cellules épithéliales. Une teneur élevée en PSA est témoin d'un risque d'occurrence de cancer prostatique. Ce dosage est associé à la détermination du stade clinique et du score de Gleason (classification selon la sévérité du cancer sur la base histologique du tissu cancéreux) (**Bracarda et al., 2005**). De manière générale, les patients avec un cancer localisé (confiné à la prostate, détectable mais asymptomatique), bénéficie de la chirurgie (prostatectomie) ou d'une radiothérapie tandis que les patients ayant un cancer avancé localement ou métastatique sont soignés par radiothérapie ou par thérapie privative en androgènes (orchidectomie et/ou hormonothérapie). L'utilisation de la chimiothérapie est ici beaucoup plus rare. L'hormonothérapie consiste en l'inhibition de l'activité des androgènes, notamment de la testostérone nécessaire au développement de la tumeur. Celle-ci est relayée d'un part par des analogues ou des antagonistes de la LH-RH (*luteinizing-hormone releasing-hormone*) à l'exemple de la leuproréline et d'autre part, par l'inhibition du récepteur aux androgènes (flutamide, bicalutamide...). Néanmoins les patients initialement sensibles à l'hormonothérapie peuvent devenir réfractaires à cette privation hormonale qui n'est plus apte à freiner la progression tumorale (**Schroder et al., 2012**).

A l'inverse la chimiothérapie est largement utilisée dans le traitement des sarcomes d'Ewing alternant des cycles de vincristine-doxorubicine-cyclophosphamide (VDC) et d'ifosfamide-étoposide (IE) où peuvent s'ajouter la chirurgie et/ou la radiothérapie (**Grier et al., 2003**). Malheureusement 15 à 25% des patients se présentent lors du diagnostic avec des métastases, constituant le pronostic le plus défavorable en lien avec des taux de rémission très faible.

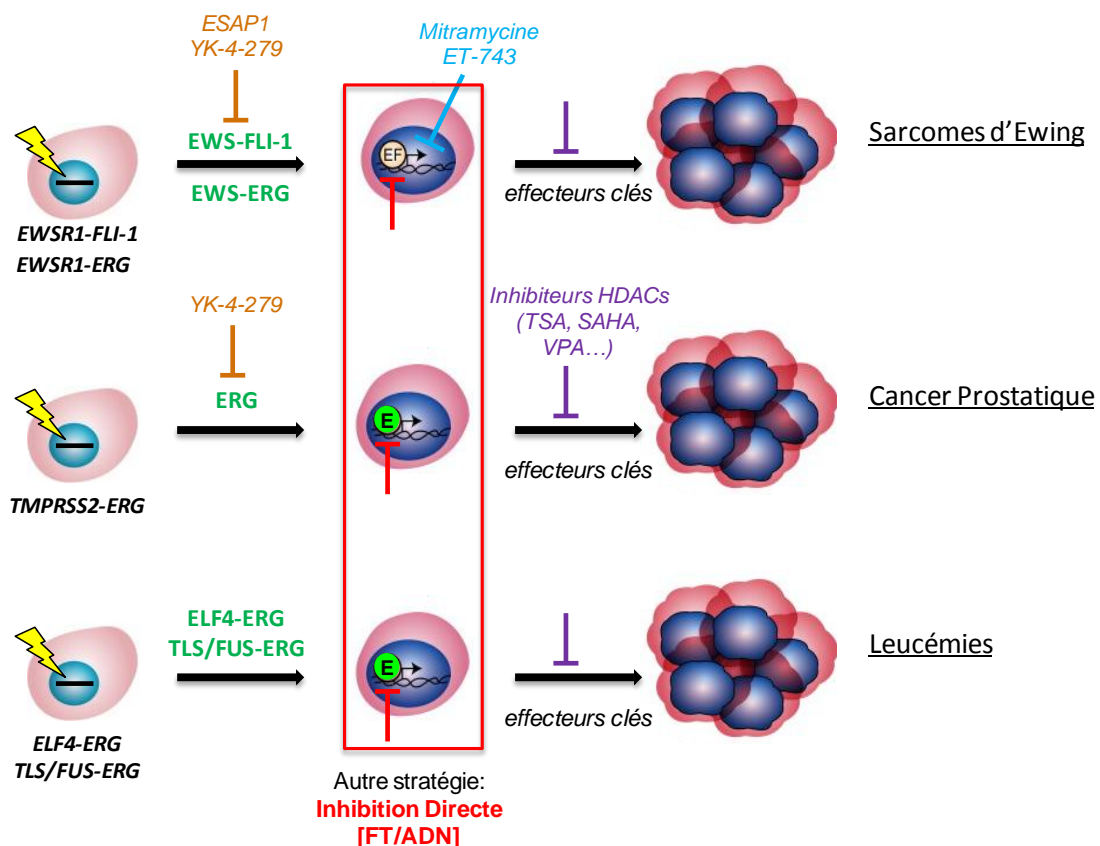
## 7. Ciblage moléculaire des facteurs ETS

A l'heure actuelle, aucune thérapie ciblant le facteur ERG ou ses protéines de fusion n'est utilisée en clinique. Au niveau expérimental, certains projets ciblent les facteurs ETS mais cela reste néanmoins faible au regard de l'implication de ces protéines en cancérologie en particulier dans le cancer de la prostate et le sarcome d'Ewing. Toutefois, leurs implications et particulièrement celle du facteur de transcription ERG a permis d'envisager le développement de nouvelles thérapies ciblant l'oncogénicité du facteur ERG ou de son homologue FLI-1 (notamment pour les sarcomes d'Ewing). Deux concepts ont alors été étudiés: 1) moduler l'interaction protéine-protéine, en particulier lorsque le complexe formé contribue à l'oncogénèse, et 2) s'intéresser à l'inhibition d'effecteurs essentiels au potentiel oncogène.

Le premier concept a permis l'inhibition de l'interaction de EWS-FLI-1 avec l'ARN hélicase A, complexe nécessaire au maintien du processus tumoral. Sa formation est modulée par un peptide ESAP1, mimétique de la région d'interaction de l'ARN hélicase A sur EWS-FLI-1, et dont son interaction directe avec le peptide réduit la prolifération et altère la fonction de la protéine de fusion EWS-FLI dans des modèles cellulaires de sarcomes d'Ewing (**Erkizan et al., 2011**). Ces fonctions sont

tout autant modulées avec la molécule YK-4-279 et particulièrement son énantiomère (S)-YK-4-279 (Erkizan et al., 2009 ; Barber-Rotenberg et al., 2012). Cette même molécule interfère dans l'activité transcriptionnelle des facteurs ERG et ETV-1 diminuant la motilité et l'invasion de cellules cancéreuses prostatiques mais ne résulte pas d'une inhibition directe de l'interaction à l'ADN des facteurs ETS (Rahim et al., 2011). D'autres molécules, telle que la mithramycine et l'alkylant du petit sillon ET-743, sont aussi capable de moduler l'expression de gènes ciblés par la protéine de fusion EWS-FLI-1 à l'instar du corépresseur NR0B1 (Grohar et al., 2011a ; Grohar et al., 2011b).

Le deuxième concept s'intéresse aux effecteurs clés de l'oncogenèse tels les modulations épigénétiques induites par le facteur ERG. Ce dernier est en effet capable d'inhiber les histones acétylase transférase (HATs) et son expression corrèle avec la surexpression de celle de certaines histones déacétylases (HDACs). L'utilisation d'inhibiteurs des HDACs permet alors de modifier la signature transcriptionnelle du facteur ERG et d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques positives pour la fusion TMPRSS2-ERG (Fig. 33). (Bjorkman et al., 2008 ; Forston et al., 2011).



**Figure 33: Thérapies ciblées mises en œuvre pour l'inhibition des facteurs de transcription ETS et des protéines de fusion résultantes.** L'encadré rouge met en exergue une autre stratégie thérapeutique qui vise à inhiber l'interaction à l'ADN du facteur de transcription, concept de thérapie dont font l'objet mes travaux de thèse. EF : EWS-FLI-1 ; E : ERG ; TSA : TrichoStatin A ; SAHA : SuberoylAnilide Hydroxamic Acid ; VPA : ValProic Acid.

Malgré ces avancées expérimentales et l'implication croissante des facteurs ETS, aucune de ces thérapies n'est entrée en essais cliniques pour l'inhibition de cette famille de facteurs de transcription.

Etant donné le rôle fonctionnel des facteurs de transcription, une autre stratégie peut s'ajouter à ces concepts thérapeutiques à savoir l'inhibition directe du facteur de transcription oncogène aux promoteurs de ses gènes altérant ainsi en amont son oncogénicité.

*L'activité aberrante d'un facteur de transcription est ainsi le résultat de nombreux mécanismes qui in fine modulent l'expression de gènes cibles en lien avec le processus de tumorigenèse. Cette famille de protéines jusqu'ici très peu ciblée pourrait devenir, sur la base de la compréhension des mécanismes moléculaires, des cibles de choix ayant la possibilité d'être une alternative aux chimiothérapies actuelles.*

*C'est ainsi que depuis ces dernières années, à travers la compréhension des aspects moléculaires et génétiques des cellules cancéreuses, quelques thérapies ciblées ont vu le jour et sont couramment administrées, venant révolutionner le champ de la thérapie cancéreuse.*

## **C. Des Chimiothérapies Cancéreuses aux Thérapies Ciblées : Une Révolution Thérapeutique**

### **1. Chimiothérapies Cancéreuses : quelques exemples**

Terme inventé par le chimiste Paul Ehrlich au début des années 1900, la chimiothérapie désigne l'utilisation de substances chimiques pour le traitement des cancers (**Strebhardt et al., 2008**). L'avènement des chimiothérapies remonte à 1942 lorsque les pharmacologistes Louis Goodman et Alfred Gilman étudiaient le potentiel thérapeutique de certaines toxines utilisées par l'industrie des armes chimiques, lors de la première guerre mondiale, tels les gaz de moutarde azotée. C'est ainsi qu'ils décelèrent une régression tumorale, bien que temporaire, chez un patient atteint de lymphome non Hodgkinien avancé après injection de mustine (méchloréthamine), prototype chimiothérapeutique des gaz de moutardes azotée (**Gilman, 1963**). L'administration par voie systémique de molécule capable de réduire la masse tumorale fut alors établie comme alternative thérapeutique à la chirurgie et à la radiothérapie dominant jusqu'alors le champ thérapeutique de la cancérologie (**Chabner et al., 2005; DeVita et al., 2008**). Le mode d'action, découvert plus tard, définira la moutarde azotée et les dérivés qui en découleront comme des alkylants de l'ADN qui forment des liaisons covalentes avec les bases puriques de la double hélice de l'ADN (**Fig. 34**). Mais très vite, les phénomènes de résistance firent leur apparition.

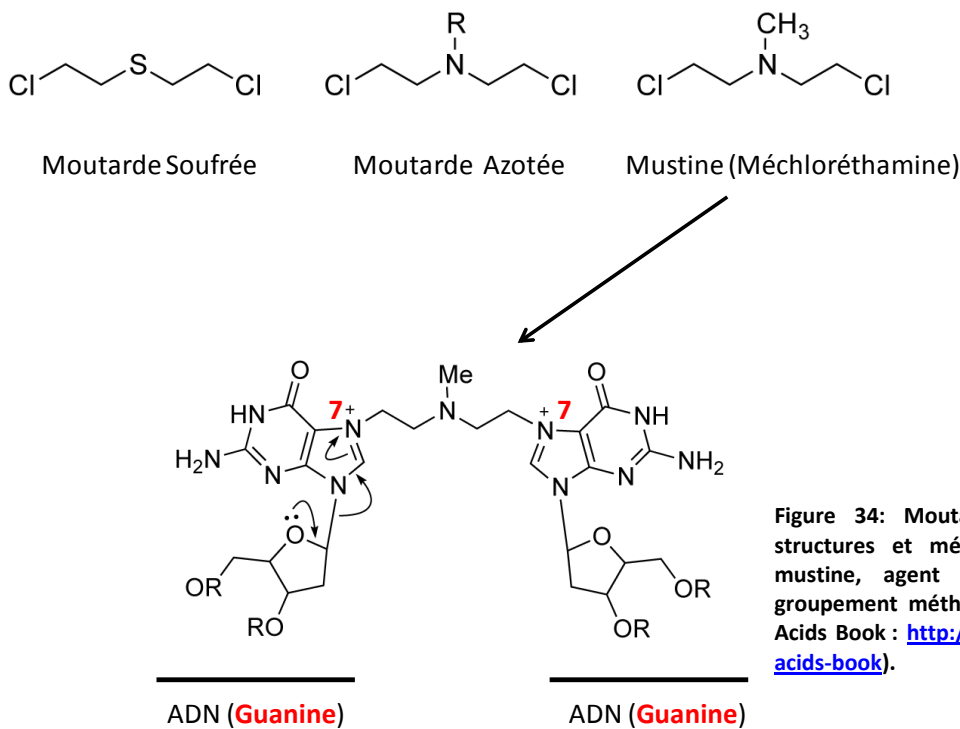
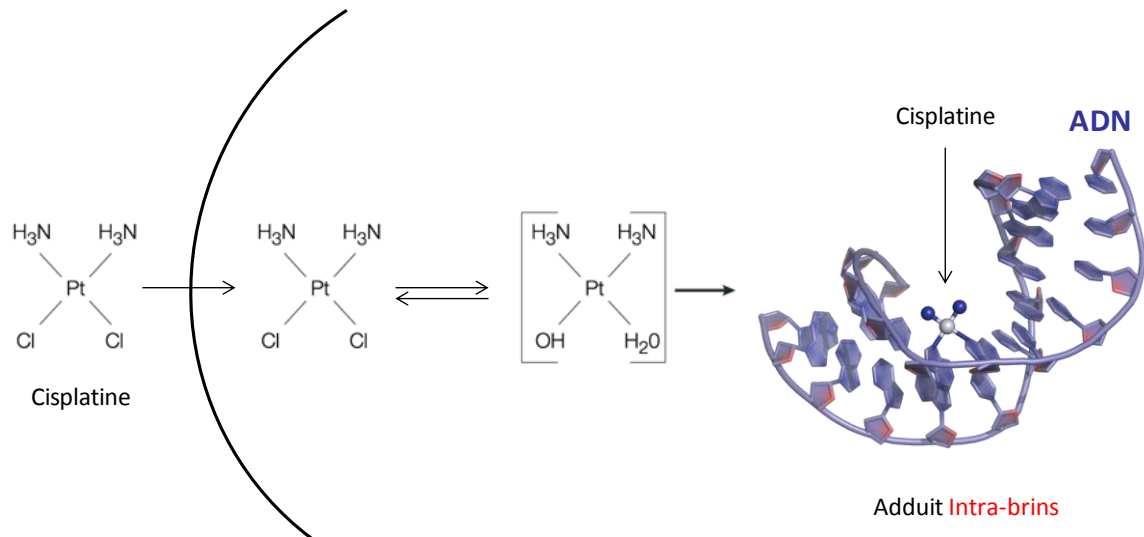


Figure 34: Moutardes soufrée et azotée: structures et mécanismes d'actions de la mustine, agent alkylant de l'ADN (Me: groupement méthyl) (D'après Online Nucleic Acids Book : <http://www.atdbio.com/nucleic-acids-book>).

#### a. Les Sels de Platine : Alkylants modèles

Les propriétés biologiques du cisplatine furent découvertes de manière fortuite en 1965 par le chimiste Barnett Rosenberg s'intéressant à l'impact du champ électromagnétique dans le processus de division cellulaire des bactéries *Escherichia coli*. Sous l'effet du champ électromagnétique, Rosenberg et al. constatèrent l'accroissement considérable de la taille des bactéries ainsi que leur incapacité à se diviser. Ce phénomène tirait son origine, non pas du courant électrique, mais des électrodes de platine utilisées pour le générer et en particulier des sels de platines engendrés dont le cisplatine (**Rosenberg, et al., 1965**). Jusqu'alors, aucun lien n'avait été établi entre les sels de platine et leur potentiel cytotoxique bien que la structure et la synthèse du cisplatine furent déterminées un siècle auparavant. Ses effets cytotoxiques sont dus en majeure partie à ses liaisons covalentes avec la double hélice de l'ADN. Une fois dans le compartiment intracellulaire, le cisplatine subit une réaction « d'aquation » correspondant à la substitution des molécules de chlore par des molécules d' $H_2O$  lui permettant ainsi de se lier de manière covalente à l'ADN (formation d'adduits irréversibles) sur l'azote en position 7 du noyau imidazole des purines (N7) (souvent la guanine, plus rarement l'adénine) orienté dans le grand sillon de la double hélice (**Fig. 35**). Des adduits monofonctionnels (mono-adduits) ou bifonctionnels (bi-adduits) sont ainsi formés avec une prépondérance pour les adduits intrabrins entre deux guanines adjacentes (1,2d(GpG), 65% des adduits). Ces adduits causent une distorsion notable de la double hélice d'ADN reconnue par un ensemble de protéines cellulaires, impliquées, pour certaines, dans les voies de réparation de l'ADN, qui *in fine* conduit le plus souvent à

la mort des cellules par apoptose (**Kelland, 2007**). Néanmoins, comme toute molécule interagissant avec l'ADN, l'efficacité d'une liaison dépend de l'accessibilité de l'ADN. L'encombrement stérique de l'ADN par ces protéines peut moduler l'efficacité cytotoxique du cisplatine et évoluer selon le statut épigénétique de la cellule. En effet, ce composé présente une préférence pour les liaisons internucléosomales plutôt qu'intranucléosomales (**Galea et al., 2002**).



**Figure 35** : Interaction du cisplatine avec l'ADN (D'après Kelland, 2007 ; Online Nucleic Acids Book : <http://www.atdbio.com/nucleic-acids-book>).

#### *i. Cisplatine et interférence avec la fixation à l'ADN de protéines*

La déformation induite par les adduits du cisplatine peut être reconnue par les protéines à boîte HMG (*High Mobility Group*). Ces facteurs de transcription sont capables d'exercer un effet protecteur des lésions de l'ADN induites par le cisplatine, en particulier les adduits intra-brins de type 1,2d(GpG) plus affins pour la protéine HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*). Après avoir reconnu cet adduit, la protéine HMGB1 est susceptible d'induire, seule ou en complexe, une déformation locale encore plus accentuée par interaction au sein du petit sillon. La distorsion résultante bloque l'accès des acteurs protéiques des voies de réparations telle la voie NER (*Nucleotide Excision Repair*) (**Woźniak et al., 2002 ; McCauley et al., 2007**).

L'efficacité du cisplatine en chimiothérapie se confirma en 1978 contre les cancers testiculaires puis les cancers ovariens. Néanmoins, la néphrotoxicité, la toxicité émétique et la neurotoxicité observées suite au traitement furent un obstacle majeur à son utilisation et d'autres sels de platine ont été développés depuis comme substituant thérapeutique tel le carboplatine moins toxique puis l'oxaliplatine pour les cancers colorectaux, les adénocarcinomes ou encore le cancer du pancréas (**Kelland, 2007**).

## b. ET-743 : Emergence d'une nouvelle classe d'agents alkylants

Approuvé par la Commission Européenne pour le traitement des sarcomes des tissus mous réfractaires en 2007 et en combinaison pour le traitement des rechutes de cancers ovariens sensible au platine en 2009, l'ET-743 illustre le développement d'une nouvelle classe d'agents anticancéreux d'origines marines dont l'hépatotoxicité est la principale observation clinique. Extrait d'un organisme marin de la famille des tuniciers (*Ecteinascidia turbinata*), son activité antitumorale est démontrée depuis 1969 mais son développement se heurte, comme de nombreux composés, à une extraction laborieuse. Néanmoins, cette difficulté disparaît face à une synthèse basée sur un processus semi-synthétique à partir de la cyanosafraïne B, antibiotique obtenu par fermentation d'une bactérie *Pseudomonas fluorescens* (Cuevas et al., 2009). Cette tétra-hydro-isoquinoline est composée de trois groupements A, B et C avec une fonction carbinolamine hautement réactive reliant les cycles A et B au cycle C. L'ET-743 est en premier lieu dépeint comme un alkylant et contrairement aux alkylants traditionnels qui interagissent avec les atomes d'azote ou d'oxygène en position N7 ou O6 des guanines au niveau du grand sillon de l'ADN, sa fonction carbinolamine réagit avec l'azote du groupement amine exocyclique en position N2 des guanidines orientées vers le petit sillon (Fig. 36). L'ET-743 est sélectif de certaines séquences riches en paires de bases GC et ses adduits générés en présence d'ADN double brin, ont la particularité d'être réversibles en condition dénaturante et d'induire une courbure de la double hélice d'ADN dirigée vers le grand sillon (David-Cordonnier et al., 2005 ; Molinski et al., 2009 ; D'Incalci et al., 2010).

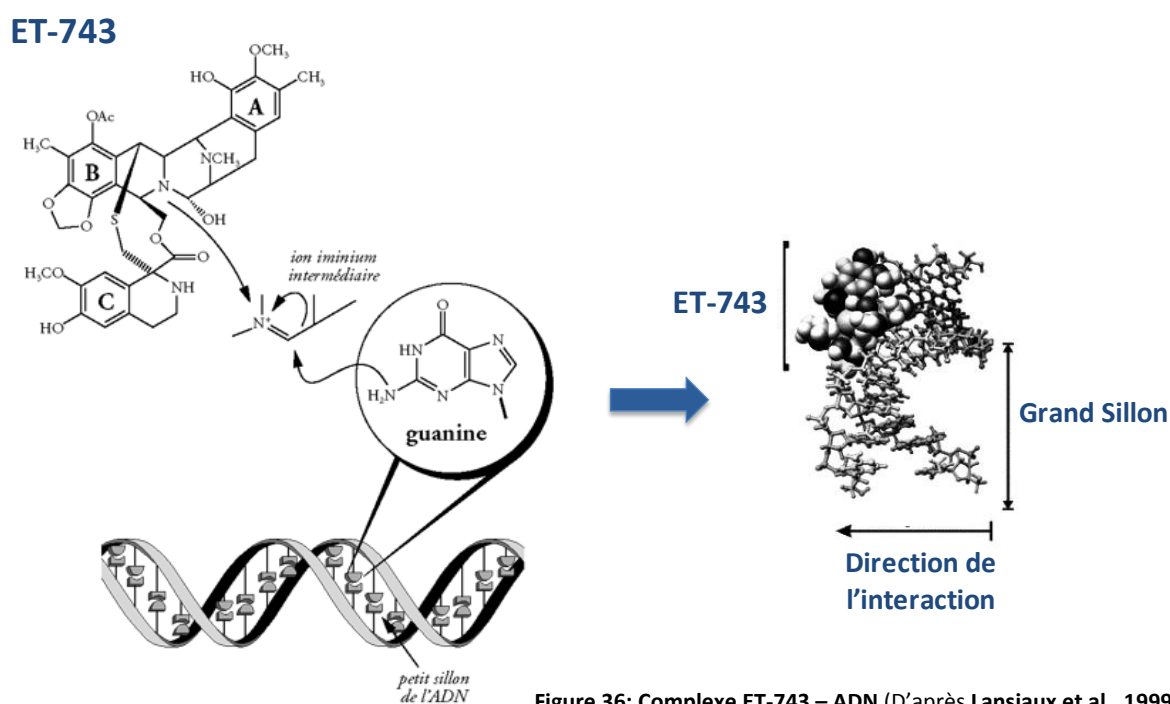


Figure 36: Complexe ET-743 – ADN (D'après Lansiaux et al., 1999).

*i. ET-743 et interférence avec la fixation à l'ADN de protéines*

Son activité cytotoxique est alors relayée par différents mécanismes tels que l'implication de la voie de réparation NER (*Nucleotide Excision Repair*) via l'interaction de la protéine XPG (protéine de la voie de réparation NER) qui, de part la reconnaissance de la courbure engendrée par l'adduit ET-743-ADN piège cet adduit provoquant alors la mort cellulaire à défaut d'une réparation des dommages (**Takebayashi et al., 2001 ; Herrero et al., 2006**).

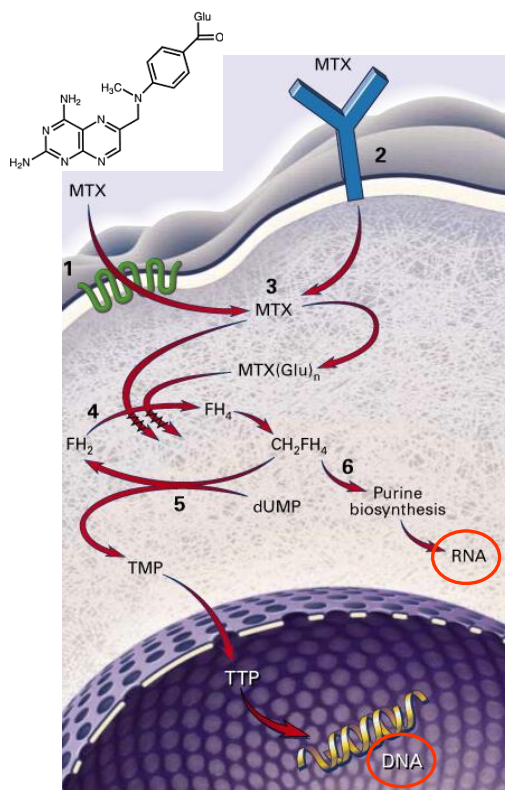
D'autres mécanismes impliquent une modulation de la transcription de gènes causée par les changements structuraux de l'ADN en présence de l'adduit à l'instar de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des protéines chimères FUS-CHOP et EWS-FLI1 impliqués respectivement dans les liposarcomes myxoïdes et les sarcomes d'Ewing (**Forni et al., 2009 ; Grohar et al., 2011**). Cet exemple est au cœur de la nouvelle approche thérapeutique discutée et étudiée tout au long de ces travaux de thèse.

Outre les alkylants de l'ADN, d'autres composés tels les antimétabolites sont couramment utilisés de nos jours en thérapeutique.

c. Antimétabolites: inhibiteurs des processus de biosynthèse

En 1948, Sydney Farber administrait un antagoniste de l'acide folique (l'aminoptérine et plus tard l'améthoptérine communément nommée méthotrexate) chez des enfants atteints de leucémies. Ces agents bloquant les activités enzymatiques dépendantes de l'acide folique sont ainsi devenus les premiers composés ayant induit une rémission chez des enfants atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) couramment utilisés de nos jours dans les chimiothérapies leucémiques (**Farber et al., 1948**). A la même période, George Hitchings et Gertrude Elion contribuèrent au *design* rationnel de molécules antileucémiques avec la sélection de thiopurines (antimétabolites analogues des purines à l'exemple du 6-mercaptopurine) bloquant ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN, éléments nécessaires à la survie des cellules (**Fig. 37**) (**Skipper et al., 1954**). Toujours utilisé en clinique, le fluoropyrimidine 5-fluorouracil (5-FU), dont la synthèse est attribuée à Charles Heidelberger, est venu s'ajouter au groupe des antimétabolites (analogue des pyrimidines) développé pour des tumeurs non hématologiques et principalement administré chez les patients atteints de cancers colorectaux (**Heidelberger et al., 1957**).



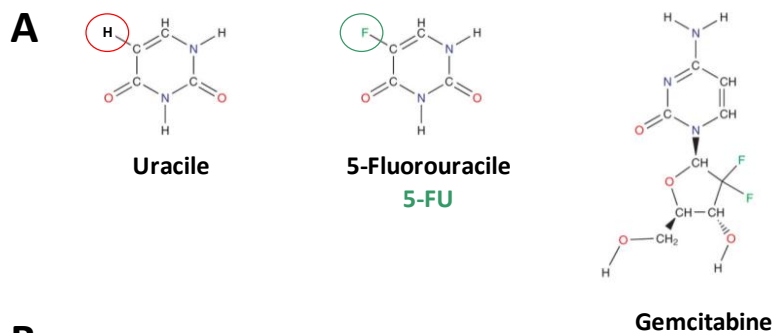


**Figure 37: Mécanisme d'action du méthotrexate.** L'entrée du méthotrexate est effectuée via un transporteur (1) ou un récepteur (2). Une fois dans la cellule (3) celui-ci fixe plusieurs groupements glutamates (MTX(Glu)<sub>n</sub>) sous l'influence de la folylpolygluatamate synthétase. Ces deux molécules (méthotrexate et ses dérivés glutamates) constituent des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase bloquant ainsi la conversion des dihydrofolates en tétrahydrofolates (4). En absence de tétrahydrofolates, la synthèse d'ADN (5) et d'ARN (6) est inhibée (D'après **Gorlick et al., 1996**).

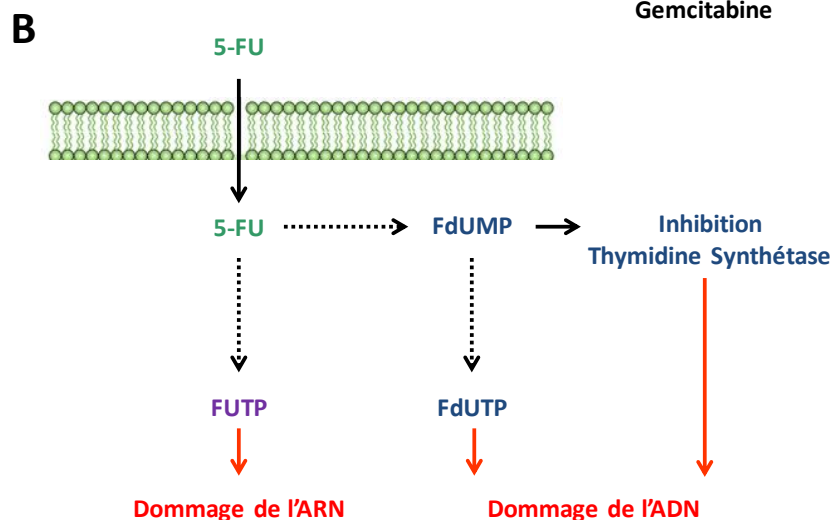
#### *i. 5-Fluorouracile : exemple de mimétisme cellulaire*

Comme décrit précédemment, les antimétabolites sont définis en tant qu'inhibiteurs des processus de biosynthèse ou en tant que molécules introduites dans des complexes macromoléculaires, tel l'ADN ou l'ARN, inhibant ainsi leurs fonctions cellulaires. A lui seul, le 5-FU agit via ces deux mécanismes. Analogue de l'uracile, il diffère par la substitution d'un atome d'hydrogène en fluor sur le carbone en position 5 du cycle pyrimidine (**Fig. 38.A**). Sa synthèse trouve son origine dans l'observation faite par Robert Rutman sur l'utilisation plus promptement d'uracile, base de la structure de l'ARN, par les hépatomes (tumeurs hépatiques) de rats contrairement aux tissus sains concluant ainsi sur l'importance du métabolisme de l'uracile au développement tumoral (**Rutman et al., 1954**).

Une fois dans la cellule, le 5-FU nécessite d'être converti en nucléotide triphosphate pour exercer son activité cytotoxique. Pour cela, il subit une ribosylation (ajout d'un ribose) et trois phosphorylations successives (ajout de groupements phosphates) afin d'aboutir au métabolite actif : le fluorouridine triphosphate (FUTP). Celui-ci mimant l'uridine triphosphate s'incorpore au sein de l'ARN déroutant le processus de synthèse habituel devenant toxique pour la cellule. Le 5-FU peut aussi être converti en fluorodésoxyuridine monophosphate (FdUMP) et fluorodésoxyuridine triphosphate (FdUTP) perturbant la formation de désoxythymidine monophosphate (dTMP), nucléotide essentiel à la biosynthèse de l'ADN (**Fig. 38.B**) (**Longley et al., 2003**).



**Figure 38 : A. Structure de l'Uracile, du 5-Fluorouracile et de la Gemcitabine. B. Métabolisme du 5-Fluorouracile.** 5-FU: 5-Fluorouracile ; FdUMP : Fluorodésoxyuridine monophosphate ; FdUTP: Fluorodésoxyuridine triphosphate ; FUTP : Fluorouridine triphosphate (D'après Longley et al., 2003; Alvarez et al., 2012).



Du fait de sa myélotoxicité, le 5-FU a fait place à de nouveaux dérivés comme la gemcitabine, (composé difluoré analogue de la cytidine) utilisé dans le traitement des cancers pancréatique et bronchique non à petites cellules (Alvarez et al., 2012).

*ii. L'araC: antimétabolite des LAM*

Un autre antimétabolite, couramment utilisé en clinique, illustre aussi cette double fonctionnalité cytotoxique pour les cellules : la cytarabine (arabinosyle cytosine: l'araC) (Fig. 39). Ce fut un des premiers analogues nucléoside pyrimidine développé, dérivant de la désoxycytidine (Ellison et al., 1967), qui une fois dans le compartiment intracellulaire subit des phosphorylations successives générant le métabolite actif: la cytarabine triphosphate (araCTP). La cytotoxicité de ce métabolite découle de l'inhibition de l'ADN polymérase  $\alpha$  (Furth et al., 1968) mais aussi de son incorporation au sein de l'ADN, en place du désoxycytidine triphosphate (dCTP) perturbant sa biosynthèse. De plus, lorsque le métabolite intermédiaire (cytarabine monophosphate, araCMP) s'insère au sein de la chaîne nucléotidique, l'élongation de l'ADN est bloquée interférant ainsi avec la synthèse de l'ADN (Kufe et al., 1980). De nos jours, l'araC est majoritairement utilisé dans le traitement des LAM (Tallman et al., 2005) mais aussi de certaines LMC, de MM, lymphomes Hodgkiniens ou lymphomes non-Hodgkiniens en combinaison avec d'autres chimiothérapies telles que des inhibiteurs de topoisomérases.

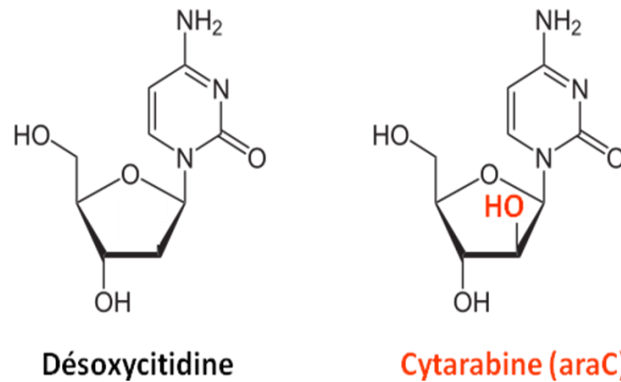


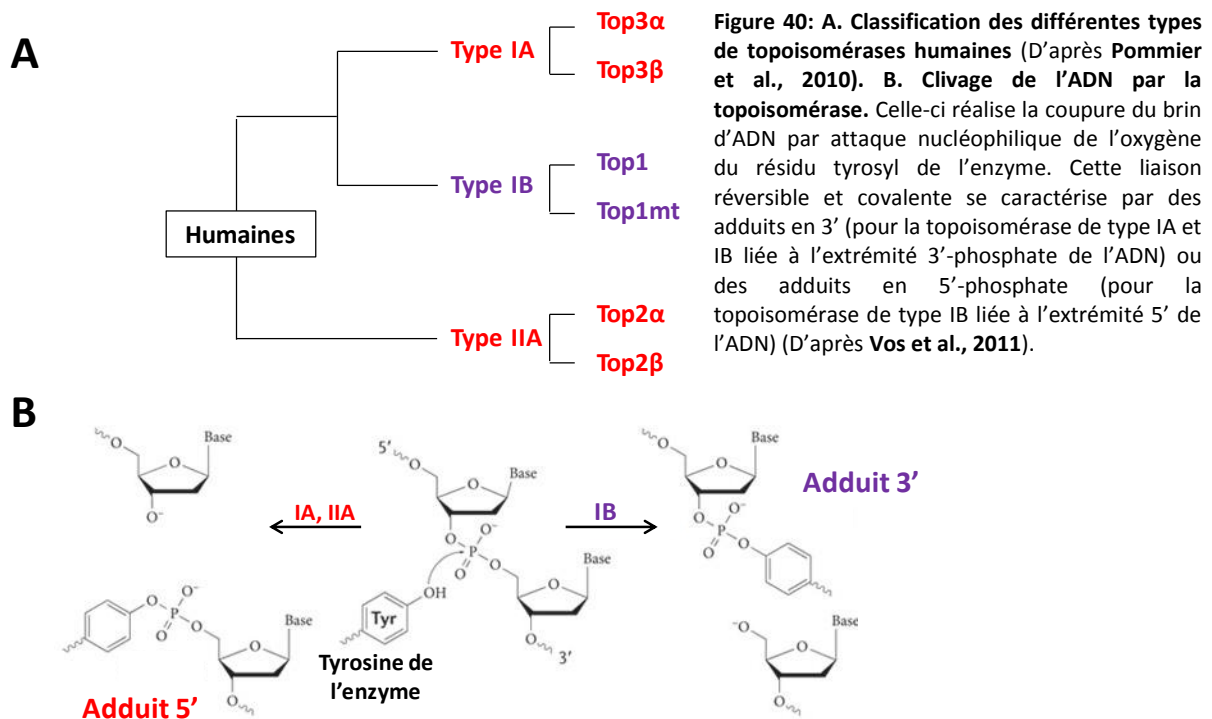
Figure 39: Structure de la Désoxycytidine et de son analogue: la Cytarabine.

Entre 1960 et 1980, le développement de molécules anticancéreuses s'intéresse aux microorganismes et extraits végétaux dont la famille des taxanes et des camptothécines en sont issues en 1964 et 1966 respectivement (Wall et al., 1995; Mann, 2002). Principal source d'agents antibactériens, les microorganismes ont également produits des molécules clés utilisées en chimiothérapie, qui furent introduites en cliniques bien avant l'exploration de leurs mécanismes d'actions, telles les bléomycines, famille de glycopeptides ou encore les anthracyclines dont fait parti la doxorubicine, l'inhibiteur de topoisomérase II (Mann, 2002).

## 2. Les inhibiteurs de topoisomérase :

Introduite par la camptothécine, l'inhibition des topoisomérases constitue leur principale mode d'action. La séparation des brins d'ADN lors de la transcription, la réplication ou encore la compaction importante de l'ADN font partie des phénomènes moléculaires impliquant des modifications de sa topologie, finement régulée. Les topoisomérases sont des enzymes capables de couper, remanier et relier les brins d'ADN afin de modifier le degré de super-enroulement de l'ADN par passage d'un seul brin (Topoisomérase I) ou d'un double brin (Topoisomérase II) à travers un autre. Elles peuvent aussi les décaténer et les dénouer. D'un point de vue génétique, le génome humain code pour 6 topoisomérases classées selon le mécanisme de clivage impliquant une coupure simple brin (topoisomérase de type I, agit en monomère) ou double brin (topoisomérase de type II, agit en dimère) et selon l'extrémité de coupure de l'ADN sur laquelle l'enzyme est lié de manière covalente après clivage (groupe A pour l'extrémité 5'-phosphate et B pour l'extrémité 3'-phosphate) (Fig. 40.A). Contrairement aux topoisomérases de type I, les topoisomérases de type II sont ATP dépendantes, un point important dans le *design* rationnel de composés ciblant les topoisomérases. Toutefois, quelque soit le type d'enzyme, le clivage de la liaison phosphodiester du squelette de l'ADN est effectué par une attaque nucléophile de l'hydroxyle de la tyrosine catalytique de l'enzyme sur la liaison phosphodiester (en 3' du phosphate pour la topoisomérase de type I et en 5' pour la topoisomérase de

type II) liant l'extrémité phosphate de l'ADN du côté 5' ou 3'. S'en suit une deuxième réaction nucléophile qui permet de religuer l'ADN (**Fig. 40.B**). Cette liaison covalente transitoirement crée une cassure de l'ADN qui libère les contraintes et est réversible permettant le retour de l'intégrité de la molécule d'ADN (**Champoux, 2001 ; Wang, 2002**).



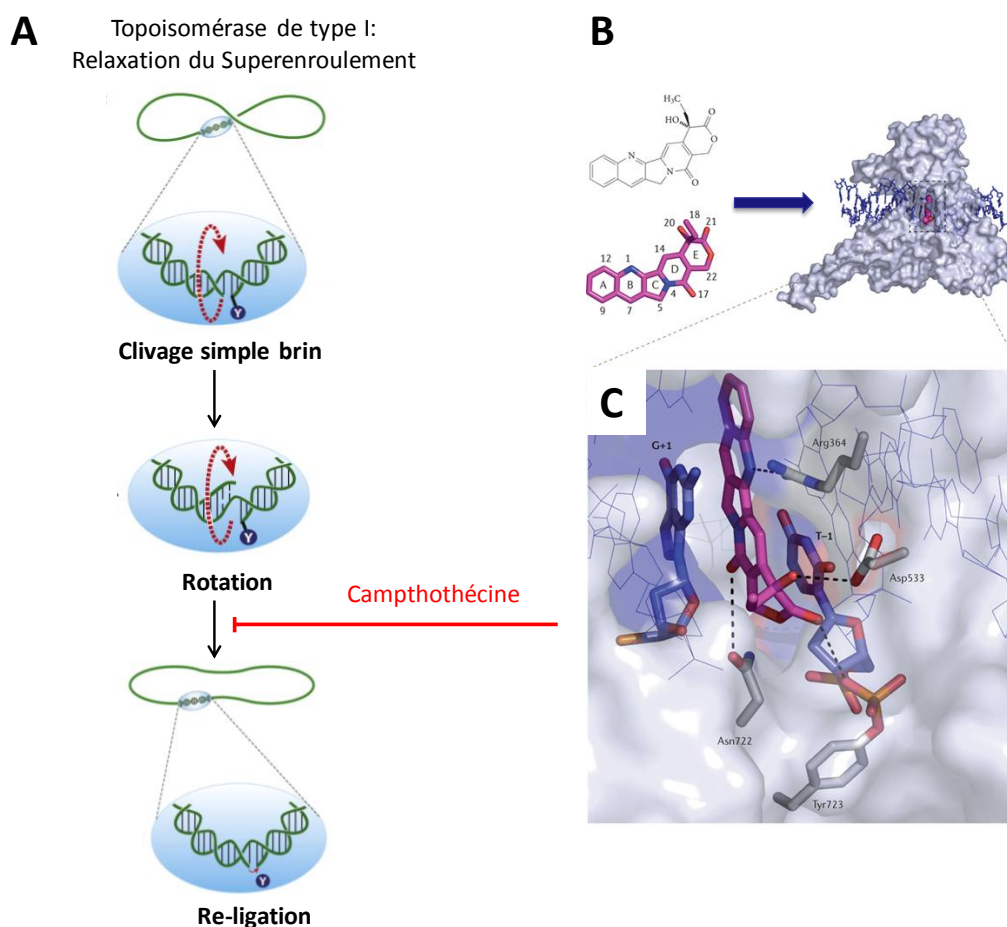
**Figure 40: A. Classification des différents types de topoisomérases humaines (D'après Pommier et al., 2010). B. Clivage de l'ADN par la topoisomérase.** Celle-ci réalise la coupure du brin d'ADN par attaque nucléophile de l'oxygène du résidu tyrosyl de l'enzyme. Cette liaison réversible et covalente se caractérise par des adduits en 3' (pour la topoisomérase de type IA et IB liée à l'extrémité 3'-phosphate de l'ADN) ou des adduits en 5'-phosphate (pour la topoisomérase de type IB liée à l'extrémité 5' de l'ADN) (D'après Vos et al., 2011).

C'est par la compréhension de cette interaction que de nouveaux inhibiteurs de topoisomérase ont été développés. En effet, la prolifération anarchique des cellules cancéreuses suppose une division accrue et donc une réplication de l'ADN à travers des remaniements de sa topologie. Par conséquent, moduler leur activité est une des ressources dont dispose la chimiothérapie actuelle pour éradiquer les cellules cancéreuses via l'accumulation de cassures de l'ADN, signaux de mort cellulaire. A l'heure actuelle, 14 inhibiteurs de topoisomérase I et II sont approuvés en clinique par la US Food and Drug Administration (2 contre la topoisomérase de type I et 12 dirigés contre la topoisomérase II) (**Pommier et al., 2011**).

#### a. La camptothécine : inhibiteurs de topo I

La camptothécine, extraite d'un arbre ornemental chinois *Camptotheca acuminita*, fut sujette à de nombreux obstacles au cours de son développement thérapeutique. En présence de camptothécine, les lignées cellulaires présentent une fragmentation de l'ADN associée à l'inhibition de la synthèse

d'acide nucléique. Néanmoins, aucun clivage n'est détecté en présence d'ADN purifié. Ces observations ont mené Yaw-Huei Hsiang à suggérer que l'orchestre des effets cytotoxiques induits par la camptothécine serait la topoisomérase II comme le démontrait à cette période plusieurs agents anticancéreux définis comme inhibiteurs de la topoisomérase II. Or, non sans surprise, le mécanisme d'action de la camptothécine dépeint par Yaw-Huei Hsiang indiqua la topoisomérase I comme cible cellulaire (**Hsiang et al., 1985**). La camptothécine fut très vite classée comme pilier d'une nouvelle classe de molécules à visée anticancéreuse : les inhibiteurs de topoisomérase I. Ce composé interagit à l'interface des complexes de clivage formés (3'-ADN-topoisomérase I) où des interactions  $\pi$ - $\pi$  sont établies entre le noyau hétérocyclique de la camptothécine et les bases nucléotidiques flanquantes du site de clivage ce qui entrave la rotation de l'ADN. Des liaisons hydrogènes entre les cycles B, D et E et les acides aminés de l'enzyme complètent cette interaction (**Fig. 41**). Ce type d'interaction désigne la camptothécine en tant qu'inhibiteur interfacial dont le complexe ternaire créé (3'-ADN-topoisomérase I-camptothécine) interfère dans des processus vitaux tels que l'inhibition de la progression de la fourche de réplication ou de l'élongation de la transcription impliquant des dommages de l'ADN (**Pommier, 2006 ; Kluza et al., 2007 ; Pommier et al., 2011**).

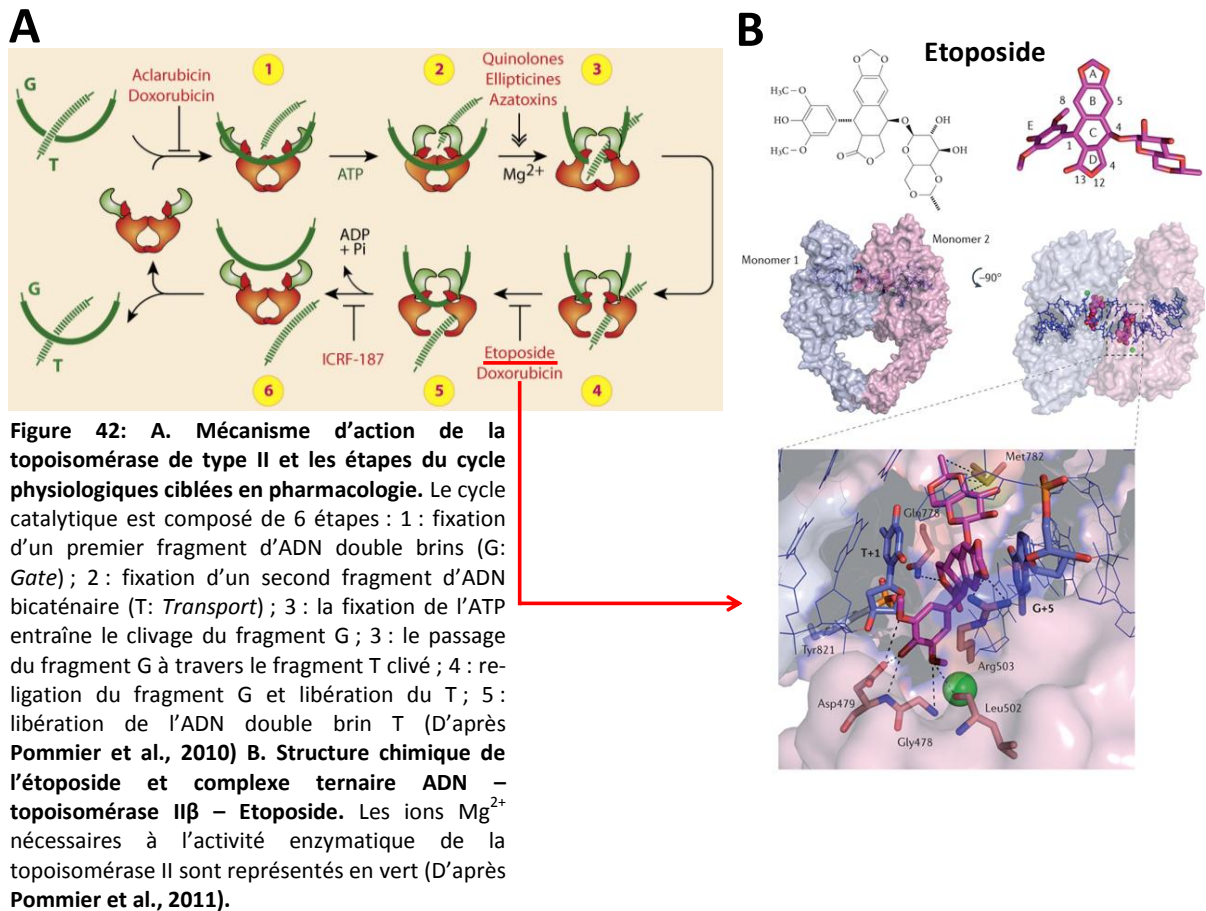


**Figure 41: A. Relaxation de l'ADN par la topoisomérase de type I.** La liaison covalente, par réaction de transestérification, établie entre la topoisomérase de type I et un des deux brins du fragment d'ADN permet le clivage de ce dernier. L'enzyme permet alors une rotation du brin « ouvert » sur le second « fermé » avant religation du fragment d'ADN (D'après **Pommier et al., 2010**). **B. Structure chimique de la camptothécine.** **C. Complexe ternaire ADN-Topoisomerase I-Camptothécine** (D'après **Pommier et al., 2011**).

Les premières études cliniques n'ont fait preuve que d'une faible activité antitumorale, qui plus est associée à une forte toxicité rénale justifiant de son arrêt en thérapeutique (**Wall et al., 1995**). Malgré cela, des modifications structurales ont fait de ses analogues topotecan (Hycamptin®) et irinotecan (Camptosar®) des composés utilisés en clinique pour le traitement des cancers ovariens et colorectaux métastatiques respectivement (**Pommier et al., 2010**).

#### b. Inhibiteurs de la topoisomérase II

Les inhibiteurs de topoisomérase II sont divisés en deux classes distinctes sur la base de leurs modes d'action: la première classe nommée « poisons de la topoisomérase II » cible les complexes de clivage bloquant la religation de l'ADN, par opposition à la seconde classe qui inhibe l'activité catalytique de l'enzyme. Les poisons de la topoisomérase II incluent des composés utilisés en clinique comme l'étoposide (VP-16), la daunorubicine ou encore le mitoxantrone. Leurs modalités d'interaction à l'ADN sont de deux types: les intercalants (doxorubicine, mitoxantrone...) et les non intercalants (étoposide, téniposide...). Ces poisons ont la particularité d'accroître le taux de complexes covalents topoisomérase II-ADN en favorisant la formation des complexes clivables ou par inhibition de la religation, alors que les inhibiteurs catalytiques, agents chélateurs, bloquent l'hydrolyse de l'ATP inhibant ainsi la réouverture du domaine ATPasique (**Fig. 42.A**) (**Pommier et al., 2010**). L'interaction des poisons de la topoisomérase peut s'appuyer sur les complexes ternaires formés en présence de l'étoposide (ADN-topoisomérase II-étoposide) alors considérés comme un inhibiteur interfacial (**Pommier et al., 2011**). Celui-ci établit des liaisons  $\pi$ - $\pi$  avec les paires de bases de l'ADN disposés au site de clivage auxquelles s'ajoutent des contacts avec l'enzyme à travers des liaisons hydrogènes et des interactions de Van der Waals (**Fig. 42.B**) (**Wu et al., 2011**). Ainsi, ces composés freinent la transcription et la réplication de l'ADN aboutissant à des cassures de l'ADN toxiques pour la cellule (**Covey et al., 1988 ; Nitiss, 2011**). La cytotoxicité cellulaire peut se définir à travers l'induction de l'apoptose, comme le montre les cellules traitées avec l'étoposide, communément utilisé pour l'étude du phénomène apoptotique (**Montecucco et al., 2007**). En thérapeutique, son administration est préconisée pour le traitement des leucémies, lymphomes, cancers du poumon, des testicules et de la vessie. Toutefois, à l'instar de bon nombre d'agents cytotoxiques à large spectre d'action, les effets toxiques sont fréquents et correspondent à une myélosuppression, une alopecie et des troubles gastro-intestinaux.

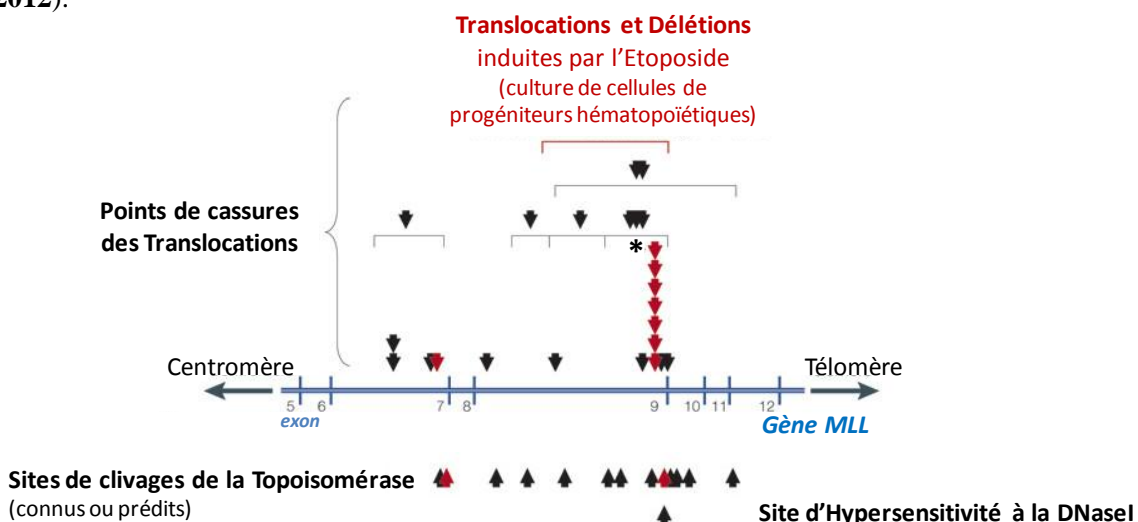


En conclusion, les différents agents de chimiothérapies peuvent être classés selon leurs modes d'action ou leurs origines (synthétiques ou naturelles). Jusqu'à présent, ces thérapies sont dites à large spectre thérapeutique de part leur faible spécificité à l'échelle moléculaire mais aussi cellulaire. Malgré le large éventail thérapeutique dont dispose la chimiothérapie et des avancées pharmacologiques réalisées, la mortalité liée aux cancers reste prépondérante du fait des toxicités qui en découlent mais aussi des nombreuses résistances développées. Un des effets secondaires les plus toxiques est l'apparition d'un cancer chimio-induit, distinct du cancer initial généré suite aux chimiothérapies et radiothérapies administrées au cours du traitement du premier cancer. Diverses chimiothérapies sont associées à ces types de cancers secondaires tels les agents alkylants, les inhibiteurs de topoisomérase ou encore les antimétabolites. Ainsi, le développement de cancers chimio-induits constitue la principale cause de mortalité chez les patients ayant été traités pour un lymphome Hodgkinien (Aleman et al., 2003). Cette relation de cause à effet est principalement étudiée dans les leucémies chimio-induites, dont le risque de survenue est supérieur à celle des tumeurs solides du fait probablement de la sensibilité accrue de la moelle osseuse aux effets toxiques et mutagéniques des chimiothérapies. L'exemple des LAM chimio-induites illustre ce lien. Celles-ci peuvent être divisées en deux groupes : les LAM développées après traitement avec des alkylants ou la radiothérapie et celles développées après l'utilisation d'inhibiteurs de topoisomérase. Le premier est caractérisé par une longue période de latence (2 à 10 ans post-thérapie) et diffère du second ayant une plus courte

période de latence (quelques mois à environ 5 ans post-thérapie) (Allan et al., 2005). C'est le cas de l'inhibiteur de topoisomérase II : l'étoposide associé à l'apparition de leucémies caractérisées par des réarrangements du gène *mll* (Ezoe, 2012).

### 3. Etoposide et Leucémies : modèle de cancer chimio-induit

De part son mode d'action, l'étoposide génère indirectement des cassures doubles brins de l'ADN par inhibition de la topoisomérase II incapable d'effectuer leur re-ligation. L'ADN peut alors être sujet à une réparation incorrecte de ces cassures qui aboutit à l'apparition de mutations, duplications, délétions, inversions, insertions ou encore translocations. Tel est le cas des réarrangements du gène *mll*, dont l'apparition fut clairement démontrée sur des cultures humaines de progéniteurs hématopoïétiques et de cellules souches hématopoïétiques (CSHs) traitées avec l'étoposide (Libura et al., 2005 ; Libura et al., 2008). Son potentiel oncogénique a été mis en avant *in vivo* chez des souris arborant la translocation t(11;16) *mll-cbp* dont *cbp*, codant pour un transactivateur transcriptionnel, constitue un des partenaires génétiques de *mll* fréquemment associé aux leucémies chimio-induites (Sobulo et al., 1997 ; Wang et al., 2005). Les fusions MLL sont aussi bien décrites dans les LAL chimio-induites (T-LAL, principalement pour la translocation *mll-af4*) que les LAM chimio-induites (T-LAM, principalement pour la translocation *mll-af9*). Au niveau moléculaire, cette redondance de translocations trouverait son origine au sein du gène *MLL* où se regroupent majoritairement les points de cassures (nommé BCR pour *breakpoint cluster region*). Cette région de 8,3 Kpb, située entre l'exon 5 et 11 en 11q23 présente des sites de fixations par la topoisomérase II ou d'hypersensitivité à la DNaseI et sont ainsi susceptibles d'être clivés et dont la ligation est interrompue en présence d'inhibiteurs de topoisomérase II (Fig. 43) (Strissel et al., 1998 ; Cowell et al., 2012 ; Mosad et al., 2012).



**Figure 43: Sites d'ADN clivés par la topoisomérase II et points de cassures des translocations *MLL* dans des leucémies chimio-induites.** Les points de cassures des translocations *MLL* de 24 patients ayant des leucémies chimio-induites sont schématisés par des flèches noires descendantes incluant un seul patient non traité au préalable avec des inhibiteurs de topoisomérase II (\*). Les flèches noires ascendantes indiquent les sites de clivages de la topoisomérase (connus ou prédits) ou des sites d'hypersensitivité à la DNaseI. Les flèches rouges (ascendantes ou descendantes) indiquent les cas de leucémies chimio-induites pour lesquelles les sites de cassures des translocations coïncident précisément avec les sites de clivages de la topoisomérase II (D'après Allan et al., 2005).



Dans certains cas, ces translocations ne suffisent pas à induire une tumeur maligne. D'autres altérations doivent s'ajouter définissant ainsi le concept de « *first hit* » (premier événement) et « *second hit* » (second événement) qui pourrait expliquer le temps de latence observé en fonction du pouvoir transformant de l'oncogène et de la nécessité d'autres altérations additionnelles. Si l'on applique ce concept aux translocations *mll*, la présence du partenaire approprié suffirait dans certains cas au développement leucémique (voie A), contrairement à d'autres partenaires nécessitant l'existence d'altérations secondaires (voie B). Enfin, la troisième voie (voie C), exempte d'altérations secondaires, conduirait irrémédiablement à la mort cellulaire du clone (Fig. 44) (Allan et al., 2005).

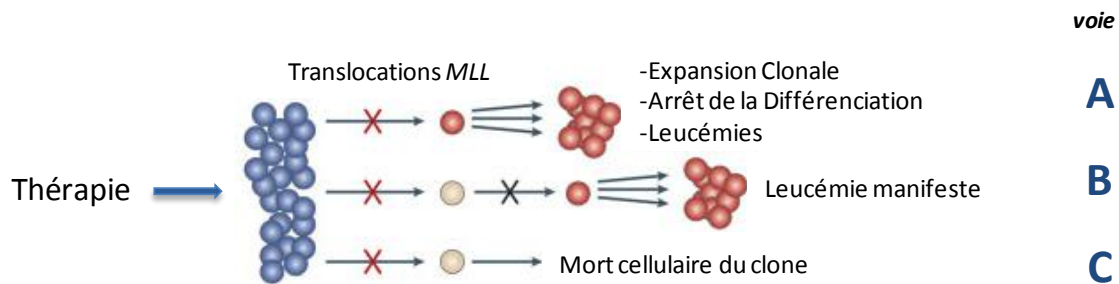


Figure 44: Modèle "first hit" and "second hit" (D'après Allan et al., 2005).

*L'ensemble de ces données mettent donc en avant la nécessité d'évoluer vers une nouvelle approche thérapeutique ciblée et donc moins toxique avec des taux de rémission plus importants. A l'heure actuelle, avec les nombreuses avancées de la génétique et de la biologie moléculaire dans la compréhension des mécanismes cancéreux, ces effets secondaires autrefois vus comme un mal nécessaire et inévitable peuvent à présent être appréhendés comme un mal évitable à travers le développement de thérapies ciblées.*

*Ces thérapies n'ont cessé de se développer avec un intérêt croissant ces dernières années pour la compréhension et la démonstration du mécanisme d'action moléculaire de chaque substance thérapeutique. Bien qu'elles soient encore trop peu nombreuses pour éradiquer l'ensemble des tumeurs malignes si diverses, elles constituent le nouveau champ de recherche thérapeutique d'avenir.*

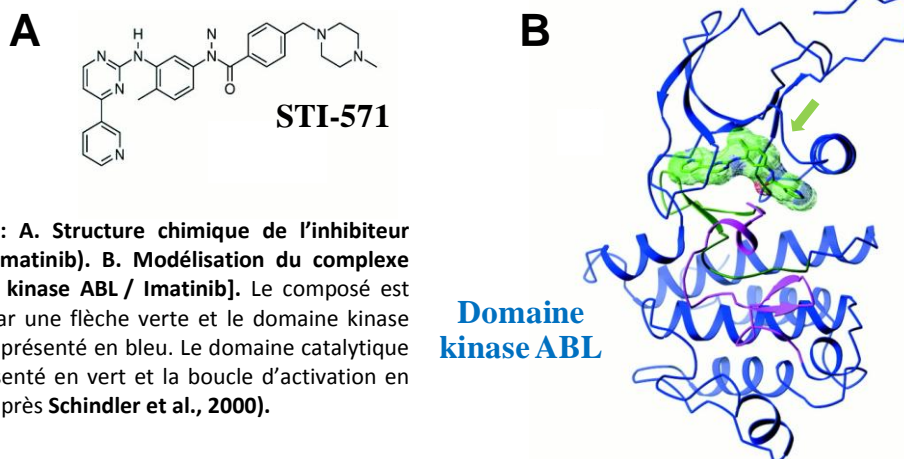
#### D. Spécificité Accrue et Faible Toxicité : Thérapies Ciblées

La compréhension fine des mécanismes moléculaires, biochimiques et physiologique d'une cellule cancéreuse est la clé du développement des thérapies ciblées qui permettrait à terme un traitement à la carte. Plusieurs caractéristiques physiologiques des cellules cancéreuses ont fait l'objet de thérapies ciblées telles l'inhibition de tyrosine kinases (cible l'activité enzymatique), de récepteurs

transmembranaires ou nucléaires (cible l'interaction avec le ligand), des interactions protéines-protéines ou protéines-ADN.

### 1. Imatinib (Gleevec) et Leucémie myéloïde chronique (LMC): Inhibiteur de tyrosine kinase

L'inhibition d'une tyrosine kinase est le mécanisme thérapeutique utilisé dans le traitement de la LMC. Cette pathologie caractérisée par une augmentation du nombre de cellules myéloïdes sans blocage de la différenciation, est l'une des rares hémopathies malignes pour laquelle la protéine de fusion a été identifiée comme nécessaire et suffisante (mais non exclusive) pour le développement leucémique. De surcroît celle-ci est absente dans les cellules saines. La LMC est causée par la protéine de fusion BCR-ABL1 (*break point region – Abelson*) à l'activité tyrosine kinase constitutivement active. La fusion est générée à partir d'une translocation réciproque t(9;22) (q34;q11) identifiée au sein d'un chromosome couramment appelé chromosome Philadelphie. Cette activité constitutive du domaine tyrosine kinase d'ABL1 est inhibée par l'interaction d'une petite molécule (STI-571, imatinib, Gleevec) dans la poche du domaine catalytique, lieu de fixation de l'ATP (**Fig. 45**). Ainsi, l'imatinib bloque l'hydrolyse de l'ATP et donc la fonction kinase de l'enzyme (**Schindler et al., 2000**). Cette simple interaction permet la rémission complète de LMC chez plus de 80% des patients (**Druker et al., 2006**).



### 2. Acide tout-trans rétinolique: Exemple d'une thérapie différenciatrice modulant l'expression de gènes cibles

Parfois, les protéines impliquées dans la pathologie n'ont pas d'activité enzymatique qui pourrait faire l'objet d'une inhibition ou d'une activation thérapeutique. C'est le cas de beaucoup de récepteurs hormonaux aux stéroïdes qui lient des ligands sélectifs pour leur action. Néanmoins, être dépourvu

d'activité enzymatique n'est pas un frein au développement thérapeutique comme nous le montre l'utilisation en clinique de l'acide tout-*trans* rétinoïque dans le traitement de la leucémie aigue promyélocytaire (LAP). Celle-ci est caractérisée par la prolifération importante de blastes leucémiques bloqués au stade de différenciation promyélocytaire provoquant la disparition progressive de cellules matures. A l'instar des LMC, cette prolifération accrue tient son origine principalement de la translocation t(15;17) qui aboutit à la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$ . Cette seule fusion est capable de transformer des progéniteurs myéloïdes *ex vivo* et de mimer les caractéristiques physiologiques de la LAP dans des souris transgéniques (Zhu et al., 2005; He et al., 1997). D'un point de vue moléculaire, PML-RAR $\alpha$  interagit avec des séquences consensus de l'ADN nommées RARE (*retinoic acid response elements*: éléments de réponse à l'acide rétinoïque) via son domaine de fixation inclus dans la partie RAR $\alpha$  de la protéine de fusion. PML-RAR $\alpha$  est décrit comme un répresseur transcriptionnel qui peut s'oligodimériser pour bloquer l'induction de la différenciation par répression transcriptionnelle de plusieurs gènes cibles à travers le recrutement de corépresseurs. A contrario, l'ajout d'acide tout-*trans* rétinoïque (ATRA) provoque un changement conformationnel de la protéine de fusion qui libère les corépresseurs et recrute des coactivateurs. Les gènes cibles réprimés sont alors activés permettant la différenciation *in vivo* et *in vitro* des blastes leucémiques (Fig. 46) (Ablain et al., 2011).

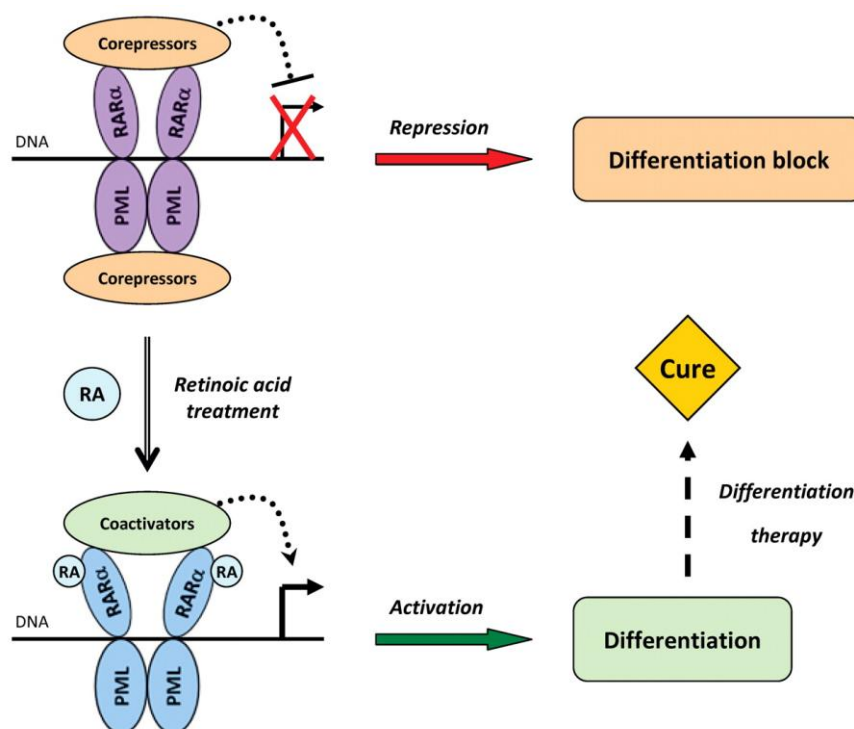


Figure 46: Modèle de répression transcriptionnelle médiée par la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  et d'activation transcriptionnelle induit par l'acide tout-*trans* rétinoïque qui mène à la thérapie différenciatrice (D'après Ablain et al., 2011).

Ainsi, cette thérapie utilisant de petites molécules illustre pour la première fois l'existence et la faisabilité d'un traitement provoquant le retour à l'état normal de cellules cancéreuses par induction de la différenciation à travers le ciblage d'un facteur de transcription. De plus, ces molécules induisent indirectement une modulation de l'expression des gènes cibles par modifications des interactions

protéines/protéines clés du devenir de la cellule. Cette thérapie permet d'atteindre des rémissions complètes chez plus de 90% des patients traités pour une LAP.

### 3. Nutlins : de petites molécules ciblant le complexe MDM2/p53

Cet exemple illustre l'inhibition directe d'interaction protéines/protéines qui peut s'avérer cruciale dans certains développements tumoraux tel le complexe MDM2/p53.

La protéine p53 est considérée comme un suppresseur de tumeur régulant de nombreuses fonctions physiologiques comme le cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN et la sénescence. Or cette protéine est fréquemment mutée dans diverses tumeurs humaines résultant d'une inactivation ou d'une perte de son expression. Sa fonction peut aussi être altérée par surexpression de l'oncoprotéine MDM2 (*murine double minute 2*) qui interagit directement avec p53, induit son ubiquitination et donc sa dégradation. Afin de contrer cette dégradation trop importante, l'idée fut de synthétiser de petites molécules mimant parfaitement la courte hélice amphiphile de la protéine p53 qui se loge dans la poche hydrophobe de la protéine MDM2. C'est ainsi que les données de cristallographie aux rayons X ont orienté la synthèse des nutlins dont la nutlin-3, actuellement en essais cliniques pour l'inhibition de la formation du complexe MDM2/p53 (Fig. 47) (Vasilley et al., 2004 ; Shangary et al., 2009).

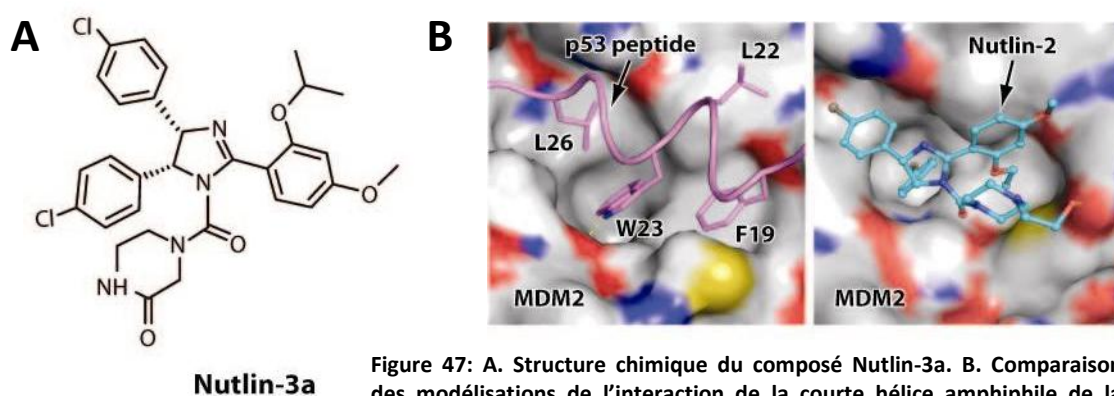


Figure 47: A. Structure chimique du composé Nutlin-3a. B. Comparaison des modélisations de l'interaction de la courte hélice amphiphile de la protéine p53 ou de la Nutlin-2 (analogue de la Nutlin-3a) avec la poche hydrophobe de la protéine MDM2 (D'après Shangary et al., 2009).

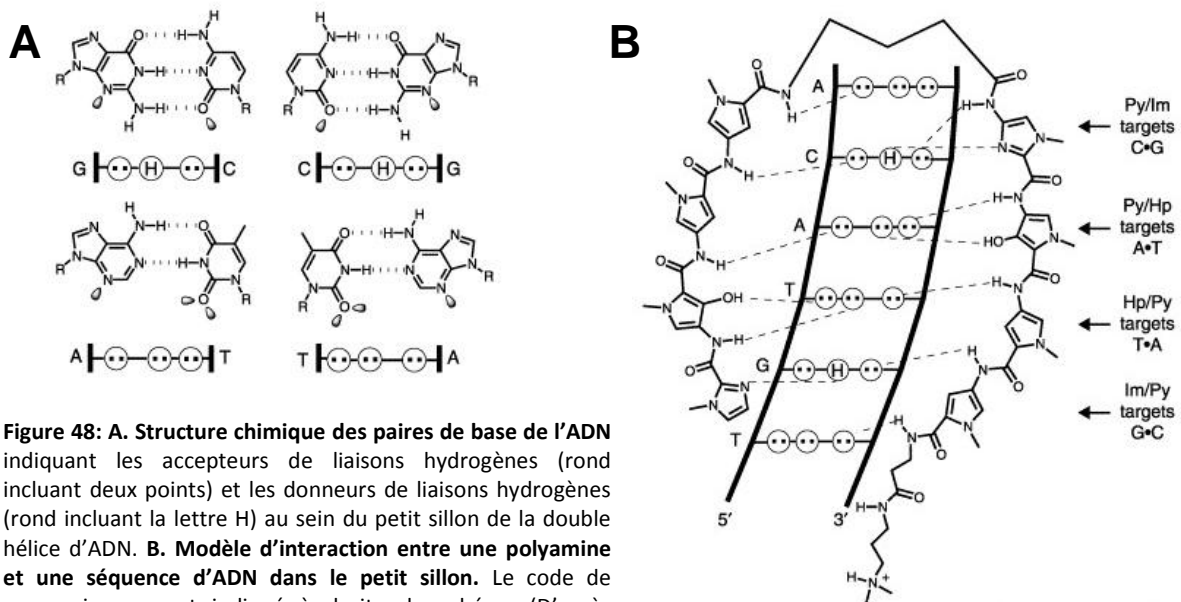
### 4. Polyamines : le design « à façon » de ligands de la double hélice d'ADN

Contrairement aux thérapies précédentes qui ciblent les interactions [protéine/ligand naturel] ou [protéine/protéine], ce concept thérapeutique vise à moduler les interactions [ADN/protéine], en l'occurrence l'interaction de facteurs de transcription oncogènes à leurs sites consensus situés sur la double hélice d'ADN. Ces composés hétérocycliques, inspirés de l'étude de l'interaction avec l'ADN de deux molécules naturelles (la nétropsine et la distamycine A), interagissent avec le petit sillon sous

forme 1:1 ou 2:1 (ligand:ADN) de manière antiparallèle sur la base du code reconnaissance des paires de bases de l'ADN ainsi défini :

- les paires de cycles Imidazole /Pyrrole (**Im/Py**) ciblent les paires de bases **G-C**
  - les paires de cycles Pyrrole / Imidazole (**Py/Im**) ciblent les paires de bases **C-G**
  - les paires de cycles Pyrrole /Pyrrole (**Py/Py**) ciblent les paires de bases **A-T** ou **T-A**
  - les paires de cycles Pyrrole / Hydroxypyrrole (**Py/Hp**) ciblent les paires de bases **A-T**
  - les paires de cycles Hydroxypyrrole /Pyrrole (**Hp/Py**) ciblent les paires de bases **T-A**
- (Dervan et al., 2005).

A travers ce code, les polyamines peuvent discriminer entre les paires de bases G-C et C-G ainsi que les paires de base A-T et T-A (Fig. 48). A cette structure s'ajoute des linkers intramoléculeux flexibles reliant les deux ligands, correspondant le plus souvent à un acide  $\gamma$ -aminobutyrique (nommé hairpin) afin de favoriser la dimérisation (Mrksich et al., 1994).



A ce jour, ce *design* à façon a permis l'inhibition spécifique de la liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription évalués *in vitro* et sur modèles cellulaires dont l'exemple récent concerne la modulation de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription leucémogène EVI1 (Zhang et al., 2011). A l'identique, une autre polyamine synthétique est capable de réduire l'interaction à l'ADN du facteur NF- $\kappa$ B, largement impliqué dans le cancer, accompagné d'une diminution de l'expression des gènes cibles tels les interleukines IL6 et IL8 et dont la validation *in vivo* est en cours (Raskatov et al., 2012).

Ces composés, de par leur perméabilité cellulaire relative et leur interaction séquence-spécifique sont capables de moduler l'interaction à l'ADN de facteurs de transcription. A cet outil s'ajoute une nouvelle famille de molécules qui à l'instar des polyamines dérivent d'un point de vue structural de la nétropsine et de la distamycine. Ces composés, plus petit que les polyamines, correspondent à des ligands qui fixent le petit sillon de la double hélice d'ADN de manière séquence spécifique: **les composés DB**.

## E. Les composés DB : Modulateurs Transcriptionnels ?

Le Pr. **David Boykin** a développé une famille de petites molécules, les composés **DB**, qui sont des composés diamidines hétérocycliques comptant à l'heure actuelle plus de 2000 dérivés. Leurs structures chimiques diffèrent autant par les cycles centraux que les groupements aux extrémités.

Le développement de ces composés chimiques synthétiques trouve son origine pour des applications en parasitologie. En effet, ce sont des analogues de la pentamidine, dérivé bisbenzamidine, couramment utilisé depuis 1937 pour le traitement des premiers stades de la trypanosomiase africaine humaine aussi connue sous le nom de maladie du sommeil (**Bouteille et al., 2003**). Ce dérivé est par ailleurs employé pour le traitement de la leishmaniose (cutanée ou viscérale) et la pneumonie causée par le protozoaire *Pneumocystis carinii* (**Bray et al., 2003**).

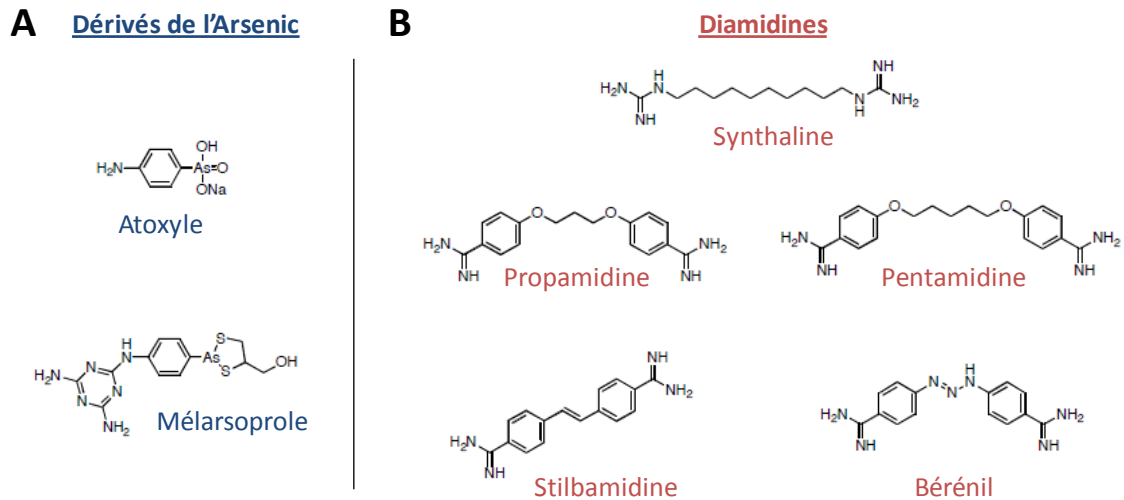
### 1. Traitement des maladies parasitaires et développement des diamidines

Leur développement provient du constat dramatique de l'incidence des maladies parasitaires (10000 nouveaux cas de trypanosomiase africaine chaque année, source OMS) et de l'absence de traitements curatifs qui en fait une pathologie fatale pour les personnes infectées.

#### a. Historique

La trypanosomiase africaine est une pathologie protozoaire causée par deux formes d'hémoflagelles parasitaires: *Trypanosoma brucei* (*T. b.*) *gambiense* et *T. b. rhodesiense*. Elle est transmise par piqûres de la mouche tsé-tsé. Ces deux types d'infection diffèrent par les temps d'incubation et de localisation géographique africaine mais présentent chacune deux stades cliniques. Le premier consiste en une période d'incubation du parasite qui finit par atteindre la circulation sanguine. Le second correspond au stade final lorsque le parasite accède au système nerveux central (SNC). Pour faire face à cette infection mortelle, des composés contenant de l'arsenic furent les premiers utilisés, à l'instar de l'atoxyle, mais qui fut très rapidement remplacé par la suramine et le mélarsoprole présentant moins d'effets secondaires sévères (**Fig. 49. A**). Contrairement à la pentamidine efficace seulement au stade

précoce, le méléarsoprole (Mel B) est utilisé en stade final de part sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique malgré les effets secondaires morbides tel l'encéphalopathie (**Kennedy, 2004**).



**Figure 49: Structures des composés dérivant de l'arsenic (A) et des diamidines (B).**

#### b. Diamidines et activité antiparasitaire

En 1935, la synthaline (1,10-diamidinodécane) fut le premier composé de type diamidine présentant une activité antiparasitaire envers les trypanosomes. Par la suite, la pentamidine, la propamidine et le stilbamidine furent testés. Développé en 1955, le bérénil (diminazène, analogue de la pentamidine) fut restreint au champ thérapeutique vétérinaire (**Fig. 49. B**) (**Soeiro et al., 2005**).

##### *i. De la Pentamidine...*

Seule diamidine utilisée en clinique humaine, les avantages thérapeutiques de la pentamidine sont néanmoins amoindris par le manque de biodisponibilité orale (imposant une administration par voie intra-musculaire) et des effets secondaires toxiques (hypotension, néphrotoxicité, tachycardie...) (**Soeiro et al., 2005**). A ceci s'ajoute l'apparition de résistances thérapeutiques au méléarsoprole et à la pentamidine (**Bray et al., 2003**).

##### *ii. ... à ses analogues : les diamidines hétérocycliques (composés DB)*

Ce constat fut à l'origine du développement d'autres composés analogues de la pentamidine. Certaines diamidines hétérocycliques (nommés aussi dications) possèdent des groupements phényl-amidiums aux extrémités, à l'instar de la pentamidine, et diffèrent par leur structure centrale qui peut être composée d'un ou plusieurs cycles aromatiques conférant ainsi au composé une plus grande rigidité en comparaison à la structure centrale de la pentamidine. Des milliers de structures sont alors envisageables selon les cycles, groupements ou atomes substitués mais aussi selon les positions des

substituants : méta, para ou ortho. Cette variabilité structurale permet donc à la fois de moduler les types d'interaction moléculaire (fonctions des atomes plus ou moins électronégatifs et de leurs encombrements stériques) mais aussi selon la courbure finale de la molécule qui représente l'élément majeur de sa reconnaissance. En effet, de part leur convexité, ces molécules miment de près la courbure du petit sillon de la double hélice de l'ADN venant donc s'imbriquer à cette hélice à travers des liaisons non covalentes et réversibles.

## **2. Mode d'action : ligands de l'ADN**

Il existe quatre modes d'interaction caractérisés comme réversibles et non covalentes des molécules avec l'entité macromoléculaire que représente la double hélice d'ADN : (1) des attractions électrostatiques avec le squelette sucre-phosphate anionique de l'ADN notamment quand les composés sont cationiques en solution ; (2) des interactions avec le grand sillon de l'ADN ; (3) des interactions avec le petit sillon de l'ADN ; (4) des intercalations entre les paires de bases de l'ADN. Les composés DB et ses dérivés intègrent en majorité le groupe 3, mode d'interaction préférentiellement décrit dans ce chapitre.

De manière générale, les intercalations classiques font appel à des molécules ayant des noyaux aromatiques plans ou quasi-plans car l'interaction requière une ouverture dynamique de l'espace entre les deux paires de bases de l'ADN, le degré d'ouverture dépendant de la molécule. De plus, cette interaction est souvent associée à une faible spécificité de séquence contrairement aux interactions avec le sillon de l'ADN qui peuvent avoir une spécificité de séquences reconnues. Cette interaction peut aussi permettre un changement conformationnel de la double hélice d'ADN sans en être toutefois une nécessité. Etant donné les caractéristiques conformationnelles de la double hélice d'ADN, deux types d'interaction sont possibles: au niveau du petit sillon et/ou du grand sillon. De par leur variabilité de potentiel électrostatique, d'hydratation, de capacité d'établir des liaisons hydrogènes et d'encombrement stérique, ces deux sillons diffèrent dans leurs propriétés d'interaction des molécules. Ainsi, les macromolécules (protéines et oligonucléotides) interagissent préférentiellement avec le grand sillon alors que le petit sillon est le lieu d'interaction des petites molécules. Toutefois, certaines protéines, comme les facteurs de transcription de la famille HOX, peuvent interagir à la fois avec les deux sillons de la double hélice (paragraphe **A.2.a**).



a. Prototype du complexe [molécule/petit sillon de l'ADN]

Bien avant la détermination moléculaire des premiers complexes [petites molécules/petit sillon de l'ADN], les interactions furent prédites comme davantage spécifiques au sein du grand sillon par rapport au petit sillon. Cette prédiction s'appuie sur un code de reconnaissance de l'ADN basé à la fois sur les divers atomes donneurs et receveurs de liaisons hydrogènes des bases de l'ADN, l'encombrement stérique, la solvatation ainsi que l'électronégativité des deux sillons de la double hélice d'ADN (**Seeman et al., 1976**).

L'interaction de molécules au sein du petit sillon est gouvernée, en premier lieu, par l'établissement de liaisons hydrogènes impliquant les bases de l'ADN qui incluent des groupements accepteurs d'hydrogènes (tels l'azote en position N3 de l'adénine, l'oxygène en position C2 de la thymine ou encore l'azote en position N3 de la guanine et l'oxygène en position C2 de la cytosine) ou donneurs d'hydrogènes (tels l'azote en position C2 de la guanine) (**Fig. 50**). L'encombrement stérique peut aussi modifier la disponibilité de ces interactions. Tel est l'exemple du groupement NH<sub>2</sub> localisé en position C2 de la guanine qui entrave la formation d'une liaison hydrogène au sein du petit sillon. Ainsi, par cet encombrement l'interaction avec le petit sillon de la double hélice d'ADN dans les régions riches en paires de bases GC est plus limitée, le petit sillon étant moins profond au niveau des paires de bases GC que AT. A ces caractéristiques s'ajoutent des propriétés physico-chimiques telles une solvatation plus importante dans le petit sillon contribuant à une entropie de liaison favorable lors de la libération de molécules d'eau pendant la formation de complexes. En conséquence, cette hydratation nettement plus importante au sein des régions riches en paires de bases AT par rapport aux régions riches en GC apporte une contribution entropique (**Dixit et al., 2012**). Enfin, le potentiel électrostatique négatif supérieur dans les régions riches en paires de bases AT par rapport aux régions riches en GC est plus favorable à des interactions électrostatiques de ligands chargés positivement (**Blackburn et al., 2006**). Ainsi, à travers toutes ces caractéristiques structurales et biochimiques, le petit sillon de séquences riches en paires de bases AT est optimal pour la reconnaissance par des ligands mimant sa courbure et la stabilisation maximale de cette interaction par des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques et des contacts de type Van der Waals. Cette reconnaissance est aidée en partie par la conformation plus étroite et plus profonde des petits sillons de paires de bases AT vis-à-vis de ceux des paires de bases GC en raison de l'absence de groupement NH<sub>2</sub> de la guanine minimisant ainsi l'encombrement stérique et permettant un meilleur accès du ligand à l'intérieur du sillon (**Fig. 50**).

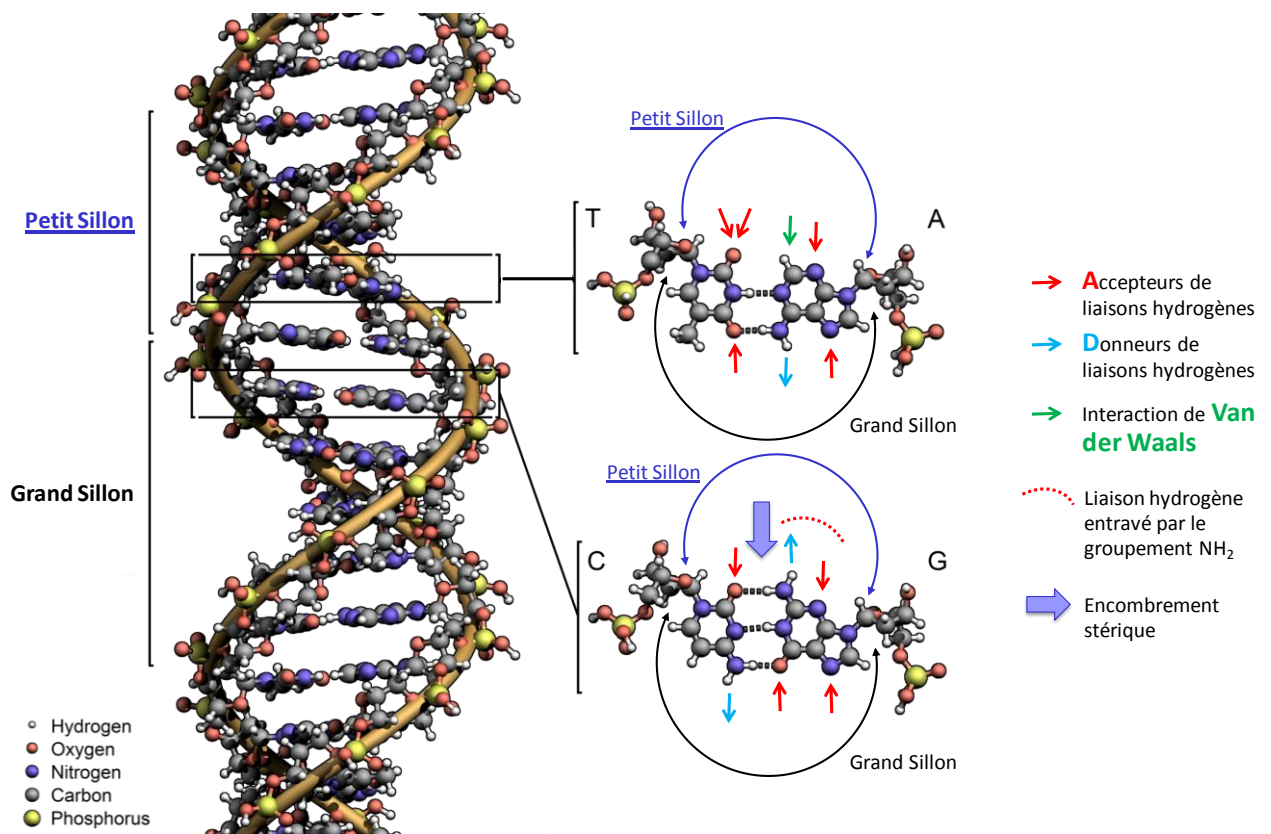


Figure 50: Structures et interactions moléculaires du petit et grand sillon de la double hélice d'ADN.

En conclusion l'ensemble de ces caractéristiques structurales et de ces propriétés physico-chimiques doivent être prises en compte pour un *design* rationnel de ligands du petit sillon de l'ADN. Pour exemple, deux composés naturels entrent dans cette catégorie: la nétropsine et la distamycine A qui constituent l'inspiration du *design* rationnel des polyamines (**Fig. 51. A**). Ces ligands interagissent tous deux préférentiellement avec le petit sillon de la double hélice d'ADN riche en paires de bases A-T et cela de manière non covalente (**Nelson et al., 2007**). Leurs interactions s'effectuent préférentiellement sur des sites 5'-AATT et dans une moindre mesure sur des séquences 5'-ATAT. Par contre, des sites 5'-TTAA et 5'-TATA sont défavorables (**Blackburn et al., 2006**). De plus, par des études de résonance magnétique nucléaire (RMN), la distamycine, contrairement à la nétropsine, montre une interaction de type 2:1 centrée sur des sites constitués de plus de 4 paires de base A-T successives tel le site 5'-AAATTT en plus de sa stoechiométrie de fixation 1:1 (ligand:ADN) (**Fig. 51. B**). Dans ce cas précis, deux molécules de distamycine A orientées antiparallèlement interagissent côte à côte dans le petit sillon et la largeur est augmentée de 3,5 (interaction 1:1) à 4 Å (interaction 2:1) (**Pelton et al, 1989**). Cette interaction illustre la flexibilité conformationnelle que peut présenter le petit sillon de l'ADN.

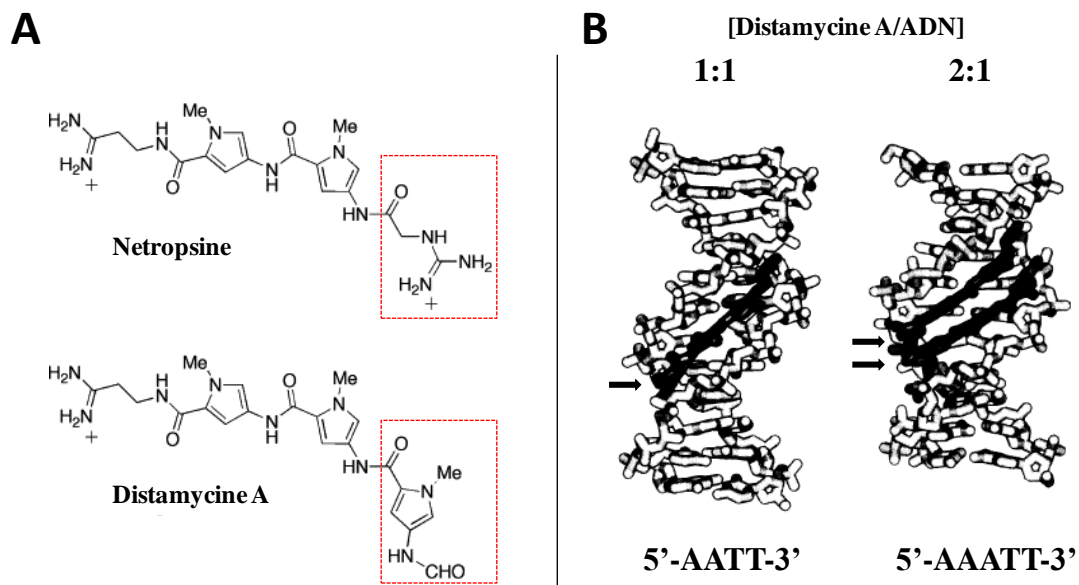


Figure 51: A. Structure de la nétropsine et la distamycine A. B. Complexes [distamycine A/ADN]. Les flèches noires indiquent la distamycine A (D'après Wemmer et al., 1997).

b. Pentamidine et Bérénil: ligands du petit sillon de l'ADN

Comme décrit pour la distamycine A et la nétropsine, ces diamidines interagissent avec le petit sillon de la double hélice d'ADN. Leur structure courbe, leur capacité à générer des structures courbes et les groupements amidines terminaux, à la fois chargés positivement et donneurs de liaisons hydrogènes, contribuent à une interaction au sein du petit sillon, en particulier ceux des parties d'ADN riches en paires de bases AT. Le groupement  $\text{NH}_2$  protubérant de la guanine empêche une reconnaissance similaire au sein de petit sillon de l'ADN riche en paires de bases GC (Wilson et al., 2008).

Pour la pentamidine, 5 paires de bases AT consécutives constituent un site d'interaction potentiel contrairement à 3 ou moins pour le bérénil. Cette interaction tient à l'établissement de liaisons hydrogènes directes entre les groupements amidines du composé et l'azote en position N3 de l'adénine ou l'oxygène en position C2 de la thymine (Edwards et al., 1992). La modulation structurale du nombre de groupements méthyles au sein du *linker* reliant les deux groupements phényl-amidines influence l'affinité d'interaction. Ceci est en lien avec le degré de courbure du composé induit par ces substitutions. Les composés ayant un nombre de groupements méthylènes impairs ont une plus forte affinité de fixation envers des séquences riches en paires de bases AT contrairement à ceux constitués d'un nombre pair. En effet, ces modifications influent sur la flexibilité de la molécule et donc sur sa courbure qui devrait mimer celle du petit sillon de l'ADN pour une reconnaissance optimale (Cory et al., 1992 ; Reddy et al., 1999).

Le bérénil présente une interaction au niveau du petit sillon sur des séquences riches en paires de bases AT similaire à son analogue la pentamidine, bien que son site de fixation peut se limiter à 3 paires de bases AT successives avec une préférence pour les séquences de type 5'-pupuATTpy-3' (pu : base purine ; py : base pyrimidine) (Reddy et al., 1999; Yoshida et al., 1990). Des tests d'empreinte à la DNase I illustrent cette sélectivité d'interaction envers les sites 5'-AATT ou 5'-ATAT au détriment des sites inverses 5'-TTAA ou 5'-TATA (Abu-Daya et al., 1995). Par ailleurs, ce composé peut devenir un intercalant en présence de sites riches en paires de bases GC (Colson et al., 1996). Le composé étant légèrement moins long que la pentamidine, l'interaction dans le petit sillon ne met en avant qu'une seule liaison hydrogène directe entre un des deux groupements amidines du composé et l'azote N3 de l'adénine. L'autre groupement amidine interagit avec l'ADN à travers une molécule d'eau (Fig. 52) (Brown et al., 1990). Ce cas illustre la contribution de l'environnement moléculaire pour l'établissement de complexes [molécule/ADN] et dont d'autres diamidines, citées dans les paragraphes suivants, en confirment l'existence. Au final, ces deux composés ne modifient que très peu la topologie de la double hélice d'ADN.

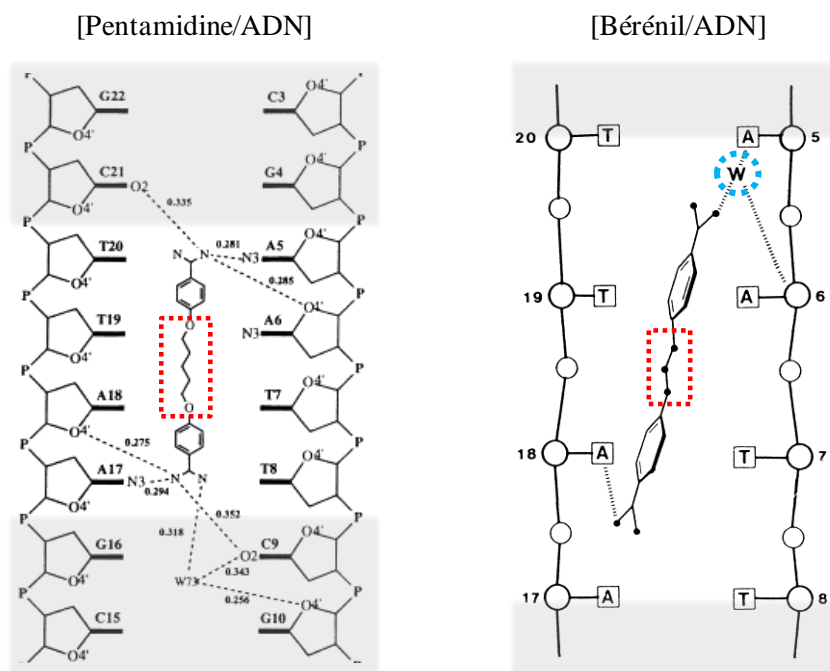
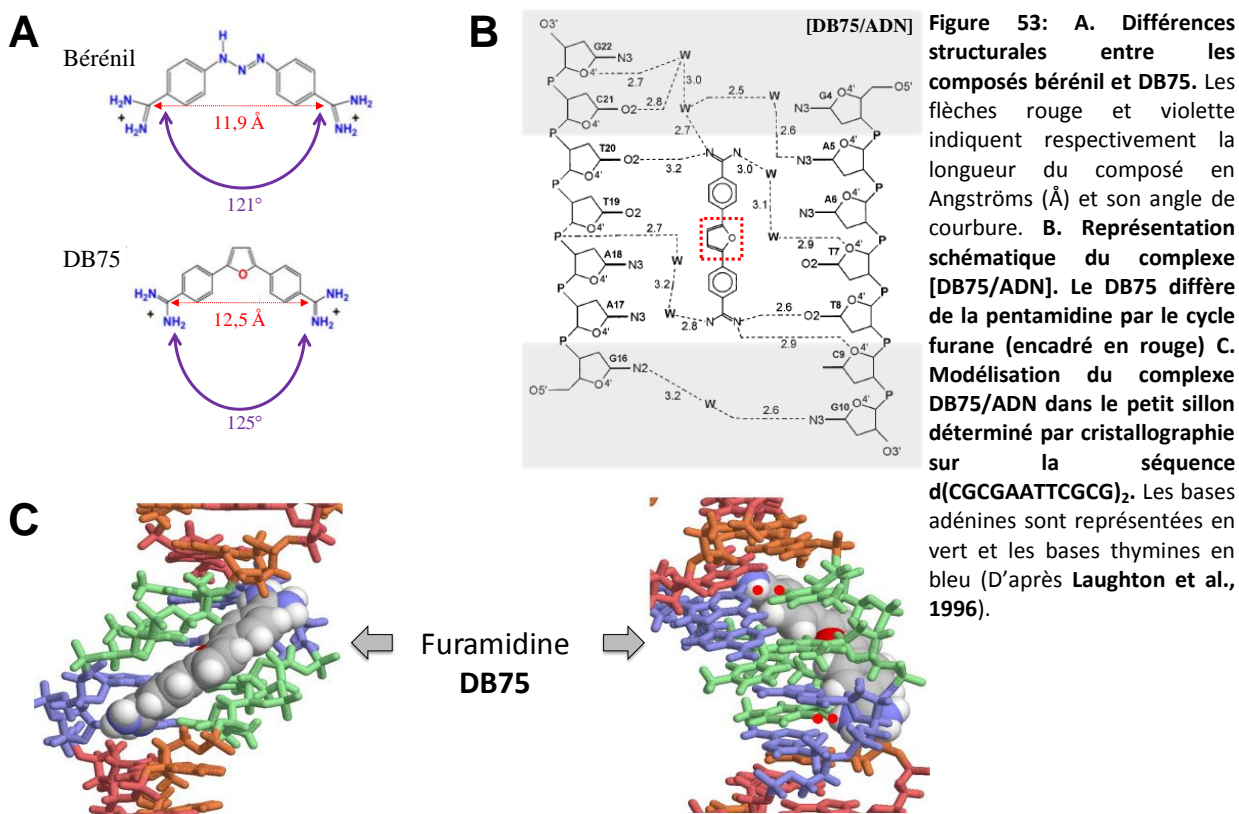


Figure 52: Représentations schématiques des complexes [Pentamidine/ADN] et [Bérénil/ADN]. Les deux composés diffèrent par le nombre de groupements méthyles dans la structure centrale (encadrés rouges). W (entouré en bleu): H<sub>2</sub>O (D'après Reddy et al., 1999).

c. DB75 : le chef de file de la famille des dérivés DB:

*i. Ligand du petit sillon de l'ADN*

Etant donné les toxicités importantes de ces composés jusqu'alors développés et utilisés pour les traitements antiparasitaires, des analogues furent et sont toujours synthétisés dont la famille des dérivés DB avec le 2,5-bis(4-guanylphényl)furane (furamidine ou DB75) ainsi désigné comme chef de file. Celui-ci diffère de la structure du bérénil par la modification du groupement central thiazène en cycle furane. La formation du complexe DB75/ADN fut décrite en 1996 par Laughton grâce à des études cristallographiques et spectroscopiques sur le dodécamère d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> incluant un site riche en paires de bases AT. En comparaison au bérénil, le DB75, légèrement plus long (DB75: 12,5 Å ; bérénil: 11,9 Å) et moins courbe (DB75: 125° ; bérénil : 121°), peut établir deux liaisons hydrogènes directes avec le petit sillon de l'ADN par ses deux extrémités amidines liant les oxygènes des bases thymines de part et d'autre des deux brins d'ADN. Le schéma présente aussi, comme pour le bérénil, des interactions indirectes avec le petit sillon médiées par des molécules d'eau. Sur cette même séquence, les interactions électrostatiques et de types Van der Waals sont supérieures en présence du DB75 et celui-ci interagit plus fortement avec l'oligomère en comparaison au bérénil (DB75: Keq = 6,7 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> ; bérénil: Keq = 6,6 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> ; Keq représentant la constante d'équilibre déterminée par RPS: Résonance Plasmonique de Surface) (Fig. 53) (Laughton et al., 1996).



ii. Spécificité d'interaction au sein de séquences riches en paires de bases AT

A l'instar du bérénil, le diphenyl-furane diamidine DB75 présente aussi une forte affinité d'interaction pour les séquences riches en paires de bases AT, notamment les sites de type 5'-AATT (Mazur et al., 2000; Liu et al., 2008). A l'inverse, les sites 5'-TTAA, sont défavorables avec des constantes d'affinité 100 fois moindre. Cette variabilité de reconnaissance serait liée à la différence structurale du petit sillon au niveau des séquences de type 5'-TTAA et 5'-AATT. Le premier, plus large que le second, n'est pas aussi optimal dans l'interaction de ligands au sein du petit sillon (Price et al., 1993; Hampshire et al., 2008).

Par ailleurs, il existe pour ce composé, ainsi que pour d'autres diamidines, une fixation par intercalation sur des séquences riches en paires de bases GC mais celle-ci est faible et correspond davantage à un mode d'interaction secondaire non spécifique pour de plus fortes concentrations utilisées (Nguyen, et al., 2002).

### 3. Relations structure-activité

Sur la base de ces données structurales, le *design* rationnel de ces molécules a permis d'établir certaines relations structure - affinité et/ou structure - activité. Seules quelques modifications seront ici décrites vis-à-vis de leur relation structure - activité étant donné le nombre conséquent de ces composés (Fig. 54).

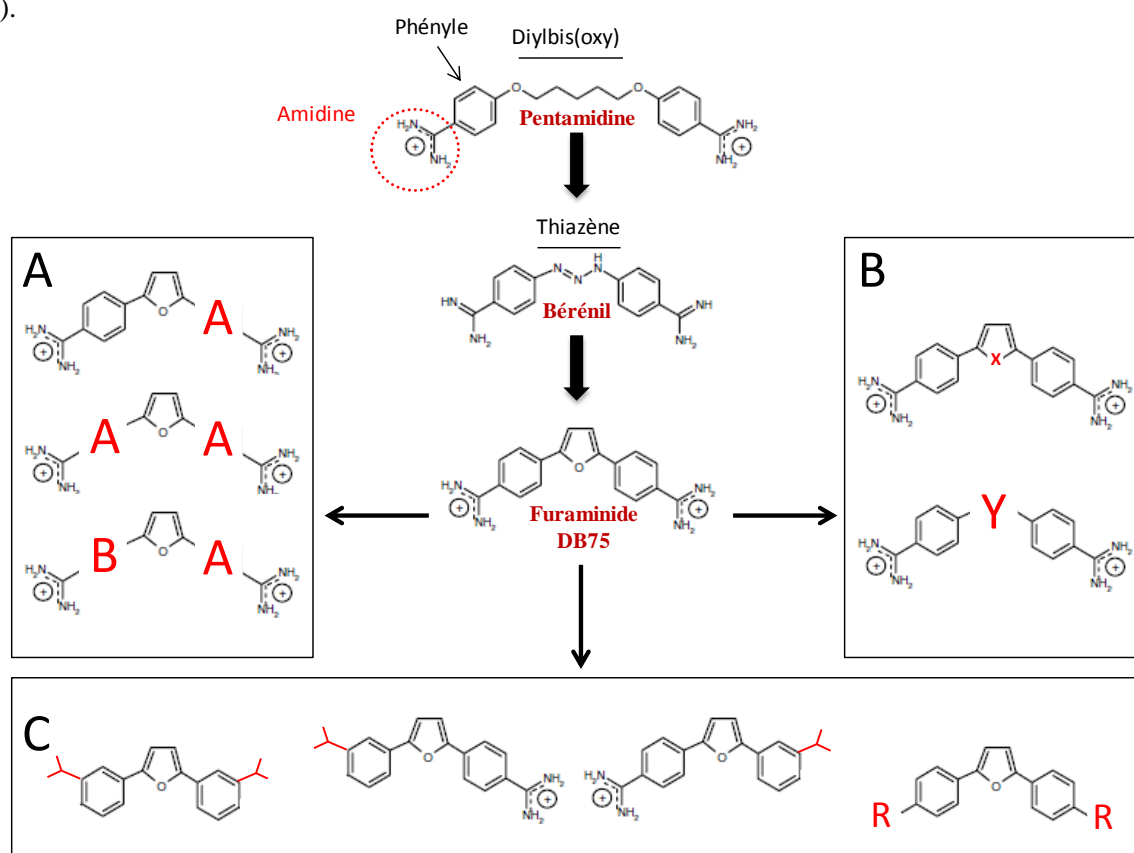


Figure 54: Modifications structurales des diamidines.

a. Modulation du/ des groupements phényles [A] :

i. Dérivés benzimidazoles

La modulation structurale des groupements phényles a fait l'objet d'études quant à son impact sur la reconnaissance du petit sillon de l'ADN. Pour cela, la substitution d'un ou des deux cycles phényles du composé DB75 par un cycle benzimidazole fut entreprise aboutissant aux composés DB293 et DB270, respectivement. Alors que le DB270, composé symétrique, présente des propriétés d'interaction similaires à son analogue furamidine, le dérivé asymétrique DB293 affiche une reconnaissance plus affine pour le petit sillon de l'ADN incluant des paires de bases GC (Wang et al., 2000). Ce composé est capable d'interagir avec les sites classiques de type 5'-AAAA et 5'-ATTA sous forme de monomère mais aussi et de manière plus affine avec les sites ayant le motif 5'-ATGA sous forme de dimère (Fig. 55). La particularité du DB293 réside dans cette dernière interaction qui peut induire une modification structurale locale de l'ADN par cette dimérisation. Une seule substitution au sein du site 5'-ATGA (T→G) ou son inversion (5'-ATGA → 5'-TCAT) suffit à déstabiliser cette interaction (Bailly et al., 2001 ; Tanious et al., 2003).

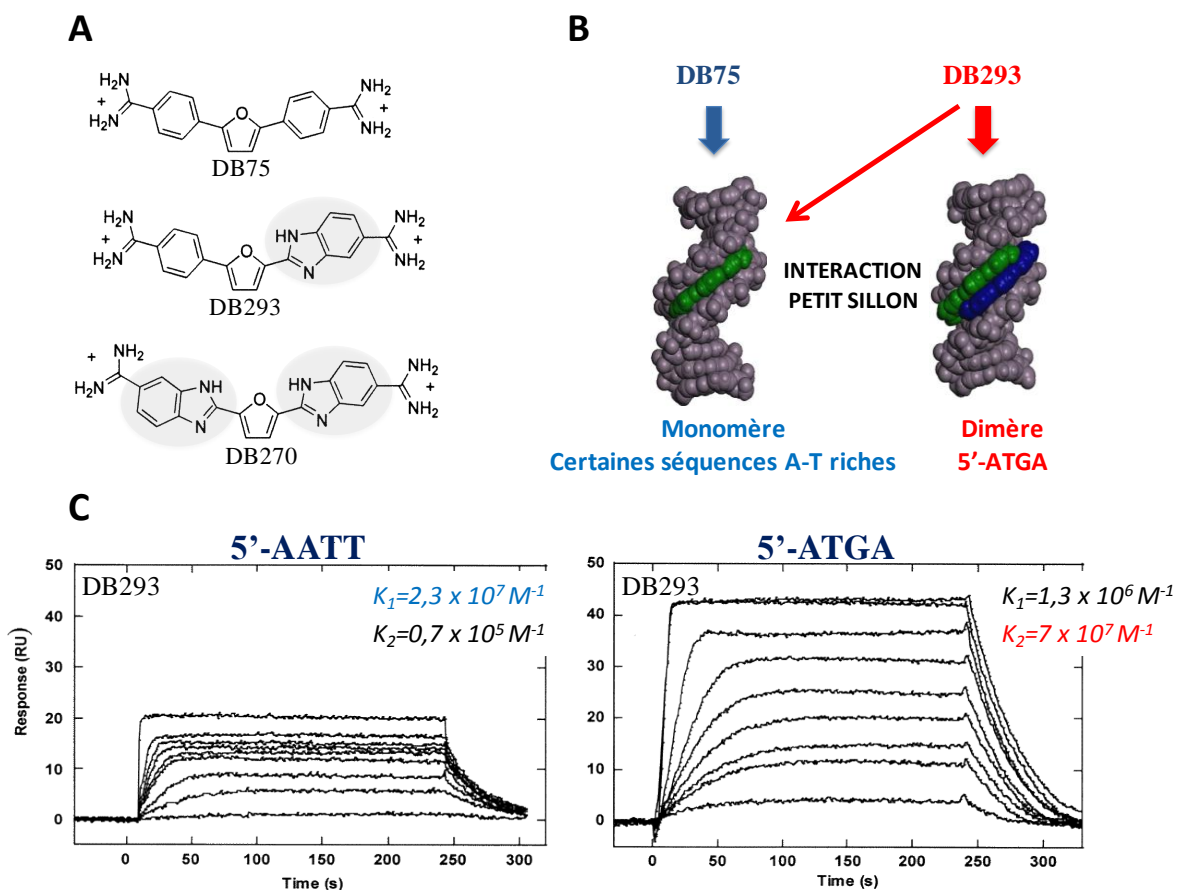


Figure 55: A. Structures des dérivés benzimidazoles DB293 et DB270. B. Modélisation du mode d'interaction du DB293 en comparaison au DB75. C. Sensogrammes de RPS du DB293 vis-à-vis d'oligonucléotides contenant le site 5'-AATT ou le site 5'-ATGA.  $K_1$  et  $K_2$  : constantes d'interactions sous forme de monomère ( $K_1$ ) ou de dimère coopératif ( $K_2$ ) (D'après Bailly et al., 2001).

Cette découverte a largement contribué au développement des dérivés benzimidazoles dans l'espoir de sélectionner des composés ayant des spécificités de séquences d'interaction optimales.

ii. Mise en évidence de dérivés benzimidazoles plus sélectifs

Suite au DB293, Mallena et al. ont opté pour la combinaison de deux modifications structurales des composés DB dont chacune avait au préalable montré une augmentation dans l'affinité et la spécificité de reconnaissance de séquences riches en paires de bases AT (Mallena et al., 2004). Le dérivé phényle-thiophène-benzimidazole DB818 possède un cycle thiophène à la place du cycle furane du DB293 (Fig. 56.A) (Liu et al, 2008).

Les méthodes d'empreintes à la DNaseI, de RPS et de cristallographie aux rayons X ont fait du DB818 l'une des diamidines les plus affines et les plus spécifiques pour le petit sillon de sites AT riches de l'ADN. En effet, les profils d'empreinte à la DNaseI sont certes distincts de ceux obtenus pour le DB293 mais très similaires aux profils du DB75 et DB351 à savoir une interaction préférentielle sur des sites AT riches en particulier le site 5'-AATT, toutefois l'affinité du DB818 pour ce site est 10 fois supérieure à celle des deux derniers composés (Fig. 56.B) (Mallena et al., 2004).

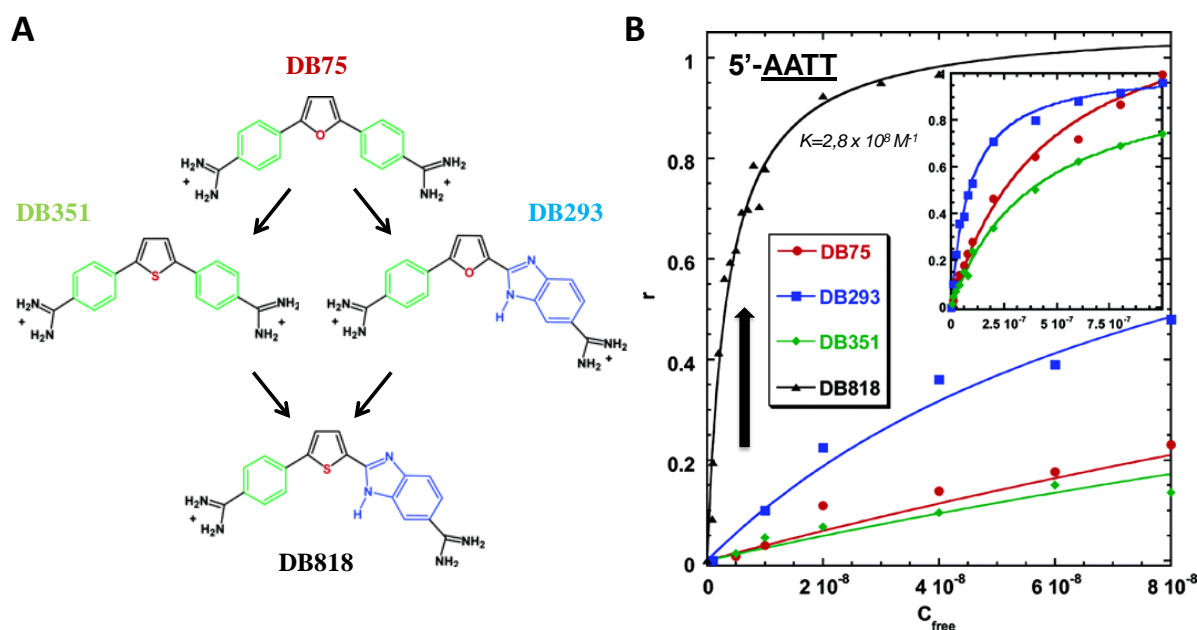
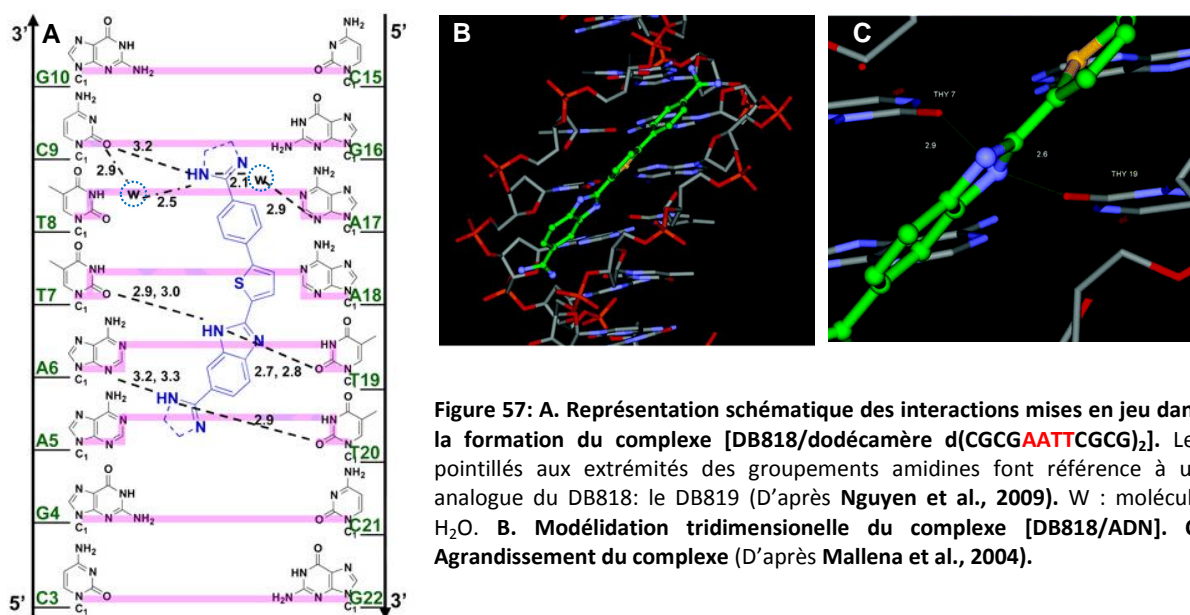


Figure 56: A. Structures du DB818 et des composés dont il dérive. B. Mesures de l'affinité d'interaction des composés DB vis-à-vis d'un oligonucléotide en hairpin contenant le site 5'-AATT. K: constante d'interaction (D'après Mallena et al., 2004).

La mesure des constantes d'affinité confirme cette supériorité de reconnaissance notamment pour les sites 5'-AATT et 5'-ATAT vis-à-vis de ces composés analogues. Enfin, les données de titrations calorimétriques isothermes et cristallographiques apportées soutiennent que cette interaction est distincte par une enthalpie plus favorable dans la formation du complexe et un angle de courbure optimum (influencé par la différence de taille entre l'atome de soufre et l'atome d'oxygène) pour



l'établissement de liaisons hydrogènes et de Van der Waals avec la séquence 5'-AATT. Aux liaisons hydrogènes directes classiquement rencontrées pour ces diamidines (extrémités amidines qui interagissent avec l'atome d'oxygène O2 de la base thymine T20 d'une part et avec l'atome d'oxygène O2 de la cytosine C9 d'autre part), une troisième liaison directe met en jeu l'amidine interne du groupement benzimidazole qui lie à la fois les atomes d'oxygènes des thymines T7 et T19 (**Fig. 57**) (**Mallena et al., 2004**).



**Figure 57: A. Représentation schématique des interactions mises en jeu dans la formation du complexe [DB818/dodécamère d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>].** Les pointillés aux extrémités des groupements amidines font référence à un analogue du DB818: le DB819 (D'après **Nguyen et al., 2009**). W : molécule H<sub>2</sub>O. **B. Modélisation tridimensionnelle du complexe [DB818/ADN]. C. Agrandissement du complexe (D'après Mallena et al., 2004).**

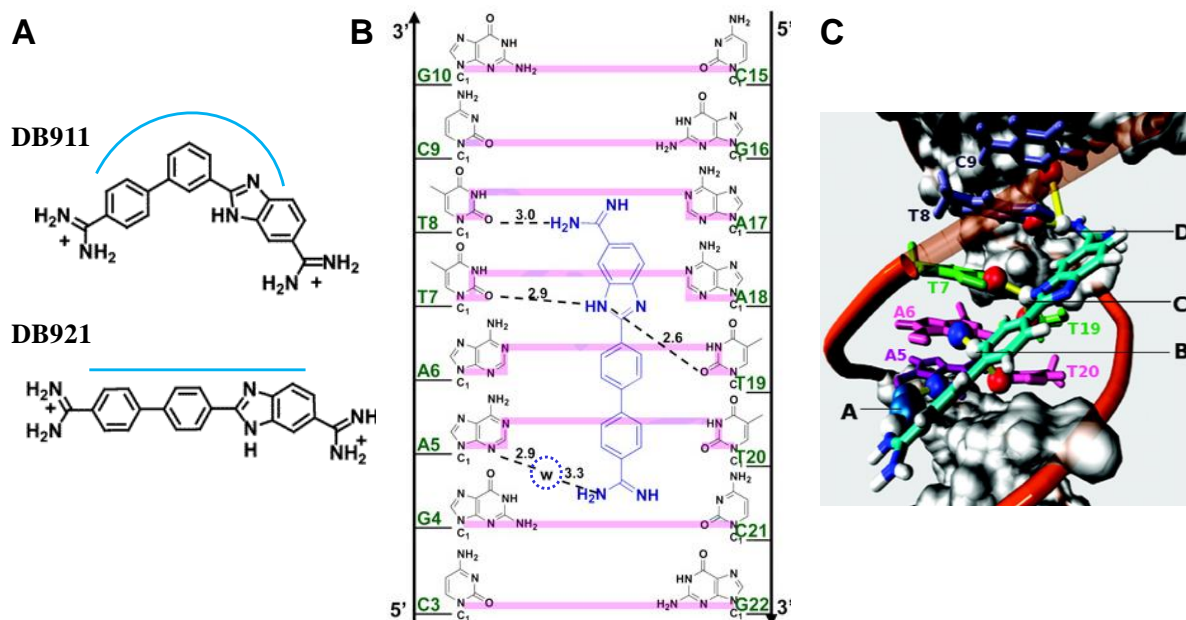
Ce composé présente par ailleurs une interaction avec des séquences riches en paires de bases GC mais celle-ci est insignifiante en termes d'affinité étant donné les fortes concentrations nécessaires pour l'observation de ce phénomène (**Mallena et al., 2004**).

### iii. Intervention des molécules d'eau

De par leur mode d'interaction, d'autres dérivés benzimidazoles ont montré l'importance des molécules d'eau pour l'établissement de complexes [ligand/petit sillon de l'ADN] alors qu'à priori ce dernier n'était pas prédit. De nombreuses diamidines dont celles présentées précédemment font intervenir des molécules d'eau dans la stabilisation des complexes [diamidines/ADN] mais rares sont celles qui utilisent les molécules d'eau en tant que partenaires créant une liaison directe entre le ligand et l'ADN. Tel est le cas du DB921.

Analogue du DB293, ce dérivé biphenyl-benzimidazole diffère par une para-substitution du cycle furane en cycle phényle engendrant une diminution de l'angle de courbure et une structure plus plane, dont le mode de fixation semblait incompatible avec la courbure du petit sillon de l'ADN. Pourtant Miao et al. ont mis en évidence une interaction sur des séquences riches en paires de bases AT, plus

affine que le DB75 ou l'isomère DB911 (position méta du cycle phényle). Par des études de cristallographie aux rayons X, une molécule d'eau est apparue comme l'élément complétant la courbure du DB921 pour une reconnaissance optimale de celle du petit sillon. Et en effet l'affinité d'interaction est 10 fois supérieure à celles des DB75 et DB911 sur des sites de type 5'AATT (**Fig. 58**) (Miao et al., 2005; Athri et al., 2009).



**Figure 58:** A. Structures des dérivés diphenyle-benzimidazoles: DB911 et DB921. Le DB921 est davantage plan (droite bleue) par rapport au DB911 (arc bleu) B. Représentation schématisée simplifiée des liaisons hydrogènes directes mises en jeu lors de l'interaction du DB921 avec l'ADN (D'après Nguyen et al., 2009). C. Modélisation du complexe [DB921/d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>]: (A) molécule d'eau reliant par une liaison hydrogène le groupement phényle-amidine du DB921 à l'azote N3 de l'adénine A5; (B) interaction CH...N/O : entre le groupement CH du cycle phényle central et l'azote N3 de l'adénine A6 ou l'oxygène O2 de la thymine T20; (C) liaison hydrogène entre l'azote interne du groupement benzimidazole et les atomes d'oxygène O2 de la thymine T7 et T19; (D) liaison hydrogène entre le groupement amidine externe et les atomes d'oxygène O2 de la thymine T8 et la cytosine C9.

b. Modulation du cycle furane [B] :

*i. Dérivés thiophènes et sélénophènes*

La modification de l'oxygène porté par le groupement furane en un atome de soufre ou de sélénium aboutit respectivement aux composés DB351 et DB1213. Ce simple changement induit des différences quantitatives notables dans l'interaction des composés avec des séquences riches en paires de bases AT. Comme le DB75, ils présentent tout deux une interaction au sein du petit sillon de l'ADN mais une meilleure affinité d'interaction sur des séquences riches en paires de bases AT pour le DB351 et plus encore pour le DB1213. En effet, la modification d'un atome d'oxygène (plus petit) en un atome de sélénium (plus large) diminue certes la courbure du composé mais accroît la rotation des cycles phényles autour du cycle central et donc module la position des groupements amidines, donneurs de

liaisons hydrogènes. Cette libre rotation permet une meilleure reconnaissance au sein du petit sillon en comparaison au DB75, composé plus plan (**Fig. 59**) (**Liu et al., 2008**).

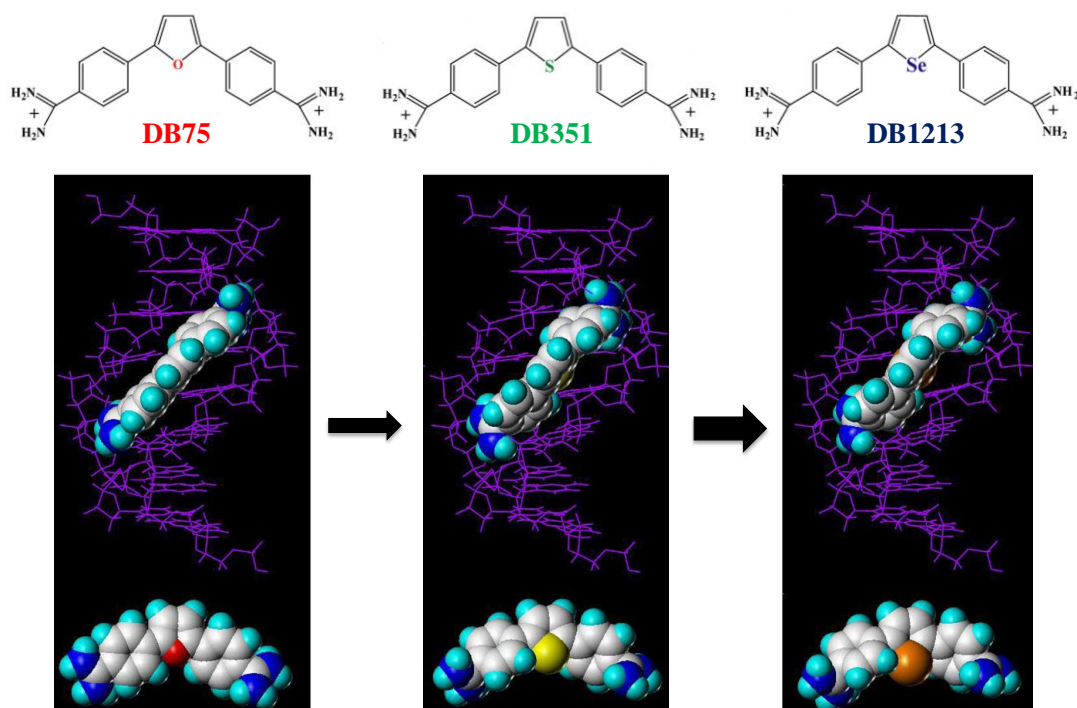
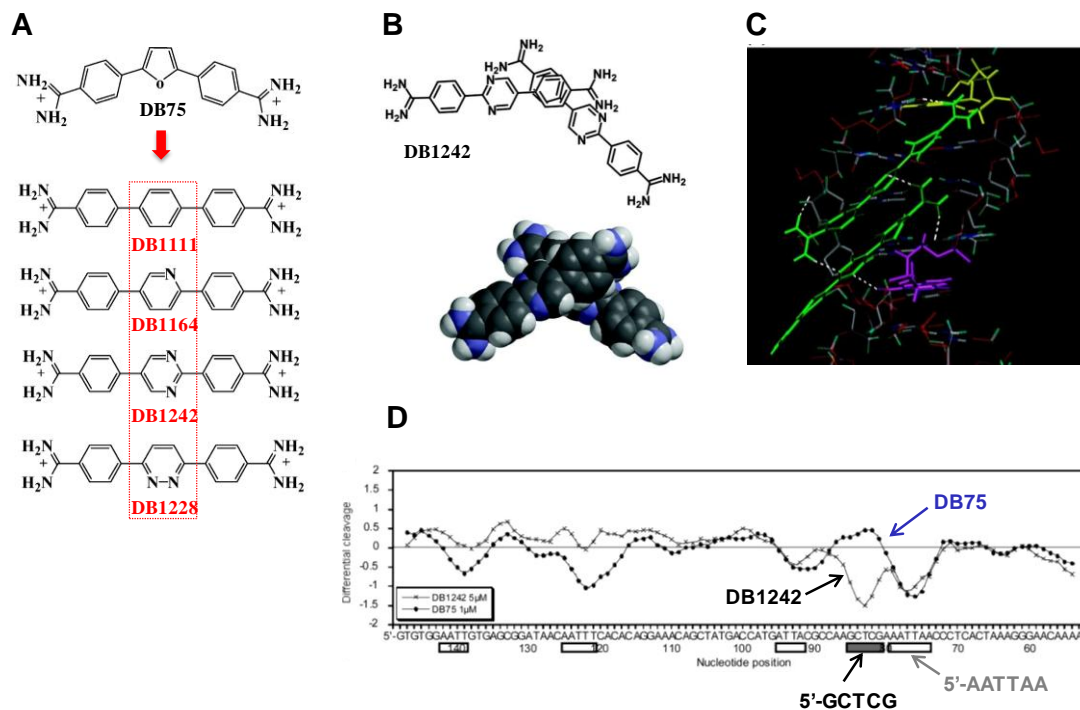


Figure 59: Modélisation de l'interaction des composés DB75, DB351 et DB1213 avec la séquence d'ADN en hairpin d(CCAAAGC).(GCTTTGG) (D'après Liu et al., 2008).

### ii. Dérivés triphényles et hétérocycliques pyrimidines

Bien que la structure courbe du ligand soit un des critères majeurs pour suggérer une interaction au niveau du petit sillon de l'ADN, des composés relativement plans peuvent par dimérisation acquérir la courbure nécessaire à leur interaction au sein du petit sillon. Le DB1242 en est l'exemple parfait et son site d'interaction palindromique diffère de part sa préférence pour les séquences riches en paires de bases GC.

A travers l'étude de l'impact de la substitution du cycle furane dans l'interaction avec le petit sillon de l'ADN, le laboratoire a mis en évidence la sélectivité de séquences envers les sites riches en paires de bases AT des composés DB1111, DB1164 et DB1228 et confirmé leur faible affinité de fixation par rapport au DB75. De manière originale, le dérivé hétérocyclique pyrimidine DB1242 interagit spécifiquement avec la séquence riche en paires de bases GC: 5'-GCTCG. Cette interaction est plus affine que celle rencontrée habituellement par les autres diamidines vis-à-vis des sites riches en paires de bases AT. Pour pouvoir réaliser ce complexe au sein du petit sillon, deux molécules de DB1242 forment un dimère très coopératif (**Fig. 60**) (**Munde et al., 2007**).



**Figure 60:** A. Structure de composés qui diffèrent du DB75 par leur cycle centraux: DB1111, DB1164, DB1242 et DB1228. B. Modélisation du dimère formé par deux composés DB1242. C. Modélisation de l'interaction du dimère de DB1242 avec le site d'interaction 5'-GCTCG du petit sillon de l'ADN. D. Spécificité d'interaction des composés DB75 et DB1242. L'analyse densitométrique provient de l'empreinte à la DNase I des composés DB75 (1 $\mu$ M) et DB1242 (5 $\mu$ M) sur la séquence d'ADN issue du plasmide pBS (D'après Munde et al., 2007).

### c. Modifications des groupements amidines [C]

En parallèle, l'influence à la fois de la position des groupements terminaux (para ou méta) et leur nature sur l'affinité, la sélectivité de séquence ainsi que le mode d'interaction à l'ADN a été étudié sur une série de dérivés du furamide de type DB359 et DB555 (**Fig 61**). Pour le DB359, les groupements diamidines sont substitués aux deux extrémités en position méta du cycle phényle alors que pour le DB555 un seul des deux groupements est en position méta par comparaison au DB75. L'impact de ces trois différentes substitutions (para-para, méta-para ou méta-méta) est de la même manière évalué par des modifications du groupement amidine en imidazoline (DB60, DB556, ou DB361) ou diméthyl-imidazoline (DB428, DB557 ou DB471) (**Nguyen et al., 2002**).

En termes de sélectivité de séquence, les tests d'empreinte à la DNase I ont révélé une protection des sites riches en paires de bases AT bien plus importante avec les composés para-para qu'avec les analogues méta-para et méta-méta. Cette sélectivité est toujours aussi restreinte à certains types d'enchainements de paires de bases AT comme l'est le DB75. En effet, ces composés fixent fortement les séquences 5'-AATT et 5'-ATAT alors qu'aucune empreinte n'est détectée pour les sites inverses 5'-TTAA et 5'-TATA. A l'identique, ces dérivés reconnaissent davantage les séquences 5'-AAAT plutôt que la séquence inverse 5'-TTTA. L'affinité d'interaction, mesurée par RPS est elle aussi en

faveur d'une fixation plus forte sur les séquences riches en paires de bases AT que GC pour les trois composés para-para. Enfin, ces données concordent parfaitement avec le mode d'interaction envisagé pour les composés para-para de par leur structure et les sites reconnus, à savoir une fixation dans le petit sillon de l'ADN. L'ensemble des composés montrent aussi une intercalation sur des séquences GC et ce mode d'interaction est prédominant pour les composés méta-méta aussi bien sur des sites riches en paires de bases AT que GC (**Fig. 61**) (Nguyen et al., 2002). Là encore, la courbure de la molécule peut expliquer le mode de fixation, le dérivé méta-méta DB359 étant plus fermé que le dérivé para-para DB75, il ne peut plus se fixer au petit sillon mais reste suffisamment plan pour s'intercaler entre les paires de bases de l'ADN.

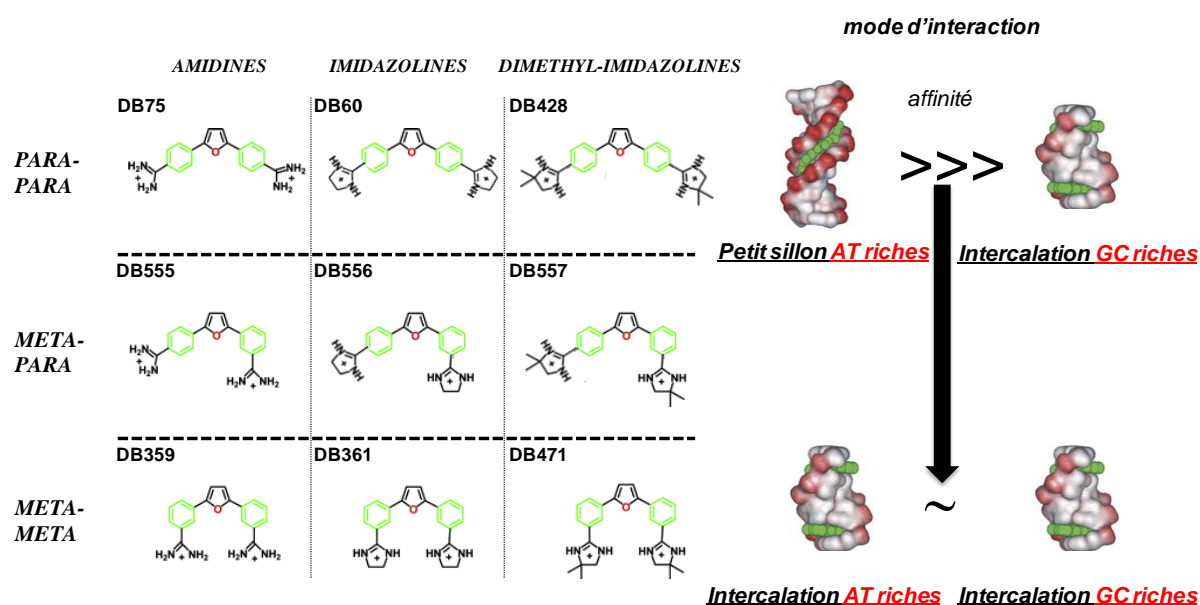


Figure 61: Structures des dérivés diphenyles-furanes incluant trois substituants différents : amidine, imidazoline et diméthyle-imidazoline en trois positions différentes : para-para, méta-para et méta-méta. Selon la position du substituant le mode d'interaction et l'affinité de séquence sont modifiés (D'après Nguyen et al., 2002).

En conclusion, les fortes spécificités pour les séquences riches en paires de bases AT donnent lieu à une reconnaissance accrue du petit sillon, contrairement à une plus faible spécificité d'interaction qui est davantage liée à une intercalation au niveau de sites riches en paires de bases GC.

#### 4. Seconde génération de composés diamidines

Nombres de dérivés DB ont la capacité de cibler sélectivement des séquences riches en paires de base AT à travers une interaction dans le petit sillon de l'ADN mais ne sont pas aussi sélectifs envers des séquences riches en paires de bases GC ou celles mixant des paires de bases GC et AT tels deux sites adjacents AT riches séparés par une ou deux paires de bases GC. Seuls quelques composés ont ces caractéristiques tels le DB293 ou le DB1242. Les chimistes se sont alors intéressés au *design* d'une

nouvelle génération de diamidines capable de cibler de tels sites. Sachant que l'interaction avec un seul et unique site au sein de l'ensemble du génome nécessiterait la reconnaissance sélective de 15 à 16 paires de bases, l'objectif est ici d'accroître le nombre de bases qui interagissent spécifiquement avec les diamidines (Dervan, 1986). Au niveau structural, les deux groupements amidines aromatiques, spécifiques de l'interaction AT-riche, sont connectés par un linker oxylalkyle où l'oxygène est un accepteur de liaisons hydrogènes. Ils pourraient interagir avec le groupement amine exposé par la guanine dans le petit sillon de l'ADN. Ainsi, ces composés cibleraient des séquences dont deux sites AT-riches adjacents sont séparés par une ou deux paires de bases GC. En effet, de tels dérivés synthétisés interagissent sous forme de monomère au sein du petit sillon avec les sites de type 5'-AAAGTTT avec une affinité d'interaction dépendant de leur structure. Les dérivés benzimidazoles font preuve d'une plus forte affinité de fixation, du même ordre que celle observée pour les séquences classiques de type 5'-AATT mais plus faible pour les sites 5'-AAAGCTTT incluant deux paires de bases GC (Fig. 62) (Rahimian et al., 2009).

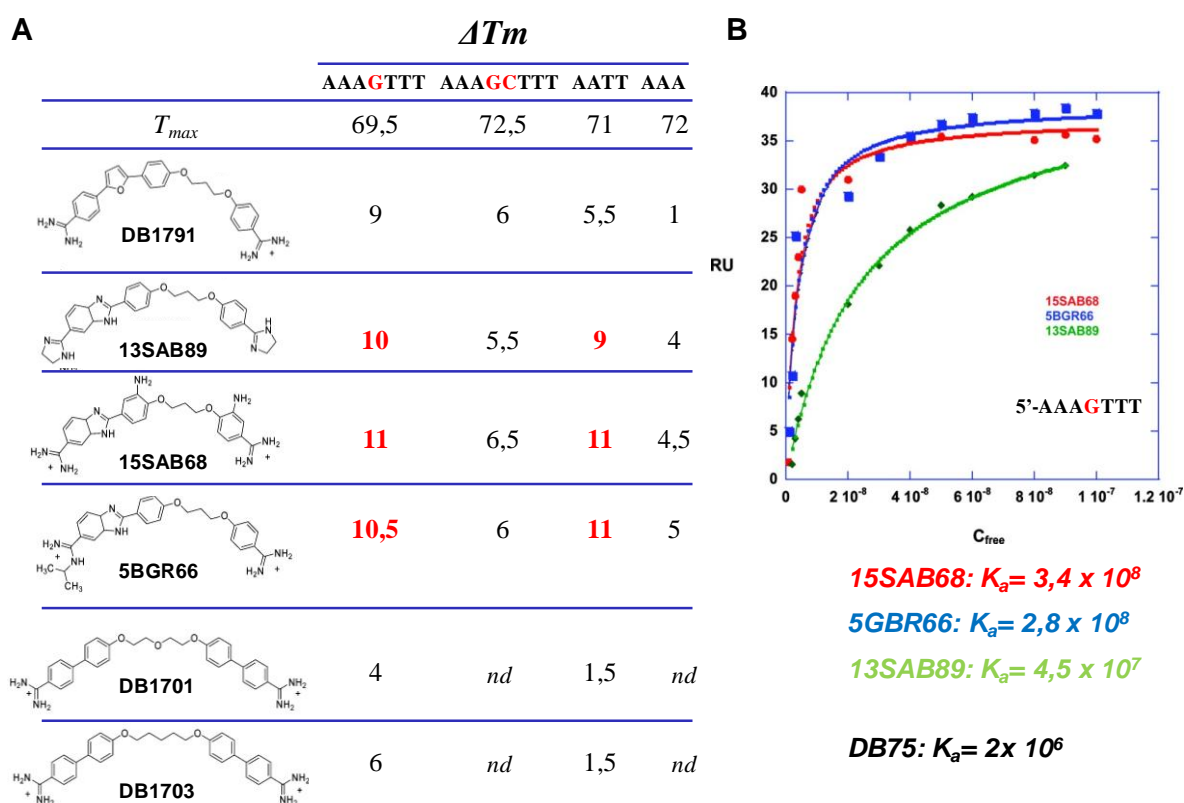


Figure 62: A. Structures des composés et  $\Delta T_m$  ( $= T_{max\ complexe} - T_{max\ ADN}$ ) en fonction des ADN testés. B. Mesures de l'affinité d'interaction ( $K_a$ ) des composés vis-à-vis d'un oligonucléotide en hairpin contenant le site 5'-AAAGTTT. Le  $K_a$  mesurée pour le DB75 évaluée sur cette même séquence est indiquée en référence (D'après Rahimian et al., 2009). *nd* : non déterminée.

Se référant à ces données, d'autres dérivés benzimidazoles ont été à l'identique synthétisés et évalués pour leurs propriétés d'interaction avec des régions AT-riches incluant des paires de bases GC (de types 5'-AATT**G**AATT ou 5'-AATT**G**CAATT). A l'inverse des résultats précédents, certains composés diamidines peuvent interagir spécifiquement avec deux sites AT-riches séparés par deux paires de bases GC, ceci à travers un nouveau mode d'interaction jusqu'à présent non décrit: deux

motifs diamidines benzimidazole, liés à la reconnaissance des sites AT riches, sont connectés par un linker dioxyalkyle permettant une interaction avec les paires de bases GC (Liu et al., 2012). Alors que les composés DB184 et RT533 interagissent classiquement sous forme de monomère dans le petit sillon de l'ADN sur le site 5'-AATT et sur les deux sites (complexe 2:1) contenus dans la séquence 5'-AATTGCAATT sans fixation coopérative significative, le composé RT546 ne reconnaît que faiblement le site 5'-AATT mais fortement le double site avec une interaction en dimère coopératif. Son analogue, ayant un *linker* plus rigide, interagit de la même manière en dimère coopératif sur cette dernière séquence (Liu et al., 2012).

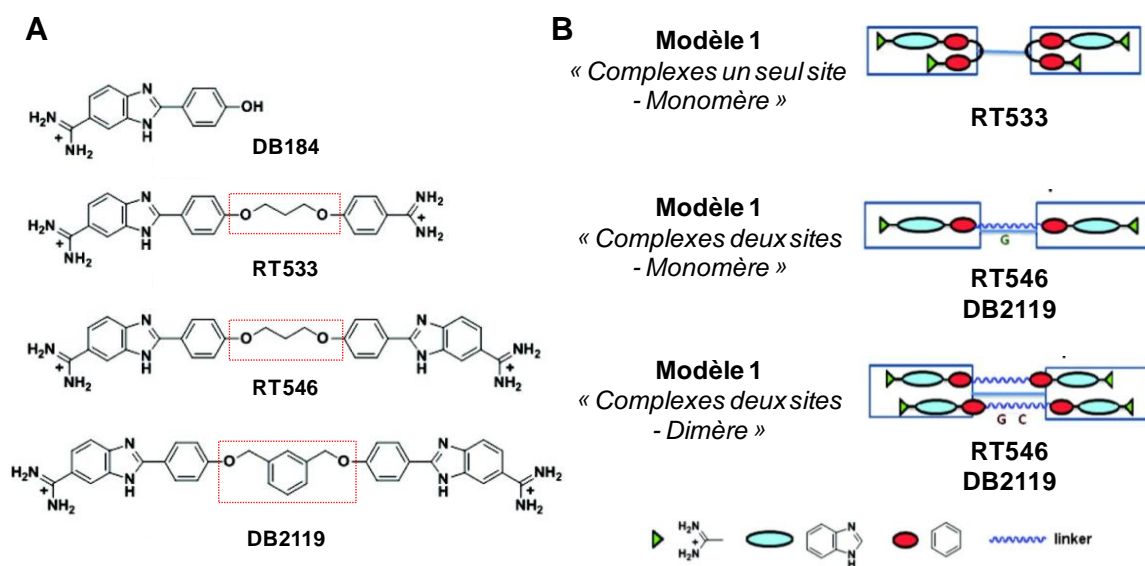


Figure 63: A. Structures chimiques des dérivés benzimidazoles. B. Représentation schématique des trois différents modèles d'interaction de deux sites AT riches adjacents (D'après Liu et al., 2012).

En conclusion, trois modèles d'interaction de ces dérivés diamidines permettent une reconnaissance au niveau du petit sillon de la double hélice d'ADN (Fig. 63):

- (1) le modèle du « complexe un site - monomère » où deux molécules reconnaissent chacune un seul site et dont l'interaction non coopérative est similaire à la fixation des diamidines classiques
- (2) le modèle du « complexe deux sites – monomère » où une seule molécule interagit avec les deux sites à la fois
- (3) le modèle « complexe deux sites – dimère » où deux molécules reconnaissent les deux sites et dont l'interaction est coopérative.

Ce troisième modèle constitue un nouveau mode de reconnaissance de régions adjacentes riches en paires de bases AT séparées par deux paires de bases GC et dont l'affinité et la sélectivité d'interaction sont considérables dans le développement d'inhibiteurs spécifiques de complexes [protéines/ADN].

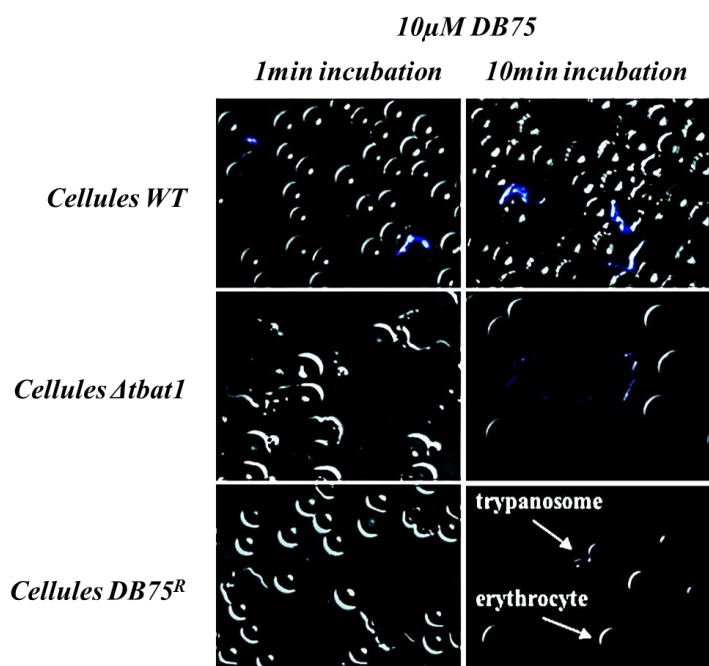
## 5. Mode d'action moléculaire

Bien qu'*in vitro* de nombreuses modifications structurales des dérivés ont permis de mettre en avant quelques points clé pour une interaction optimale, les conséquences de cette interaction moléculaire sont encore peu connues et détaillées. Néanmoins, quelques données expérimentales obtenues principalement chez des modèles parasitaires pourraient suggérer une similarité au sein de cellules humaines.

### a. Entrée cellulaire des diamidines

Etant donné le développement accru de ces diamidines en parasitologie, de nombreuses données expérimentales ont caractérisé leur pénétration au sein des parasites contrairement aux cellules humaines où la détermination de l'existence ou non d'un transport actif ou passif, spécifique ou non, unique ou multiple est toujours à l'étude.

De par les propriétés intrinsèques de fluorescence des dérivés furamidines, l'étude de leur distribution cellulaire a été facilitée. Leur structure dicationique et leur poids moléculaire supposait une diffusion lente passive pour la plupart des cellules. Néanmoins, le modèle parasitaire le plus étudié fait état de nombreux transporteurs potentiels au sein des cellules parasitaires dont le principal correspond au transporteur des adénosines/aminopurines P2 (Carter et al., 1995; De Koning et al., 2001). En effet, l'implication de ce transporteur dans l'entrée du DB75 a été caractérisé quelques années plus tard chez le parasite *Trypanosoma brucei* (Lanteri et al., 2006). Le composé pénètre rapidement au sein des parasites sauvages (WT) mais diminue rapidement dans les parasites mutants  $\Delta tbat$  (dépourvus du gène codant pour le transporteur P2) ou résistants au DB75 (DB75<sup>R</sup>) (Fig. 64). Ainsi, d'une part la résistance du parasite au composé est en lien avec sa pénétration cellulaire et, d'autre part, ce transporteur est nettement impliqué dans l'entrée du furamidine suggérant de même pour ses dérivés.



**Figure 64: Mise en évidence de l'entrée du DB75 par le transporteur adénosine/aminopurine P2 via la fluorescence intrinsèque du composé (bleu).** Le sang de chaque souris infectée respectivement par les cellules parasitaires WT,  $\Delta tbat1$  ou DB75<sup>R</sup>, fut incubé avec 10 $\mu$ M de composé DB75. Cellules WT : cellules sauvages ; Cellules  $\Delta tbat1$  : cellules dont le gène *tbat1* codant pour le transporteur P2 est manquant ; Cellules DB75<sup>R</sup> : cellules ayant développées une résistance au DB75 (D'après Lanteri et al., 2006).



Cependant, d'autres mécanismes interviennent dans l'entrée des diamidines étant donné la présence du composé au sein du parasite et cela malgré l'absence du transporteur P2. Par ailleurs, la faible différence de sensibilité au DB75 des souris infectées par des parasites sauvages ou mutants suggèrent qu'il existe d'autres mécanismes de transport. En effet, la pentamidine entre dans le parasite à travers deux autres transporteurs en plus du P2 : les transporteurs de la pentamidine d'affinité haute ou faible HAPT1 et LAPT1 (*HAPT1: high affinity pentamidine transporter 1*; *LAPT1: low affinity pentamidine transporter 1*) mais aucune donnée ne concerne l'entrée du DB75 et de ses dérivés par ces derniers (**Bray et al., 2003**).

Transposé aux cellules de mammifères, les seules données expérimentales citent les transporteurs de cations organiques humains (hOCTs: hOCT1 et hOCT2) comme porte d'entrée des diamidines telle que la pentamidine et le DB75 (**Min et al., 2009**). D'autres transporteurs, tel le système de transport des polyamines, ont été proposés comme agissant dans l'entrée des diamidines sur la base de leur structure. Toutefois, à l'heure actuelle, aucune caractérisation du transporteur des polyamines n'a été établie ce qui rend cette étude si complexe.

Bien que leur mode d'entrée ne soit pas finement détaillé chez l'être humain, ces composés entrent rapidement dans la cellule et leur fluorescence intrinsèque a permis l'étude de leur localisation cellulaire au sein de cellules de mammifères, notamment chez des cellules cancéreuses objets de notre étude.

#### b. Distribution cellulaire des dérivés DB :

##### *i. Modèle du DB75 chez le parasite*

Par la fluorescence intrinsèque du DB75 et son analogue le DB820, les données expérimentales montrent leur accumulation très rapide (dans les premières minutes) au sein des organelles du parasite contenant l'ADN: le noyau et le kinétoplaste. Très tôt (2h post-traitement) les composés sont visibles au sein des acidocalcisomes. Enfin, à 24h post-traitement, la fluorescence du kinétoplaste disparaît témoignant d'une dégradation de cette organelle et les cellules meurent dans les 24 à 48h post-traitement (**Fig. 65**) (**Mathis et al., 2006**).

Cette dégradation ciblée du kinétoplaste serait une conséquence directe du mode d'interaction de ces composés.

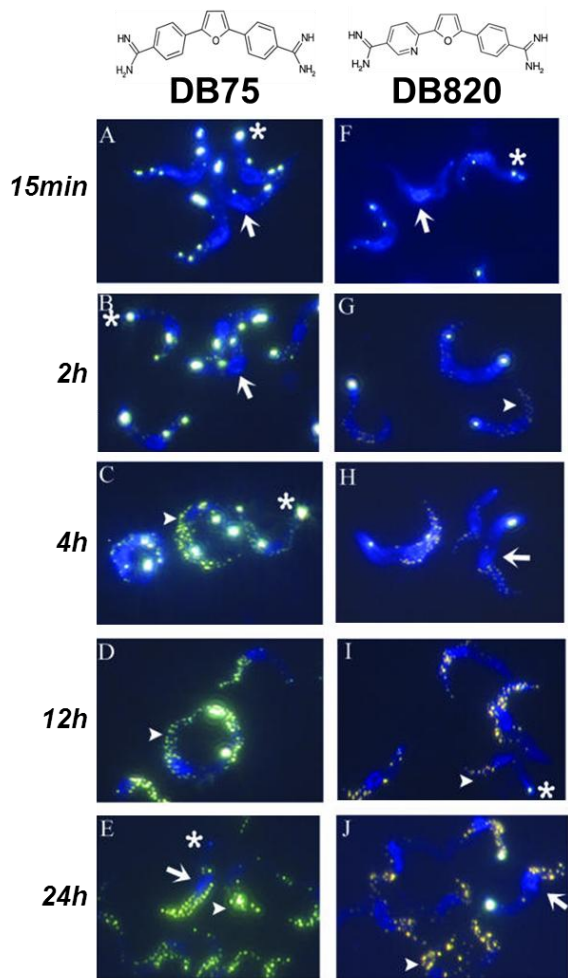


Figure 65: Détection par microscopie de fluorescence de la localisation des composés DB75 et DB820 au sein du parasite *Trypanosoma brucei* après injection des composés par voie intraveineuse dans des souris infectées par ce parasite. Les photos A à E représentent la localisation du DB75 (bleu) et celles annotées F à J du DB820 (bleu) à différents temps après traitement. Le noyau du parasite est localisé par une flèche blanche, le kinétoplaste par un astérisque et les acidocalcisomes par une pointe de flèche (D'après Mathis et al., 2006)

Le kinétoplaste contient le génome mitochondrial du parasite composé d'un réseau d'ADN entremêlé. Il est composé de deux types d'ADN circulaires: des minicercles (de 0,5 à 2,5 kpb) et des maxicercles (20 à 40 kpb) (Fig. 66). La particularité de ce réseau tient aux minicercles qui présentent une structure courbe de l'ADN générée par la succession de sites riches en paires de bases AT (Jensen et al., 2012).

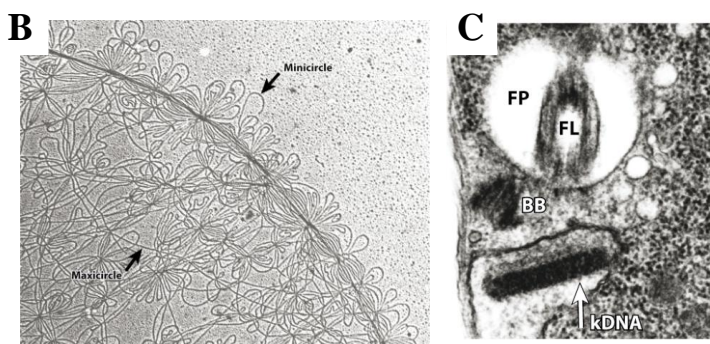
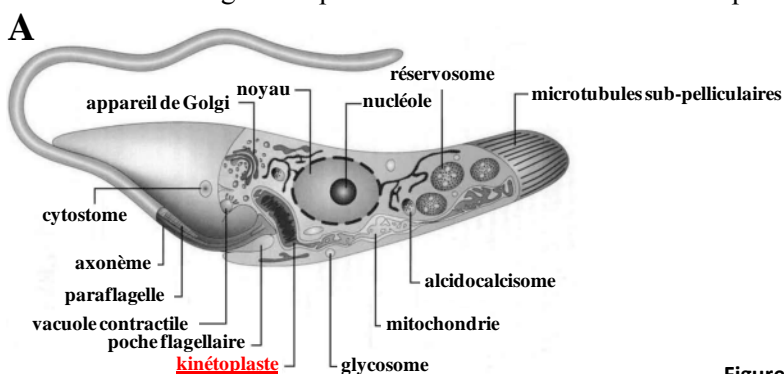


Figure 66: A. Représentation schématique de la structure du parasite *Trypanosoma cruzi* (D'après Souza, 2008). B. Photo de microscopie électronique de la bordure du réseau d'ADN au sein du kinétoplaste de *Crithidia fasciculata* indiquant les formes maxicercles (flèche du bas) et minicercles (flèche du haut) de l'ADN au sein du kinétoplaste. C. Photo de microscopie électronique du kinétoplaste (kDNA) de *Trypanosoma brucei*. FP : poche flagellaire; FL : flagelle; BB : corps basal; kDNA : ADN du kinétoplaste (D'après Jensen et al., 2012).

### c. Du ligand de l'ADN à la dégradation du kinétoplaste

L'implication du kinétoplaste serait liée à la composition de son ADN riche en paire de bases AT, cibles de la furamidine ou de ses dérivés. L'importance de cette organelle dans l'activité antiparasitaire des diamidines a clairement été mise en évidence par l'utilisation de parasites dyskinétoplastes (dépourvus en kinétoplaste). La comparaison de souris infectées par la souche parasitaire sauvage vis-à-vis de celle infectées par la souche parasitaire dyskinétoplaste montre une résistance à la mort sous traitement avec des diamidines (à l'instar du bérénil) seulement pour les souris infectées avec la souche sauvage. Les souris infectées avec la souche dépourvue en kinétoplaste ne répondent pas aux diamidines (Agbe et al., 1995). Néanmoins, il n'existe pas de corrélation stricte entre l'activité antiparasitaire, l'accumulation et la distribution des dérivés furamidines au sein du trypanosome suggérant un mécanisme d'action plus complexe et multiple (Mathis et al., 2007). L'accumulation au sein du kinétoplaste serait donc une condition nécessaire mais non suffisante à l'induction de la mort du parasite.

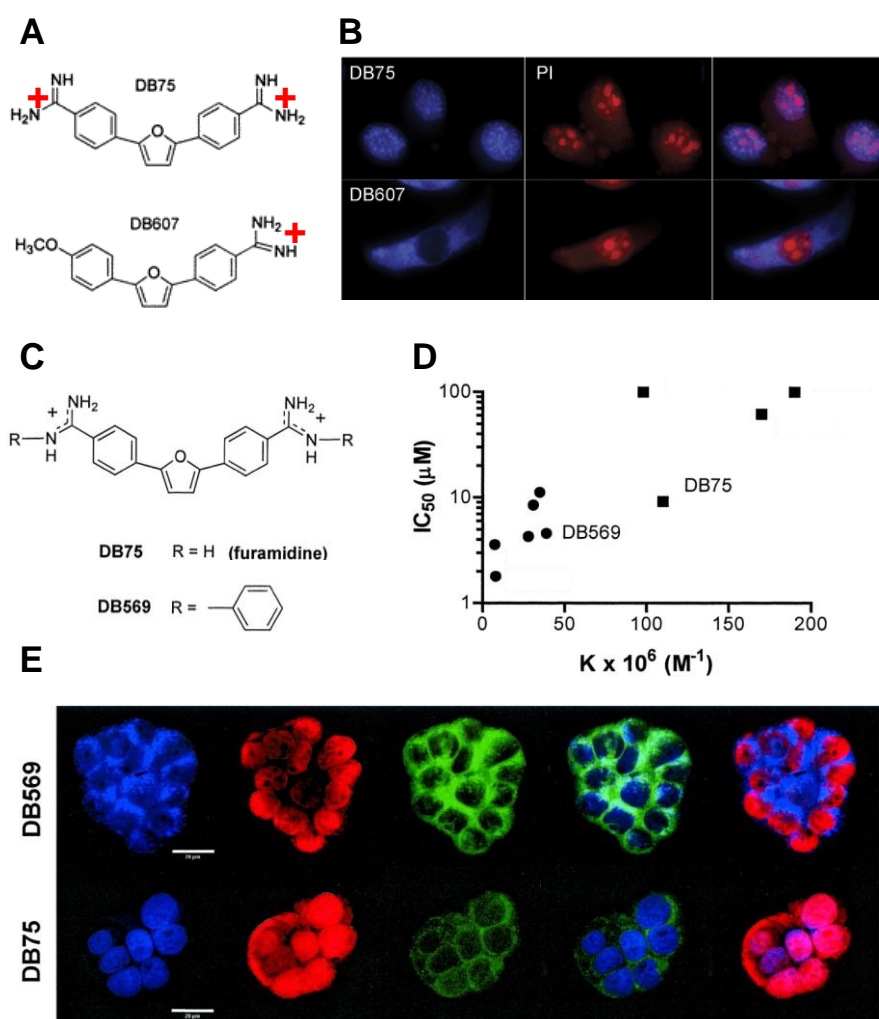
Bien que l'ADN ait été identifié comme cible moléculaire, le mécanisme précis conduisant à la dégradation du kinétoplaste et à la mort du parasite est peu décrit et reste sujet à diverses hypothèses. Parmi celles-ci, la destruction du kinétoplaste peut être le résultat d'une interférence des composés avec l'activité de la topoisomérase II lors du clivage et de la religation de l'ADN minicercle au cours de la réplication par exemple (Shapiro et al., 1990; Dykstra et al., 1994). Des erreurs de réplication ainsi qu'une dégradation de l'ADN pourraient être le résultat d'une modification de la topologie de l'ADN ou d'inhibition de complexes [protéines/ADN] à travers l'interaction de ces composés. Toutefois, ce mécanisme peut être modulé par le mode d'interaction des dérivés DB dont certains ont une activité antiparasitaire indépendante de l'altération de l'activité de la topoisomérase II (Bailly et al., 1999). D'autres mécanismes varient en fonction de l'organisme étudié telle que l'inhibition par le DB75 de la respiration cellulaire mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Lanteri et al., 2004). Ce dernier agit différemment chez le *Plasmodium falciparum*, où, principalement localisé dans le noyau, il ralentit la maturation du parasite par inhibition de l'expression de gènes impliqués dans son développement (Purfield et al., 2009).

La modification conformationnelle de l'ADN serait un des points clé de l'activité cytotoxique de ces dérivés. En effet, malgré une interaction dans le petit sillon de l'ADN, ces composés sont capables d'inhiber le mécanisme de clivage de l'ADN effectué par des enzymes de restriction, protéines qui interagissent avec le grand sillon de la double hélice d'ADN (les enzymes de restriction, protéines procaryotiques, sont ici utilisées comme modèle de protéines ciblant le grand sillon de la double hélice d'ADN) (Nguyen, 2009). A l'identique, l'interaction à l'ADN de facteurs de transcription, protéines qui interagissent aussi principalement dans le grand sillon de l'ADN, est décrit *in vitro* par l'utilisation du composé DB293 sur des extraits nucléaires de cellules de mammifères (carcinome du colon: HT29) dont les détails moléculaires seront décrits en pages 120 et 121.

*i. Modèle du DB75 et de ses dérivés chez des cellules de mammifères*

Les cellules de mammifères ne disposent pas d'un réseau d'ADN similaire au kinétoplaste. Toutefois, à l'instar du modèle parasitaire, les composés pénètrent rapidement (dès les premières minutes d'incubation) au sein de la cellule et atteignent le noyau et leur cible moléculaire: l'ADN.

L'étude de la localisation des dérivés DB au sein des cellules de mammifère a clairement montré une accumulation cellulaire variable en fonction de la structure des composés. Les dérivés DB ayant deux (DB75, DB293) ou quatre charges positives s'accumulent sélectivement dans le noyau, suggérant une affinité d'interaction pour l'ADN importante, à l'inverse des composés ne possédant qu'une seule charge positive (DB607) dont l'accumulation est nettement diminuée (**Fig. 67. A et B**). Pour certains composés, une localisation mitochondriale est décrite (**Lansiaux et al., 2002a**). Des dérivés additionnels, diphényles furanes substitués en position N du groupement amidine, ont été étudiés pour leur localisation cellulaire en lien avec leur cytotoxicité sur des modèles de cellules tumorales. Seul le composé N-diphényle-substitué (DB569), dont la cytotoxicité et l'affinité d'interaction pour des séquences AT riches sont inférieures au DB75, diffère de la localisation nucléaire classique et se situe au niveau de la mitochondrie (**Fig. 67. C-E**) (**Lansiaux et al., 2002b**).



**Figure 67:** A. Structure du mono- (DB607) et di-cation (DB75). B. Distribution cellulaire dans les cellules de mélanomes B16 en présence de 2μM de composé DB75 ou DB607 (D'après Lansiaux et al., 2002a). C. Structure du composé DB75 et du dérivé DB569 N-diphényle substitué. D. Constante d'affinité d'interaction (K) des composés DB (sur l'hairpin contenant la séquence 5'-A<sub>3</sub>T<sub>3</sub>) en fonction des valeurs de cytotoxicité (IC<sub>50</sub>) des composés DB sur les cellules de mélanomes B16. Les composés peuvent être divisés en deux groupes ayant une valeur de K élevée (point carré) ou faible (point rond). E. Distribution cellulaire des composés DB75 et DB569 au sein de cellules de carcinomes de colon HT29 traitées avec 2μM de composés observées en microscopie confocale (D'après Lansiaux et al., 2002b).

Non seulement, l'accumulation des composés DB est observée au sein du kinétoplaste mais elle est aussi décrite dans les cellules humaines tumorales à l'exemple du DB75. Selon la structure des composés et leur affinité pour l'ADN, ils peuvent se localiser dans le noyau ou le cytoplasme.

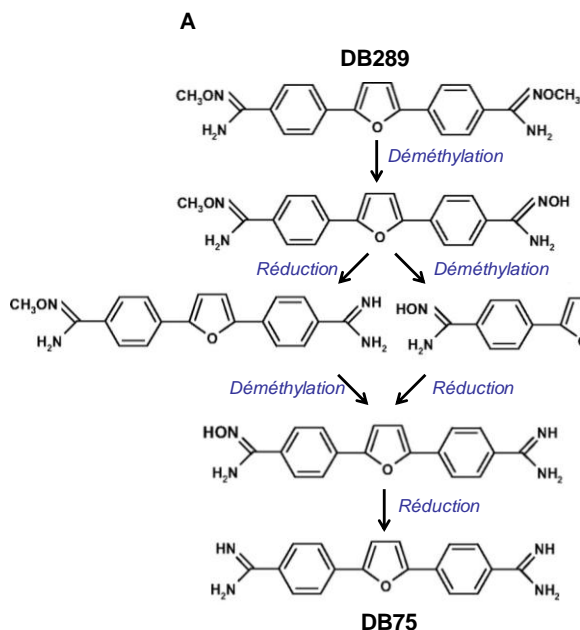
## 6. Développement clinique en tant que molécules antiparasitaires :

Les deux composés qui ont fait l'objet d'études plus avancées *in vivo* sont le furamidine (DB75), chef de file des diamidines, et le DB820, aza-analogue du furamidine. Toutefois, comme la plupart des diamidines aromatiques, le DB75 est hydrophile et présente une faible biodisponibilité par voie orale en raison de ses groupements amidines chargés positivement qui réduisent son absorption intestinale. Pour contourner ce problème, l'administration par voie intraveineuse a été utilisée et des prodrogues du DB75 et du DB820 ont été synthétisées.

### a. DB289 : pro-drogue du DB75

Le composé DB289 (pafuramidine maléate) diffère structurellement du DB75 par l'ajout de groupements méthoxy. Les fonctions amidines cationiques sont masquées jusqu'à la conversion du DB289 en métabolite actif (DB75) au niveau du foie après absorption intestinale et réaction de déméthylation suivie d'une réduction (**Fig. 68. A**). *In vitro*, le DB289 est mille fois moins actif envers les trypanosomes que le DB75 mais la tendance est inversée *in vivo* avec l'administration orale du DB289 capable de traverser l'épithélium intestinal, d'être métabolisé par le foie pour aboutir à une concentration sanguine en DB75 suffisante pour la mort du parasite (**Ansedo et al., 2004 ; Zhou et al., 2002**).

*In vitro*, ce composé est aussi actif chez le *T. brucei rhodesiense*, le *Plasmodium falciparum* que le *Giardia lamblia* (**Fig. 68. B**) (**Soeiro et al., 2005**). Administré par voie intraveineuse, il est aussi efficace sur des modèles de rats immunodéprimés infectés par *Pneumocystis carinii* (**Boykin et al., 1998**). C'est ainsi que le DB75 et le DB289, en comparaison à la pentamidine, furent évalués pour leurs propriétés antiparasitaires sur trois modèles murins mimant le premier stade de la trypanosomiase humaine. Le premier a montré une activité antiparasitaire supérieure à la pentamidine aux mêmes doses d'administration intraveineuse, en particulier pour les souris infectées avec les parasites *T. brucei brucei* et *T. brucei rhodesiense*. A l'identique, la survie est nettement augmentée pour ces trois modèles en présence du DB289 administré oralement et cela conjointement à une réduction de la toxicité par rapport à la pentamidine (**Thuita et al., 2008**). Dernièrement, ces données furent confirmées sur des singes vervets, dont l'infection avec *T. brucei rhodesiense* mime le premier stade de la trypanosomiase : le DB289 est oralement actif et réussit à guérir complètement l'ensemble des singes (**Mdachi et al., 2009**).



**Figure 68: A. Biotransformation du DB289 en DB75 chez le rat et le singe (D'après Midgley et al., 2007). B. Comparaison des activités antiparasitaires *in vitro* du furamide chez différents parasites. (\*) Les valeurs sont variables selon la souche et le mode de culture. L'IC<sub>50</sub> correspond à la concentration nécessaire en composé pour obtenir 50% de la mort du parasite relativement à la population contrôlée non traitée (D'après Soeiro et al., 2005).**

**B**

Organism	IC <sub>50</sub> (DB75)
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	4.5 nM
<i>Trypanosoma cruzi</i>	23.3 µM ~ 8 µM
<i>Plasmodium falciparum</i>	15.5 nM
<i>Leishmania donovani</i>	2.8 µM
<i>Giardia lamblia</i>	0.2 µM
<i>Trichomonas vaginalis</i>	8.1 – 57.9 µM*
<i>Candida albicans</i>	6.25 µg/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	12.5 µg/ml

Ces données ont donc permis l'entrée du DB289 en étude de phase clinique I, II et III en tant que premier composé dédié au traitement des trypanosomiasis humaines africaines de premier stade. Environ 300 patients ont ainsi pu être traités montrant l'efficacité antiparasitaire de la molécule. Avant de passer à la mise sur le marché, la FDA a demandé une étude test supplémentaire sur des patients malades qui a abouti à l'arrêt de la phase clinique. Celle-ci incluait l'administration sur une période de 14 jours de 100mg de DB289 et comme attendu de légères et réversibles altérations du foie ont été mises en évidence mais 6% des patients présentaient des insuffisances rénales et l'un a nécessité une dialyse. Revenant aux études précédentes il semblerait que le choix des modèles animaux pourrait expliquer ces effets secondaires passés inaperçus jusqu'ici où que l'état avancé de la pathologie chez les patients de cette phase I serait corrélé à une différence de métabolisme du composé qui aurait engendré la toxicité. La faible prise en charge de ces toxicités peut aussi être une de ces causes (Harrill et al., 2012).

b. DB820 : pro-drogue du DB844

Dans les stades tardifs de l'infection parasitaire atteignant le SNC, les molécules doivent passer la barrière hématoencéphalique (BHE). Or ni le DB75 injecté par voie intraveineuse, ni sa prodrogue administrée par voie orale ne traversent la BHE (Sturk et al., 2004). Par contre, un des analogues du DB75, l'azafuramide DB820 (ajout d'un azote sur un cycle phényl) est tout aussi actif et a l'avantage de traverser la BHE. Sa prodrogue, le DB844, est aussi oralement très active (Fig. 69) (Ansedè et al., 2005). Le DB844 administré oralement à une dose de 100mg/kg pendant 5 jours consécutifs induit la survie de l'ensemble des souris GVR35 CNS, modèle de souris mimant le second

stade de la trypanosomiase après infection parasitaire (Wenzler et al., 2009). Il induit aussi la survie de souris STIB900 infectées, modèles de souris mimant le premier stade de la trypanosomiase (Wenzler et al., 2009). Malgré la confirmation de son efficacité dans d'autres modèles animaux tel le singe vervet infecté (modèle de second stade de trypanosomiase humaine) où son administration orale conduit à des taux de guérison supérieurs à 43%, son développement fut stoppé en raison d'une fenêtre thérapeutique trop restreinte en terme de dose d'administration (Thuita et al., 2012).

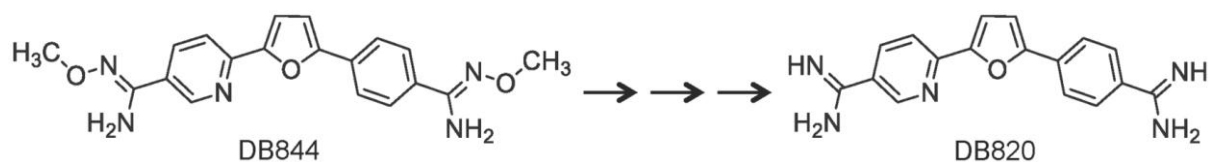


Figure 69: Structures chimiques du DB820 et de sa prodrogue le DB844 (D'après Thuita et al., 2012).

*De part ces informations, le design de molécule ciblant l'ADN doit trouver un équilibre entre sa capacité de pénétration au sein de la cellule, sa structure mimant la courbure du petit sillon de l'ADN, son affinité d'interaction et sa sélectivité de séquence pour espérer obtenir de nouveaux composés aussi efficaces que la furamidine mais exempt de toxicités.*

*Disposant de ces outils moléculaires et étant donné leurs caractéristiques en tant que ligand du petit sillon de la double hélice d'ADN, nous avons alors envisagé une inhibition de l'interaction à l'ADN de facteurs de transcription clés dans le processus de cancérogenèse à l'instar du concept des polyamines.*

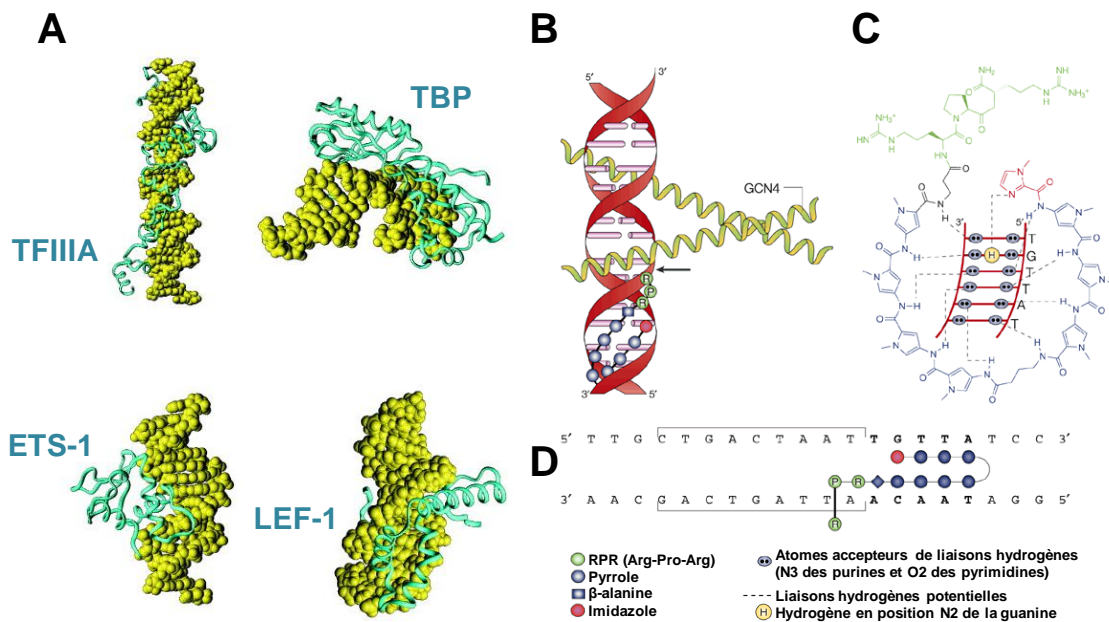
## F. Modulation de l'expression des gènes :

Développés initialement comme composés à visée antiparasitaire, l'étude des dérivés DB s'est focalisée sur leur potentiel effet cytotoxique sans pour autant mettre en avant un mécanisme clair d'inhibition de protéines clés qui serait capables d'induire une modulation de l'expression de gènes responsables de la mort du parasite. Les seules données transcriptionnelles sont majoritairement apportées par la famille des polyamines, similaires aux diamidines.

### 1. Polyamines et modulation transcriptionnelle

Les polyamines ont fait preuve *in vitro* et *in cellulo* d'une interaction à l'ADN capable d'induire une modulation transcriptionnelle. Ce concept a été initié par l'inhibition spécifique de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription TFIIIA (*Transcription Factor III A*), une protéine dont l'interaction

du domaine à doigt de zinc à l'ADN se fait à la fois au niveau du petit et du grand sillon. Bien que la reconnaissance des polyamines soit exclusive au petit sillon de l'ADN cette interaction suffit à inhiber l'interaction du facteur de transcription à l'ADN. Cette interférence réduit la transcription par l'ARN polymérase III, dans des cellules rénales d'amphibiens *Xenopus laevis* (Gottesfeld et al., 1997 ; Neely et al., 1997). De manière similaire, ces composés peuvent moduler la transcription initiée par la reconnaissance au sein du petit sillon de la TBP (*TATA-box binding protein*), sous unité du facteur de transcription TFIIB (McBryant et al., 1999).



**Figure 70: A. Exemples de complexes [facteurs de transcription /ADN] dont l'interaction à l'ADN est modulée par des polyamines.** TFIIIA est un facteur à domaine en doigt de zinc. TBP interagit avec le petit sillon de l'ADN. ETS-1 interagit via un motif WHTH (winged-helix-turn-helix). LEF-1 se lie à l'ADN via un motif « HMG-box » (D'après Dervan et al., 2003). **B. Modèle d'inhibition de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription GCN4, ciblant l'ADN avec son domaine bZIP (basic leucine zipper domain), par une RPR-polyamide (Arginine-Proline-Arginine-polyamide).** Les hélices  $\alpha$  (jaune) du dimère protéique interagissent avec deux grands sillons adjacents de la double hélice d'ADN. La flèche noire indique le site d'interaction où la queue tripeptidique du polyamine déstabilise la reconnaissance du facteur GCN4. **C. Schématisation des liaisons hydrogènes qui s'établissent lors de la reconnaissance du polyamide avec la séquence 5'-TGTTAT du petit sillon de l'ADN.** **D. Modèle d'interaction du polyamide sur sa séquence cible adjacente au site reconnu par le facteur de transcription GCN4 (entre crochets) (D'après Bremer et al., 1998).**

Ce concept met en avant l'inhibition de facteurs de transcription à visée thérapeutique. Tel est le cas de la diminution de la réplication du virus HIV-1 par des polyamines qui ciblent les séquences adjacentes à la TATA-box, ou les sites d'interaction à l'ADN des facteurs de transcription LEF-1 (*lymphoid-enhancer binding factor-1*) et ETS-1, au sein du promoteur HIV-1 (Dickinson et al., 1998). Ces expérimentations ont par ailleurs montré l'inhibition possible de la réplication virale dans des cellules humaines ciblant plusieurs régulateurs transcriptionnels dont les sites d'interaction sont adjacents à la TATA box. Enfin, d'autres exemples confirment la faisabilité de ce concept comme la diminution de l'expression du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) induit par l'interaction du



facteur HIF (*hypoxia inductible factor*) sur la séquence HRE (*hypoxia response element*) en état d'hypoxie (**Fig. 70**) (**Dervan et al., 2005 ; Olenyuk et al., 2004**). Cette modulation constitue une alternative aux inhibiteurs de VEGF, dont l'expression élevée est souvent associée à la progression tumorale.

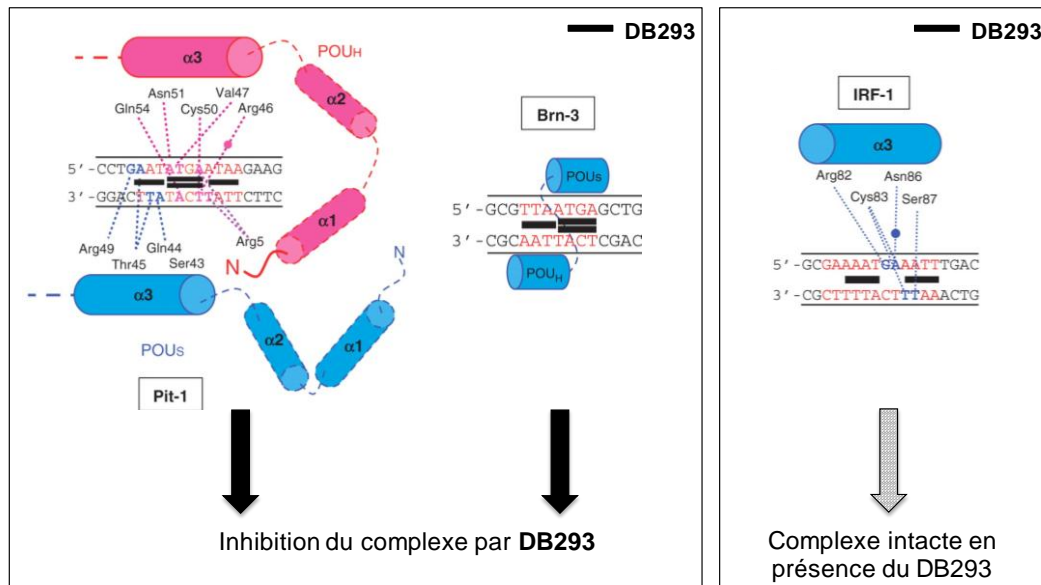
Ces composés ne sont pas uniques pour l'inhibition de l'interaction à l'ADN de facteurs de transcription et côtoient d'autres familles de dérivés comme des lactames carboxamides identifiés comme des inhibiteurs du complexe [HOXA13/ADN] ou de l'halenaquinone, un inhibiteur du complexe [RAD51/ADN], où RAD51 est une protéine impliquée dans la réparation des cassures doubles brins et est souvent associée aux résistances aux chimiothérapies. Cette dernière interférence diffère par une inhibition liée à l'interaction directe du composé avec la protéine et dont le complexe formé empêche sa liaison à l'ADN double brin (**Ng et al., 2007 ; Takaku et al., 2011**).

*A l'instar des polyamines et de petites molécules, les composés DB constitueraient eux aussi de potentiels modulateurs transcriptionnels par inhibition spécifique de complexes [facteur de transcription/ADN]. Appliqué au domaine de la cancérologie, cette inhibition pourrait devenir une thérapie de choix lorsque le contexte moléculaire et mécanistique de la tumeur le permet. En effet, la pertinence de la cible contribue majoritairement à la réussite du développement d'une nouvelle thérapie ciblée.*

## **2. Inhibition *in vitro* de deux facteurs de transcription oncogènes par le DB293**

Les données antérieures ont pu jusqu'à présent corroborer ces hypothèses *in vitro* mais la validation *in cellulo* et *in vivo* sont des parties intégrantes de mes travaux de thèses. Des expérimentations menées en 2008 au laboratoire par Peixoto et al., ont mis en exergue l'activité inhibitrice du DB293 dans l'interaction à l'ADN de deux facteurs de transcription oncogènes ayant en commun le site 5'-ATGA dans leur site de reconnaissance. Sélectionné *in vitro* par l'utilisation de membranes *TranSignal Protein/DNA Array* sur des extraits nucléaires de cellules de carcinome de colon HT29, ce composé inhibe sélectivement l'interaction à l'ADN des facteurs Pit-1 et Brn-3 à travers une interaction en dimère sur la séquence ATGA et en monomère sur les sites adjacents riches en paires de base AT. Toutefois, la présence du même site ATGA n'est pas à lui seul suffisant pour l'inhibition du complexe puisque l'interaction du facteur de transcription IRF-1, reconnaissant lui aussi une séquence 5'-ATGA, n'est en aucun cas inhibée par la présence du composé DB293. Le DB293 n'exposant que des interactions monomères aux séquences riches en paire de bases AT du site consensus d'IRF1 ne réussit pas à inhiber le complexe (**Fig. 71**) (**Peixoto et al., 2008**).

Ainsi, la présence du site de reconnaissance à l'ADN d'un composé ne présume pas d'une inhibition de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription. La modification conformationnelle induite par la fixation du composé contribuerait également à l'inhibition de l'interaction à l'ADN de facteurs de transcription à l'exemple du DB293 dont la dimérisation au sein du petit sillon élargirait ce dernier, déstabilisant la reconnaissance dans le grand sillon adjacent.



**Figure 71: Représentation schématique des sites d'interaction du composé DB293 menant ou non à l'inhibition de la formation des complexes [Pit-1/ADN], [Brn-3/ADN] et [IRF-1/ADN].** Les domaines POU des facteurs Pit-1 et Brn-3 sont au nombre de 2 : POU homéodomaine (POU<sub>H</sub>) et POU domaine spécifique (POU<sub>S</sub>). Les sites consensus de fixation pour chaque facteur sont indiqués en rouge et les contacts qui s'établissent entre les différents acides aminés et les paires de bases de l'ADN sont caractérisées par des traits en pointillés (rose ou bleu pour les interactions directes dans le grand sillon de l'ADN et violet pour les liaisons au sein du petit sillon). Les sites reconnus par le DB293 sont indiqués par des rectangles noirs (D'après Peixoto et al., 2008).

*Cette modulation in vitro réalisée avec des extraits nucléaires de cellules tumorales a mis en avant la faisabilité du concept de l'utilisation des dérivés DB comme molécules inhibitrices de l'interaction à l'ADN de facteurs de transcription oncogènes et ainsi, in fine, espérer moduler l'expression des gènes cibles.*

*C'est donc à travers les données de la littérature, associant ERG et HOXA9 à la cancérogenèse, et aux premiers résultats expérimentaux validant les composés DB comme inhibiteurs potentiels de facteurs de transcription (Peixoto et al., 2008) que l'inhibition de ces deux facteurs de transcription a été abordée dans l'objectif d'un nouveau concept thérapeutique.*

# II. OBJECTIFS

Moduler l'expression de gènes cibles via l'inhibition de facteurs de transcription oncogènes représente un nouvel axe de thérapie ciblée qui s'ajoute à celle des voies de signalisation (tels les inhibiteurs de tyrosine kinases). L'utilisation clinique de l'ATRA qui a révolutionné le traitement des LAP en est l'exemple de référence. L'inhibition thérapeutique d'un facteur de transcription est donc une réalité clinique devenue le fil conducteur de ce projet de thèse. Nous avons alors opté pour l'étude de la modulation de l'interaction à l'ADN de facteurs oncogènes (ce qui diffère du ciblage des interactions protéines/protéines par l'ATRA) via l'utilisation de ligands séquences - spécifiques de l'ADN: les composés DB. Cette étude s'est focalisée sur deux facteurs de transcription: HOXA9 et ERG qui représentent chacun un des objectifs de mon projet de thèse.

➤ **Recherche de nouveaux ligands séquences – spécifiques de l'ADN**

L'un des premiers objectifs auxquels j'ai participé tout au long de ma thèse est la sélection de nouveaux composés capables d'interagir sur d'autres séquences spécifiques de l'ADN, ou, si ce n'est le cas, à déterminer leur mode d'action, par exemple comme intercalant de l'ADN et/ou inhibiteurs des topoisomérases. Cette sélection nous permettra d'obtenir de nouveaux outils moléculaires pour éventuellement moduler l'interaction à l'ADN d'autres facteurs de transcription.

➤ **Modulation de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription ERG**

Notre deuxième objectif cible la spécificité d'inhibition du facteur ERG par le composé DB précédemment sélectionné. L'intérêt étant de déterminer d'une part s'il existe une relation structure-activité dans l'inhibition du complexe et d'autre part de mettre en avant les bases nucléotides essentielles à cette modulation. En parallèle, l'inhibition du complexe ERG/ADN nécessite une validation *in cellulo* de l'inhibition du complexe ERG/ADN qui est entreprise via l'utilisation d'une approche transcriptionnelle associée à un gène rapporteur.

➤ **Modulation de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription HOXA9**

Enfin, le troisième objectif de ces travaux s'intéresse d'une part à la caractérisation de la sélectivité d'action des composés DB et d'autre part à la validation *in cellulo* de ce modèle. En effet certains composés sélectionnés sont capables de cibler le complexe HOXA9/ADN mais quant est-il pour les autres facteurs HOX dont certains sont aussi impliqués dans la leucémogénèse? Des techniques de retard en gel sont utilisées afin de déterminer dans quelle mesure et pour quel complexe l'inhibition est constatée. Cette possible modulation nous renseignerait ainsi sur la spécificité d'inhibition des composés DB qui serait susceptible d'éviter les phénomènes de compensation qui peuvent s'opérer lors de l'inhibition d'un seul facteur.

Bien que ce complexe soit inhibé *in vitro*, plusieurs paramètres cellulaires doivent être étudiés telle la distribution des composés DB actifs ou encore leur cytotoxicité. De même, leur localisation cellulaire implique-t-elle le noyau où se situe leur cible potentielle sur l'ADN? Existe-il une corrélation entre la

cytotoxicité et la surexpression du facteur de transcription HOXA9? La microscopie de fluorescence est alors utilisée pour déterminer la localisation cellulaire de ces composés. Ces derniers ont par ailleurs été évalués pour leur cytotoxicité sur plusieurs lignées cellulaires leucémiques ou non, surexprimant ou non HOXA9 (dont une partie a été déterminée précédemment au laboratoire). Et afin d'affiner cette étude et de se rapprocher au mieux du contexte pathologique, des cellules blastiques humaines issues de patients atteints de LAM ont été évaluées pour leur sensibilité aux composés DB. Comme pour le modèle ERG, la validation cellulaire de notre approche nécessite de connaître le mécanisme d'action qui contribue aux effets cytotoxiques ou non des composés, et en particulier si celui-ci a pour origine l'inhibition de l'interaction à l'ADN du facteur HOXA9. La réponse à cette question est en partie renseignée par une approche transcriptionnelle qui permet après transfection de plasmides exprimant les facteurs HOX et d'un gène rapporteur sous le contrôle de la séquence de fixation du facteur HOX, d'observer l'activité transcriptionnelle en présence ou en absence des dérivés DB.

# **III. RESULTATS & DISCUSSION**

## **1ÈRE PARTIE :**

### **Recherche de nouveaux ligands séquence- spécifiques de l'ADN**

Afin d'enrichir le nombre de molécules à reconnaissance sélective de l'ADN, de nouveaux composés de type DB ou d'autres classes structurales ont fait l'objet d'études moléculaires quant à leur mode d'interaction, leur sélectivité de reconnaissance de l'ADN ainsi que leur mécanisme d'action.

#### **A. Nouveaux composés DB ciblant spécifiquement les séquences 5'-TTAA : l'exemple du DB1003.**

Comme décrit précédemment (paragraphe **I.E.**), les diamidines hétérocycliques à l'exemple de leur chef de file le dérivé di-phényl-furane DB75, présentent une sélectivité pour les séquences riches en paires de bases AT de type 5'-AATT ou 5'-ATAT avec une forte affinité mais interagissent très faiblement avec les séquences inverses 5'-TTAA et 5'-TATA (**Mazur et al., 2000; Liu et al., 2008**). Seuls quelques composés ont une affinité d'interaction supérieure envers des sites contenant des paires de bases GC tel le dérivé phényl-furane-benzimidazole DB293 qui interagit sous forme de dimère coopératif avec la séquence 5'-ATGA contrairement à des sites classiques riches en paires de bases AT (tel 5'-AAAA ou 5'-ATTA) (**Wang et al., 2000**).

Les différentes propriétés physico-structurales entre des sites 5'-AATT ou 5'-ATAT versus 5'-TTAA et 5'-TATA expliquent en partie cette reconnaissance variable, comme la largeur plus importante des petits sillons de l'ADN au niveau des bases successives de type 5'-TTAA et 5'-TATA par rapport aux autres séquences AT-riches qui limiterait les contacts avec les molécules épousant leur petit sillon. Néanmoins, cette interaction est possible pour certains composés comme le dérivé monocation bisbenzimidazole DB183 qui reconnaît le site 5'-TTAA sous forme de dimère coopératif, contrairement à son analogue dicationique le DB185. En termes d'affinité, cette interaction dimérique est certes importante ( $K > 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) mais la reconnaissance monomérique sur des sites de type 5'-AATT demeure plus forte encore ( $K > 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) (**Tanious et al., 2004**). Jusqu'à présent, aucun composé ne présentait de sélectivité d'interaction exclusive à la séquence 5'-TTAA en perdant celle pour la séquence inverse 5'-AATT généralement prioritaire pour l'interaction des diamidines hétérocycliques. C'est donc en collaboration avec les Pr. David Boykin et David Wilson, chimistes de l'Université d'Atlanta, que nous nous sommes intéressés à l'interaction à l'ADN de nouveaux composés DB dérivant du phényl-furane-benzimidazole DB293, dont le groupement benzimidazole amidine permet une reconnaissance en dimère du petit sillon de l'ADN riche en paires de bases AT caractérisée par un petit sillon plus large.

Cette collaboration scientifique est traduite dans cet article par la mise en évidence au laboratoire des sélectivités de séquences des dérivés du DB293 par empreinte à la DNase I, afin de comprendre quelles modifications influent sur ce paramètre.

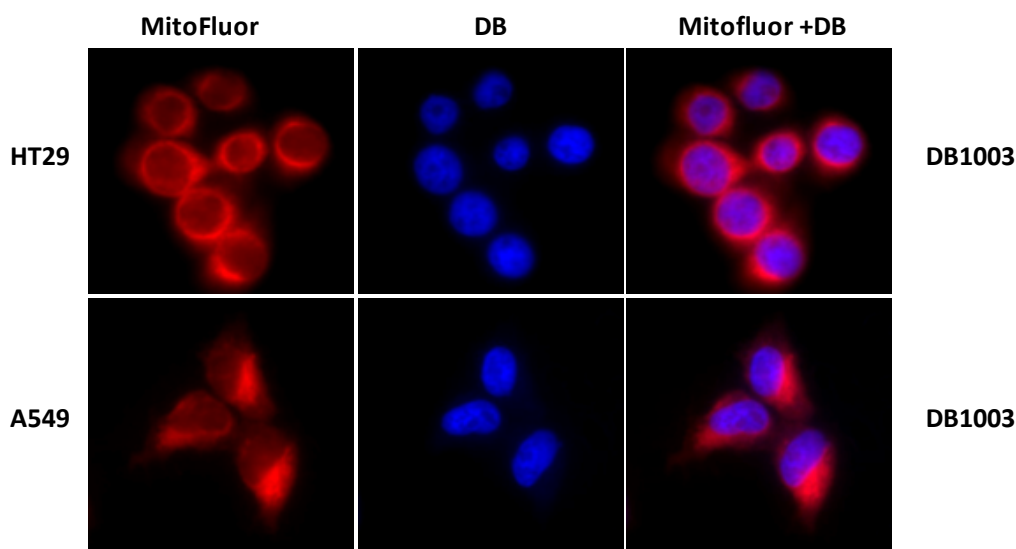


Munde, M., Kumar, A., Nhili, R., Depauw, S., David-Cordonnier, M.-H, Ismail, M.A., Stephens, C.E., Farahat, A.A., Batista-Parra, A., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2010) **DNA minor groove induced dimerization of heterocyclic cations : compound structure, binding affinity, and specificity for a TTAA site.** *J. Mol. Biol.*, **402**, 847-64.

### ***Données Complémentaires: Localisation cellulaire du DB1003***

*In vitro*, l'ensemble de ces données ont ainsi permis de sélectionner un nouveau dérivé de type di-furane-benzimidazole-diamidine capable d'interagir sous forme de dimère et cela de manière séquence spécifique avec des sites riches en paires de base AT de type 5'-TTAA au sein du petit sillon de l'ADN. Ce composé pourrait alors devenir un outil moléculaire dans l'inhibition de facteurs de transcription oncogènes dont leur interaction à l'ADN nécessite la reconnaissance d'une séquence incluant le site 5'-TTAA. Afin d'envisager cette option, ce composé doit être capable de cibler l'ADN au sein même des cellules et donc de pénétrer dans la cellule et de se localiser au noyau. Ceci a été observé par microscopie de fluorescence en profitant de la propriété de fluorescence intrinsèque de ce composé. Des modèles de lignées adhérentes ont été utilisés pour cette expérimentation: la lignée A549 (cellule de cancer du poumon) et la lignée HT29 (cellule d'adénocarcinome du colon).

Les photos obtenues en microscopie de fluorescence sont présentées dans la figure 72 et indiquent la fluorescence d'un marqueur cytoplasmique (MitoFluor: marqueur des mitochondries), la fluorescence intrinsèque du DB1003 et la colocalisation des deux. Ces résultats montrent, d'une part, que le dérivé DB1003 entre dans la cellule et, d'autre part, que celui-ci présente une localisation nucléaire dans chacun des modèles cellulaires utilisés (HT29 ou A549). En effet, la fluorescence du DB1003 n'est pas colocalisée avec celle du marqueur cytoplasmique ce qui suggère une localisation nucléaire.



**Figure 72: Localisation intracellulaire du composé DB1003.** Les cellules HT29 et A549 sont incubées avec 5 $\mu$ M de composé DB1003 pendant 16h et traitées avec un marqueur cytoplasmique (marqueur des mitochondries: MitoFluor). La localisation du dérivé DB1003 est distinguée grâce à sa fluorescence intrinsèque.

## B. DB921: modèle d'interaction médiée par une molécule d'eau

Classiquement, l'interaction de petites molécules avec le petit sillon de la double hélice d'ADN fait intervenir, d'une part, une complémentarité structurale où la courbure du composé est similaire à la concavité du petit sillon de l'ADN et, d'autre part, la possibilité d'établir des liaisons chimiques. L'angle de courbure des dérivés diamidines semblait donc être jusqu'à présent un des critères essentiels pour une reconnaissance optimale du petit sillon, les composés plans étaient alors rarement considérés comme de potentiels ligands du petit sillon de l'ADN.

Néanmoins, cet a priori a été soulevé par le dérivé biphenyl-benzimidazole diamidine DB921, analogue du DB293 qui diffère par une para-substitution du cycle furane en cycle phényl engendrant une diminution de l'angle de courbure et une structure plus plane. Le composé DB921 est ainsi capable d'utiliser une molécule d'eau pour la création d'une liaison directe avec l'ADN lui permettant de compléter sa courbure pour un complexe plus stable dont l'affinité d'interaction pour les sites de type 5'-AATT est bien plus importante que celle décrite pour le dérivé diphenyl-furane DB75 ou son isomère méta-substitué DB911 (Miao et al., 2005; Athri et al., 2009).

Ces données ont mis en avant un nouveau modèle de reconnaissance [petites molécules/petit sillon de l'ADN], dont la compréhension du rôle joué par la molécule d'eau et l'importance de celle-ci dans l'interaction du composé constituent les raisons des expérimentations physicochimiques et moléculaires exposées dans l'article suivant. Identifier quels sont les groupements et les propriétés structurales favorisant une telle interaction nous permettrait d'envisager la sélection de composés qui, via l'intervention de molécules d'eau, s'affranchiraient de cette contrainte structurale et dont l'affinité d'interaction serait augmentée.

Cette collaboration scientifique est traduite dans cet article par la mise en évidence au laboratoire des sélectivités de séquences des dérivés du DB921 par empreinte à la DNase I, afin de comprendre quelles modifications influent sur ce paramètre.

Liu, Y., Kumar, A., **Nhili, R.**, Depauw, S., David-Cordonnier, M.-H., Lee, M.P., Ismail, M.A., Farahat, A.A., Say, M., Chackal-Catoen, S., Batista-Parra, A., Neidle, S., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2011) **Water-mediated binding of agents that target the DNA minor groove.** *JACS.*, **133**, 10171-1018.

### C. Nouveaux ligands de l'ADN et analyse quantitative des relations structure/activité

Outre les dérivés diamidines, je me suis aussi intéressée au cours de ma thèse à déterminer le mode d'action de nouvelles séries de composés de types carboxanilides et quinolones en collaboration avec l'équipe du Pr. Grace Karminski-Zamola de l'Université de Zagreb en Croatie. Non seulement cette collaboration chimistes / biologistes a fait l'objet d'analyses expérimentales des propriétés d'interactions à l'ADN de ces dérivés au sein de notre laboratoire mais elle nous a aussi permis, à travers des échanges de chercheurs entre nos deux laboratoires, d'approfondir les relations structures/activités de ces composés via l'utilisation de la méthode QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*). Cette méthode est un outil de prédiction quantitatif permettant de mettre en évidence de potentielles corrélations entre des activités biologiques et des caractéristiques moléculaires de différentes classes de composés. Cette version utilise notamment le programme VolSurf<sup>TM</sup> capable de transcrire les données des champs d'interaction moléculaire en valeurs numériques associées à des caractéristiques physiques et chimiques. Dans cette étude, la question portait sur la détermination de l'existence ou non d'une corrélation entre les effets cytotoxiques sur diverses lignées tumorales et les propriétés physicochimiques de dérivés benzothiophènes ou thienothiophènes de noyaux carboxanilides ou quinolones. Ce programme reposait sur la mise au point d'un modèle QSAR dont la force prédictive permettrait d'orienter les modifications structurales à appliquer aux composés pour obtenir une activité antitumorale davantage accentuée.

A l'origine, les quinolones constituent une classe d'agents antibactériens dont le mode d'action le plus souvent décrit est l'inhibition directe de la synthèse de l'ADN via leurs interactions aux complexes enzymes/ADN. Ces composés peuvent aussi stabiliser les cassures de l'ADN créées par l'ADN gyrase (enzyme bactérienne capable d'introduire des superenroulements négatifs) et la topoisomérase de type IV (enzyme bactérienne nécessaire à la décaténation des chromosomes filles lors de la réplication). Les complexes ternaires formés (quinones/enzyme/ADN) bloquent la progression de la fourche de réplication et empêche donc la prolifération des bactéries (**Willmott et al., 1994**). Depuis, d'autres fonctions pharmacologiques leurs ont été attribuées telles des fonctions antitumorales et antivirales (**Ahmed et al., 2012**). Les dérivés quinones (tels l'actinomycine D, la doxorubicine, le mitoxanthrone...) présentent des activités antitumorales en lien avec leurs capacités d'intercalation avec la double hélice d'ADN dont certains sont utilisés, à l'heure actuelle, comme inhibiteurs de topoisomérase en clinique (**Bailly, 2000; Pommier et al., 2010**).

Dans la continuité des précédentes recherches structure/activités antitumorales de dérivés quinolones (**Jarak et al., 2005; Jarak et al., 2006; Bertosa et al., 2010**), de nouveaux dérivés hétérocycliques benzothiophènes et thienothiophènes carboxanilides et leurs équivalents « cycliques » quinolones ont été évalués pour leurs propriétés d'interaction à l'ADN et d'inhibiteurs de topoisomérase de type I et II.

Aleksić, M., Bertoša, B., **Nhili, R.**, Uzelac, L., Jarak, I., Depauw, S., David-Cordonnier, M.H., Kralj, M., Tomić, S. and Karminski-Zamola, G. (2012) **Novel substituted benzothiophene and thienothiophene carboxanilides and quinolones: synthesis, photochemical synthesis, DNA-binding properties, antitumor evaluation and 3D-derived QSAR analysis.** *J. Med. Chem.*, **55**, 5044-5060.

D'autres composés additionnels ont fait l'objet d'études moléculaires à la fois au niveau de leurs modes d'interactions à l'ADN mais aussi pour leurs mécanismes d'actions. Les articles qui s'y réfèrent sont présentés en annexes. Ma contribution collaborative s'est principalement focalisée sur la détermination par spectrophotométrie UV et dichroïsme circulaire du mode d'interaction à l'ADN de ces molécules.

Perin N., Kleiner I.M., **Nhili R.**, Laine W., David-Cordonnier M.-H., Vugrek O., Karminski-Zamola G., Kralj M., Hranjec M. **Synthesis, antiproliferative activity and DNA binding studies of novel biologically active benzimidazo[1,2-a]quinolines bearing different amino side chains.** *Soumis à Eur. J. Med. Chem.*

Racané L., Kraljević Pavelić S., **Nhili R.**, Depauw S., Constant C.-P., Ratkaj I., David-Cordonnier M.-H., Pavelić K., Tralić-Kulenović V., Karminski-Zamola G. (2013) **New anticancer active phenylene-bisbenzothiazoles: Synthesis, Antiproliferative Evaluation and DNA binding.** *Eur. J. Med. Chem.*, **63**, 882-891.

Genès C., Lenglet G., Depauw S., **Nhili R.**, Prado S, David-Cordonnier M.-H., Michel S., Tillequin F., Porée F.-H. (2011) **Synthesis and Biological Evaluation of N-substituted benzo[c]phenanthrolines and benzo[c]phenanthrolinones as antiproliferative agents.** *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 2117-2131.

Racane L., Tralić-Kulenović V., Kraljević-Pavelić S, Peixoto P., **Nhili R.**, Depauw S., Hildebrand M.-P., David-Cordonnier M.-H., Pavelić K., Karminski-Zamola G. (2010) **Novel diamidino-substituted derivatives of phenyl-benzothiazolyl- and dibenzothiazolyl-furans and thiophenes: Synthesis, antiproliferative and DNA binding properties.** *J. Med. Chem.*, **53**, 2418-2432.

## D. Conclusions / Perspectives

A travers ces études, la recherche de nouveaux ligands spécifiques de certaines séquences de l'ADN dont les mécanismes d'actions, ont pour certains été déterminés, ont permis d'une part la mise en évidence d'un nouveau site ciblé spécifiquement par un dérivé diamidine et la caractérisation d'un nouveau mode d'interaction médiée par une molécule d'eau au sein de cette même famille de dérivés diamidines. D'autre part elles nous ont donné la possibilité de mettre en avant les relations structures / activités existantes entre le potentiel antitumoral de dérivés carboxinalides et quinolones et leurs modifications structurales.

Malgré les contraintes structurales imposées par la configuration du petit sillon de la double hélice de l'ADN, l'interaction du composé DB1003 se fait de manière séquence-spécifique sous forme de dimère avec le site 5'-TTAA discriminant ainsi avec les séquences classiques riches en paires de bases AT notamment le site inverse 5'-AATT, cible principal des diamidines. Cette reconnaissance suggère une « compensation » de la concavité plus large du site 5'-TTAA par la présence de deux molécules pour une stabilisation du complexe traduisant une interaction plus affine et hautement spécifique du site 5'-TTAA. A travers la détermination de cette reconnaissance, ce composé ouvre la voie vers de nouveaux composés diamidines capables de discriminer entre des sites AT riches au sein du petit sillon de la double hélice de l'ADN et dont la pénétration cellulaire et la localisation nucléaire pourraient en faire un modulateur potentiel de l'interaction à l'ADN de facteurs de transcription oncogènes capables d'interagir avec des sites de type 5'-TTAA.

Non seulement des modifications structurales ont pu affiner davantage la spécificité de séquence de reconnaissance diamidines/petit sillon de l'ADN mais elles ont permis de comprendre les clés moléculaires d'un nouveau type d'interaction diamidines/ADN médiée par une molécule d'eau. En effet, malgré la structure plane du composé DB921, la reconnaissance avec le petit sillon de l'ADN fait intervenir une molécule d'eau capable d'établir un lien direct entre le groupement phénylamidine du composé et l'azote N3 de l'adénine. Lorsque le groupement amidine terminal est basculé en position méta du cycle phényl (dérivé DB1055), la reconnaissance du petit sillon de l'ADN est indépendante d'une liaison directe avec une molécule d'eau mais l'affinité d'interaction reste néanmoins inférieure à celle du DB921 envers des sites riches en paires de base AT de type 5'-AATT. Par contre son isomère DB911, plus courbe par la position méta du groupement benzimidazole amidine et qui ne requière pas de liaison directe avec une molécule d'eau pour optimiser son interaction avec le petit sillon, interagit plus faiblement avec des séquences de type 5'-AATT.

Une interaction optimale se traduit donc par une courbure du composé au plus proche de celle du petit sillon de l'ADN qui peut être une caractéristique structurale du composé ou être apporté par l'environnement chimique de l'ADN de manière directe ou indirecte, alors même que cette macromolécule nécessite des molécules d'eau pour la stabilité de l'hélice double brin. Néanmoins, cette reconnaissance courbe ne suffit pas à stabiliser le complexe et nécessite la présence et



l'orientation correcte de groupements potentiellement accepteurs ou donneurs de liaisons hydrogènes via la stabilisation d'un réseau de molécules d'eau. Tel est le cas du dérivé DB1804 (dérivé du DB921 dont les groupement amidines terminaux sont cycliques) qui est l'une des diamidines les plus affines dans l'interaction de séquences riches en paires de bases AT au sein du petit sillon de la double hélice d'ADN (**Wei et al., 2013**).

Malgré leurs similarités structurales, les dérivés hétérocycliques carboxanilides et leurs équivalents « cycliques » quinolones divergent dans leur mode d'interaction à la double hélice d'ADN. Certains interagissent avec le petit sillon de la double hélice alors que d'autres s'intercalent entre les paires de bases de l'ADN. Toutefois les deux dérivés benzothiophènes et thienothiophènes carboxanilides et quinolones les plus actifs portent des groupements imidazolines témoignant de l'importance de cette structure dans leur activités antitumorales. Par ailleurs, l'activité de ces composés concordent avec les données prédictives du modèle QSAR élaboré suggérant la validation de cet outil pour l'élaboration de nouveaux composés davantage actifs et dont l'étude de leurs mécanismes d'actions cellulaires est essentielle à la compréhension des relations structures / activités de molécules à potentielles antitumorales.

## **2<sup>EME</sup> PARTIE :**

### **Modulation de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription ERG**

Les résultats expérimentaux obtenus avec des membranes TranSignal Protein/DNA Array (**Peixoto et al., 2008**) avaient mis en évidence la modulation de la reconnaissance de protéines à la séquence consensus des facteurs de transcription de la famille ETS par le dérivé DB293. Des données antérieures faisant suite à ces travaux ont permis alors de sélectionner le dérivé di-(phényle-thiophène-amidine) DB1255 pour sa capacité d'inhibition du complexe ERG/ADN, ERG étant un membre de la famille des gènes ETS. Se référant à la littérature, la réactivation de l'expression de ce facteur est impliquée dans certains cancers, justifiant l'intérêt thérapeutique à moduler l'interaction à l'ADN du facteur ERG.

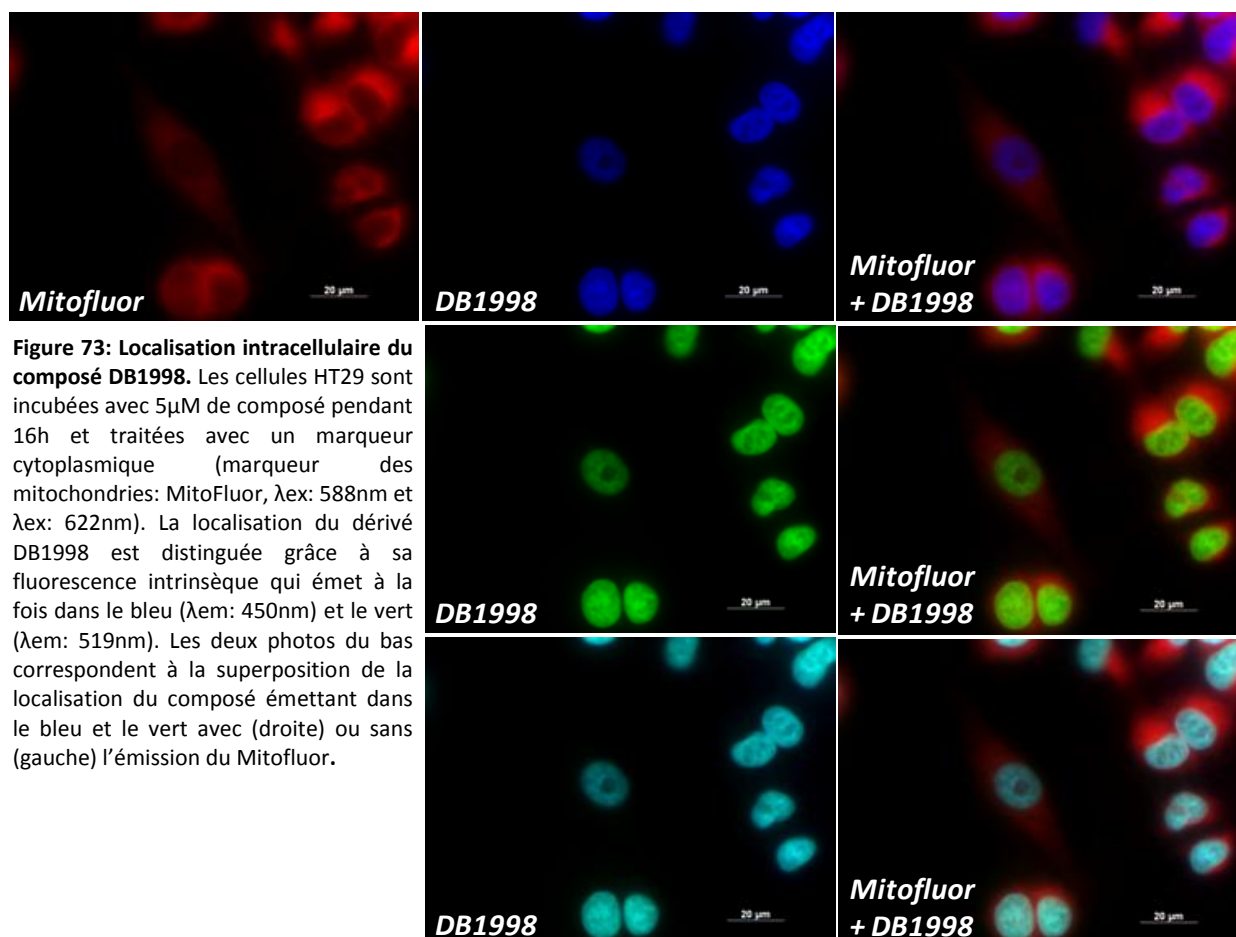
Les expérimentations entreprises et publiées dans l'article qui suit avaient pour but de caractériser au niveau moléculaire comment s'opérait l'inhibition du complexe ERG/ADN par le DB1255. C'est donc en collaboration avec les Pr. D.W. Boykin et W.D. Wilson, que nous nous sommes focalisés sur la spécificité d'inhibition du facteur ERG par le composé DB1255 et une série de dérivés analogues afin de déterminer d'une part s'il existe une relation structure / activité dans l'inhibition du complexe ERG/ADN et d'autre part pour identifier les bases nucléotidiques essentielles à cette modulation. Ces données ont alors été enrichies par une validation cellulaire afin de mettre en évidence l'existence d'une telle modulation à l'échelle de la cellule contrairement aux précédentes données uniquement établies *in vitro*.

**Nhili, R.**, Peixoto, P., Depauw, S., Flajollet, S., Dezitter, X., Munde, M.M., Ismail, M.A., Kumar, A., Farahat, A.A., Stephens, C.E., Duterque-Coquillaud, M., Wilson, W.D., Boykin, D.W. and David-Cordonnier, M.-H. (2013) **Targeting the DNA binding activity of the human ERG transcription factor using a new heterocyclic dithiophene diamidines.** *N. A. R.*, **41**, 125-138.

## Données complémentaires:

### A. Localisation sub-cellulaire du DB1998

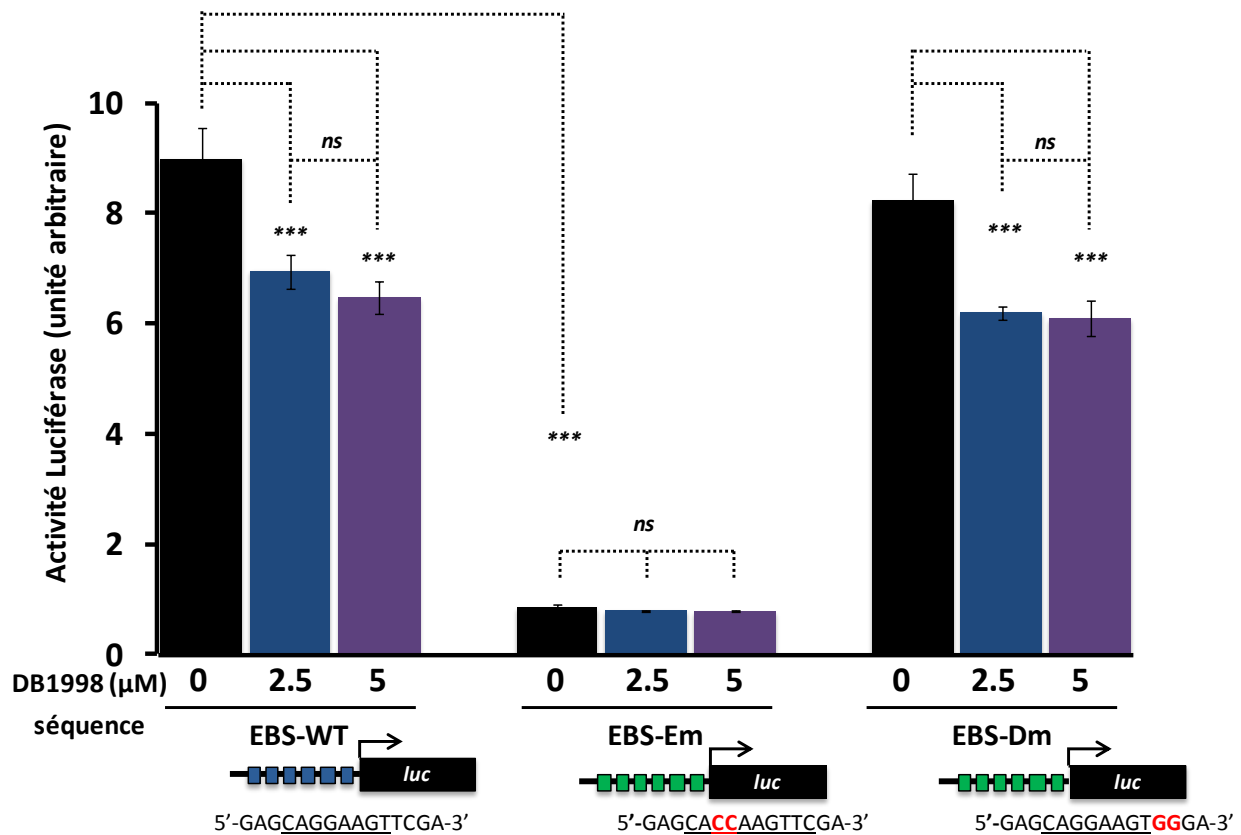
L'un des composés aussi efficace que le DB1255 dans l'inhibition *in vitro* du complexe ERG/ADN a été évalué *in cellulo* pour sa capacité d'inhibition de l'interaction à l'ADN du facteur ERG. Au préalable, sa pénétration et sa localisation cellulaire ont été déterminées par microscopie de fluorescence grâce aux propriétés de fluorescence intrinsèque du dérivé DB1998. L'utilisation d'un modèle cellulaire nécessite de disposer de composés capables de traverser les barrières membranaires de la cellule et dont la localisation intracellulaire coïncide avec l'effet de la cible moléculaire hypothétique ici l'ADN. Ce composé a la particularité d'émettre à la fois dans des longueurs d'ondes d'émission du spectre bleu ( $\lambda_{em}$ : 450nm) et vert ( $\lambda_{em}$ : 519nm) et peut donc être détecté en microscopie sans aucune modification structurale ou biologique.



Ainsi qu'indiqué en **Figure 73**, ce composé présente une localisation nucléaire marquée par l'absence de colocalisation avec le marqueur cytoplasmique MitoFluor, que ce soit en fluorescence du composé, dans le bleu ou dans le vert, ces deux fluorescences étant parfaitement colocalisées (panels du bas).

## B. Inhibition de l'activité transcriptionnelle de ERG par le DB1998

Comme pour le dérivé DB1255, sa capacité d'inhibition du complexe ERG/ADN *in vitro* et sa location nucléaire lui permettrait d'avoir une action *in cellulo* similaire. Nous avons alors évalué la modulation de l'activité transcriptionnelle du facteur ERG par le DB1998. Cette expérimentation a requis l'utilisation du même modèle d'expression d'un gène rapporteur (luciférase) sous le contrôle d'éléments de réponses (EBS-WT: séquences sauvages, EBS-Em: séquences mutées sur le site d'interaction du facteur ERG et EBS-Dm: séquences mutées sur le site d'interaction du composé DB) reconnus ou non par le facteur de transcription ERG.

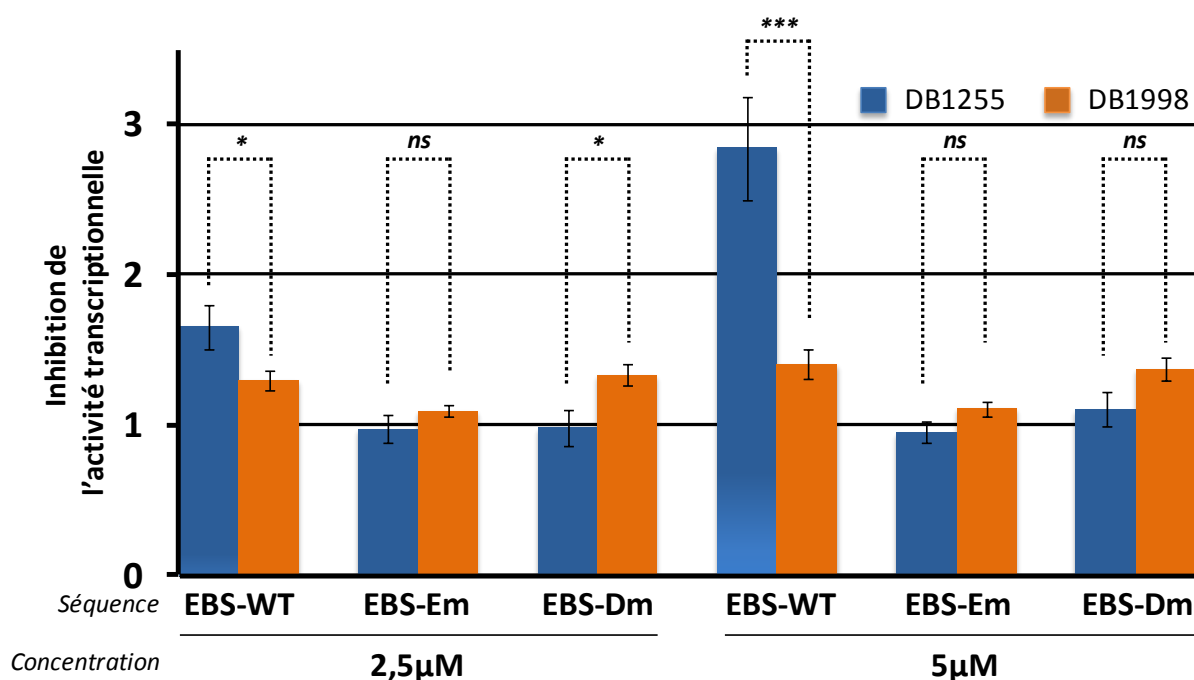


**Figure 74: Inhibition *in cellulo* du complexe ERG/ADN par le DB1998.** Modulation de l'activité transcriptionnelle du complexe ERG/ADN sur l'expression d'un gène rapporteur luciférase sous le contrôle ou non (aucun éléments de réponses: EBS-Pv) d'éléments de réponses répétés 6 fois en tandem (sauvages: EBS-WT ; mutés sur le site d'interaction du facteur: EBS-Em ; mutés sur le site d'interaction du composé DB: EBS-Dm). Les bases mutées sont indiquées en rouge. Les cellules HT29, exprimant le facteur ERG, transfectées avec ces constructions plasmidiques sont incubées 24h avec 2,5 ou 5μM de composé DB1998. L'activité luciférase, exprimée en unité arbitraire, correspond au ratio d'activation de l'expression du gène rapporteur au sein des cellules transfectées par les vecteurs contenant les séquences EBS-WT, EBS-Em ou EBS-Dm relativement aux cellules transfectées avec le vecteur sans éléments de réponses EBS-Pv. Les valeurs obtenues sont issues de la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicate ± l'erreur standard de cette moyenne (s.e.m.). Les données statistiques sont apportées par le test ANOVA. \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  ; ns, non spécifique ( $P > 0,05$ ).

Le ratio d'activation est de 9 en absence du composé lorsque les cellules sont transfectées avec le vecteur contenant les éléments de réponses EBS-WT montrant une activation transcriptionnelle médiée

par la reconnaissance de la séquence EBS-WT (**Fig. 74**). A l'inverse, celle-ci est pratiquement inexistante lorsque la séquence est mutée sur les sites d'interactions du facteur ERG. Par ailleurs, comme évalué en gel retard, les séquences mutées pour l'interaction du composé DB n'influent pas sur la reconnaissance du facteur ERG dont l'activité transcriptionnelle *in cellulo* (8,24) est quasiment identique aux cellules transfectées avec le vecteur contenant les sites EBS-WT. En présence de 2,5µM les activités transcriptionnelles sont réduites d'environ 20-25% dans les échantillons transfectés avec les vecteurs EBS-WT (**Fig. 74**).

Bien que ces résultats montrent que le dérivé DB1998 inhibe *in cellulo* l'interaction à l'ADN du facteur de transcription ERG (**Fig. 75**), le dérivé DB1255 demeure plus efficace. En effet, en présence de la séquence EBS-WT l'activité d'inhibition atteint 1,7 et 1,3 pour 2,5µM de composés DB1255 et DB1998 respectivement. Cet écart se creuse en présence de 5µM de composés où l'activité d'inhibition du DB1255 double quasiment atteignant 2,8 contrairement au DB1998 stagnant à 1,4. Par contre, l'activité transcriptionnelle du gène rapporteur sous le contrôle des séquences EBS-Em est semblable en présence de 2,5µM ou 5µM de DB1255 ou DB1998, ce qui confirme la spécificité d'inhibition du complexe ERG/ADN. A l'inverse des cellules transfectées avec le vecteur contenant les sites EBS-WT, l'activité inhibitrice du dérivé DB1998 prédomine sur celle du DB1255 à 2,5µM alors inexistante en présence des sites EBS-Dm mutés sur le site d'interaction du composé. Ce différentiel entre les deux composés n'est plus significatif à 5µM (**Fig. 75**).



**Figure 75: Comparaison entre les effets inhibiteurs des dérivés DB1255 et DB1998 sur l'activité transcriptionnelle médiée par le facteur ERG *in cellulo*.** Selon la concentration utilisée (2,5µM et 5µM) le ratio correspond aux valeurs d'activités luciférase en absence de composé vis-à-vis de ceux obtenus en présence de 2,5µM ou 5µM de composés DB1255 ou DB1998 selon le vecteur utilisé (contenant les séquences EBS-WT, EBS-Em ou EBS-Dm). Les ratios de 1 correspondent donc à une activité d'inhibition nulle. Les valeurs obtenues sont issues de la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicate  $\pm$  l'erreur standard de cette moyenne (s.e.m.). Les données statistiques sont apportées par le test ANOVA. \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  ; ns, non spécifique ( $P > 0,05$ ).

En conclusion, le dérivé di(-phényl-thiophène-amidine) DB1255 est le composé le plus actif dans l'inhibition du complexe ERG/ADN à la fois *in vitro* et *in cellulo*. Comparé à son analogue le plus proche, le dérivé DB1998, la substitution des deux cycles thiophènes en cycles thiazoles réduit la spécificité d'interaction du composé envers la séquence EBS-WT, qui se traduit par une diminution de l'affinité d'interaction *in vitro* (Nhili et al., 2012 ; Fig. 4 et S7). Ce phénomène se confirme *in cellulo* par nos modèles de transfections transitoires où le DB1998 inhibe plus faiblement l'activité transcriptionnelle médiée par l'interaction du facteur ERG et fait preuve d'une spécificité d'inhibition plus faible constatée par une reconnaissance du site EBS-Dm engendrant une inhibition du complexe ERG/ADN *in cellulo* (Fig. 74 et 75). Et en effet ce site non reconnu par le dérivé DB1255 l'est au contraire avec le composé DB1998 (Nhili et al., 2012 ; Fig. S7).

### C. Cytotoxicités des dérivés dithiophènes

D'autres dérivés dithiophènes hétérocycliques inhibent *in vitro* la formation du complexe ERG/ADN. Etant donné l'implication pathologique du facteur ERG, la toxicité de ces composés dithiophènes a été évaluée sur divers modèles cellulaires exprimant ou non le facteur ERG sauvage ou en protéines de fusions pour déterminer s'il existe ou non une corrélation avec l'expression du facteur de transcription ERG. Mesurées par test de cytotoxicité MTS, les valeurs d'IC<sub>50</sub> (concentration en composé nécessaire pour constater la diminution de 50% de la population cellulaire relativement à la population cellulaire contrôle non traitée) sont présentées dans le **Tableau 2**. De manière générale les dérivés dithiophènes, tel le DB1255, sont davantage cytotoxiques que le composé phényl-furane-benzimidazole DB293 et cela quelque soit le statut d'expression du facteur ERG. Le dérivé DB1247 est relativement moins toxique pour ces mêmes lignées mais reste indépendant de l'expression de ERG. Seul le composé DB1998 présente des IC<sub>50</sub> nettement supérieure pour la majorité des lignées testées toutefois celles-ci ne corrélaient guère avec son activité d'inhibition *in vitro* et la présence ou non du facteur ERG (**Tableau 2**).

Aucune corrélation n'est donc clairement mise en évidence entre la cytotoxicité de ces dérivés diamidines, le statut ERG et l'activité d'inhibition du complexe ERG/ADN déterminées *in vitro*. D'une part le composé DB1255, le plus actif *in vitro* dans l'inhibition du complexe ERG/ADN, est cytotoxique pour l'ensemble des lignées et cela indépendamment du modèle cellulaire (exprimant ou non ERG), en lien (carcinome prostatique ou sarcome d'Ewing) ou non avec la pathologie. D'autre part la même conclusion peut être émise pour les autres dérivés dithiophènes dont la toxicité cellulaire n'est pas spécifique de l'expression du facteur ERG.



		IC <sub>50</sub> (µM)							
		Lignées Cellulaires							
		DB293	DB1255	DB1578	DB1514	DB1357	DB1247	DB1998	
<b>ERG low</b>	Carcinome de Colon	HT29	41,52 ±2,37	5,1 ±2,43	0,6 ±0,09	2,48 ±0,2	1,29 ±1,29	8,77 ±2,75	>50
<b>ERG low</b>	Carcinome Ovarien	HeLa	nd	4,64 ±0,73	nd	nd	nd	nd	>50
<b>ERG low</b>	Prostate	PC3	>50	1,78 ±0,84	1,15 ±0,14	7,06 ±2,72	6,54 ±0,95	16,67 ±7,5	2,91 ±0,1
<b>ERG low</b>	Prostate	LNcaP	43,43 ±8,32	0,56 ±0,22	1,33 ±0,84	3,14 ±0,94	2,82 ±0,34	14,06 ±5,25	>50
<b>ERG low</b>	Prostate	DU145	32,74 ±5,5	22,04 ±24,14	2,26 ±1,25	6,15 ±1,2	4,48 ±0,15	30,47 ±11,86	nd
<b>ERG high</b>	Prostate (TMPRSS2-ERG)	V-CaP	29,74 ±6,11	1,27 ±0,81	nd	nd	nd	nd	10,28 ±6,08
<b>ERG low</b>	Sarcome d'Ewing (EWS-FLI)	SK-ES1	>50	2,18 ±1,85	nd	nd	nd	nd	5,13 ±3,82
<b>ERG low</b>	Sarcome d'Ewing (EWS-FLI1)	MHH-ES1	23,53 ±0,03	4,79 ±1,32	nd	nd	nd	nd	>50
<b>ERG high</b>	Sarcome d'Ewing (EWS-ERG)	CADO-ES1	22,86 ±3,28	2,36 ±0,31	nd	nd	nd	nd	7,67 ±0,47

**Tableau 2: Evaluation de la cytotoxicité des dérivés hétérocycliques dithiophéniques diamidines envers diverses lignées cellulaires ERG low (exprimant faiblement ERG) ou ERG high (exprimant fortement ERG).** L'IC<sub>50</sub> correspond à la concentration pour laquelle 50% de la population cellulaire est vivante relativement à la population totale définie dans les points contrôles non traités. Le statut ERG indiqué fait référence aux données de la littérature pour partie (Mertz et al., 2007) et a été déterminé par western blot pour la lignée HT29. Les valeurs obtenues sont issues de la moyenne de 2 expériences indépendantes ± l'erreur standard de cette moyenne. nd: non déterminée.

## D. Conclusions / Perspectives

L'ensemble de ces données montrent la faisabilité d'une modulation *in vitro* du complexe ERG/ADN et son application *in cellulo*. Les plus actifs dans l'inhibition du complexe ERG/ADN et les plus affins le sont également dans un modèle cellulaire. Il est donc possible d'inhiber l'interaction à l'ADN d'un facteur de transcription oncogène à l'aide de ligands de l'ADN qui interagissent de manière séquence spécifique au sein du petit sillon de la double hélice et qui présentent une localisation nucléaire. La particularité de ce modèle réside dans l'inhibition d'un complexe [facteur de transcription/ADN] via des dérivés hétérocycliques dithiophènes diamidines dont la reconnaissance n'est pas stricte au site reconnu par le facteur ERG mais chevauche ce site du côté 3'. Néanmoins celle-ci suffit à déstabiliser l'interaction du facteur ERG à sa séquence cible et in fine à réduire son activité transcriptionnelle *in cellulo*. Décortiquer cette inhibition et la sélectivité de reconnaissance à l'ADN du composé le plus actif contribue au développement de ligands ciblant des sites plus riches en guanines, qui jusqu'ici sont très peu ciblés. En effet, le site consensus de fixation à l'ADN des facteurs de transcription de la famille ETS inclus des guanines (site minimal GGA(A/T)) et ces données montrent que l'un de leur facteur peut être ciblé spécifiquement par des ligands du petit sillon de l'ADN, jusqu'à présent majoritairement étudié pour leur spécificité d'interaction envers les séquences riches en paires de bases AT.

Toutefois leur cytotoxicité semble être en partie indépendante de l'expression du facteur ERG. D'une part cela suggère l'existence d'un autre mécanisme d'action des composés DB, dont l'interaction ou non à l'ADN est en lien avec l'effet cytotoxique observé notamment pour les lignées n'exprimant pas ERG mais aussi pour les composés inactifs *in vitro* mais toxiques dans nos modèles cellulaires.

La modulation structurale de ces composés à partir des données de relation structures activités récemment décrites nous permettra d'orienter, en collaboration avec les chimistes, la synthèse et la sélection de nouveaux composés aussi spécifique dans l'inhibition de l'interaction à l'ADN du facteur ERG mais davantage toléré.

D'autre part, cela pourrait tenir à l'inhibition, par les composés, d'autres facteurs de transcription ciblant cette même séquence consensus ainsi décrite pour ERG tel FLI-1, membre de la famille des gènes ETS et dont l'homologie de séquence est la plus proche. Comme pour ERG, son interaction à l'ADN est optimisée avec les séquences consensus déterminées par nos expérimentations (**Nhili et al., 2012 ; Fig. 5**). En effet, la modification de l'adénine ou de la guanine en position -2 par une cytosine (*EBSm(-2)C*) ou en position -4 par une adénine (*EBSm(-4)A*) respectivement permet l'interaction du facteur de transcription FLI-1 alors que cette reconnaissance n'est guère observée en présence de la séquence sauvage (*EBS-WT*) (**Fig. 76. A**). Non seulement cette interaction est optimisée mais d'autres complexes sont décrits avec les protéines de fusion EWS-ERG, EWS-FLI1 et des facteurs ETV1, ETS1 et PEA3, complexes néanmoins plus faibles pour les trois derniers facteurs (**Fig. 76. A**).

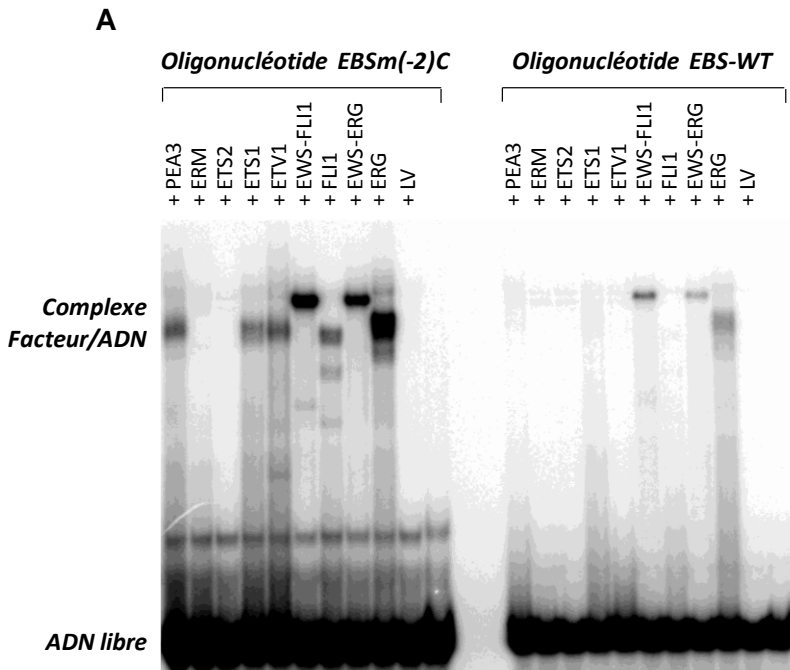
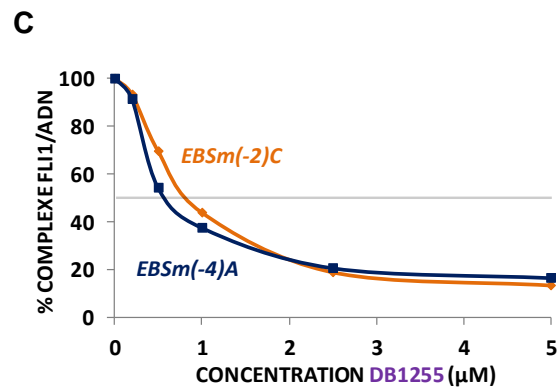
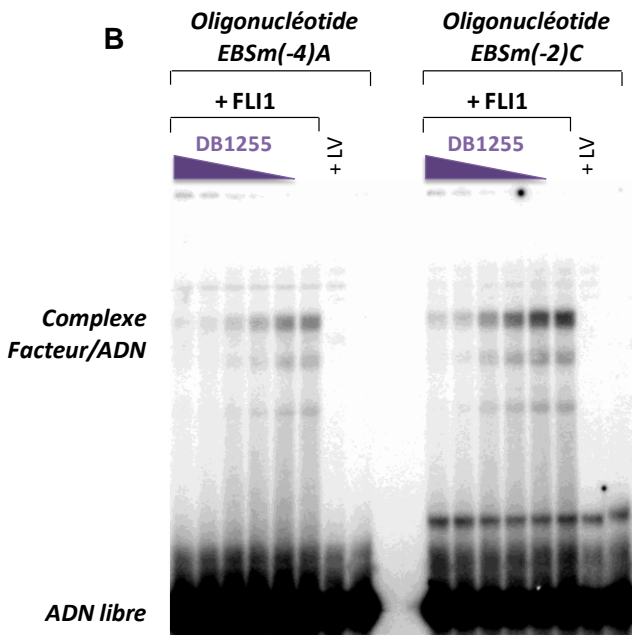


Figure 76: A. Activité de liaison à l'ADN de protéines ERG, FLI1, ETV1, ETS1, ETS2, ERM, PEA3 et des protéines de fusion EWS-ERG et EWS-FLI1 envers les oligonucléotides *EBS-WT* et *EBSm(-2)C*. Le retard en gel est réalisé en présence de protéines exprimées en lysat de réticulocytes des oligonucléotides radiomarqués. LV (Lysat Vide) correspond à un contrôle négatif sans protéines. B. Modulation de l'interaction à l'ADN (oligonucléotide *EBSm(-2)C* ou *EBSm(-4)A*) du facteur de transcription FLI1 par le dérivé DB1255. C. Quantification de l'inhibition de l'activité de liaison à l'ADN du facteur FLI1 par le DB1255.



Caractériser le niveau d'expression du facteur de transcription ERG, des autres facteurs de la famille ETS ainsi que l'implication et la dépendance de son expression vis-à-vis du phénotype cancéreux dans l'ensemble des modèles évalués nous permettrait de répondre à ces questions. Par ailleurs il serait essentiel de s'intéresser à la validation de l'inhibition de ce facteur sur des modèles de promoteurs de gènes cibles décrit comme régulés *in vivo* par ERG. En effet, déterminer par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) si ces composés sont capables de réguler de manière directe ou indirecte l'expression de gènes cibles accentuerait la compréhension du mécanisme d'action. Couplés à des analyses d'expression du transcriptome (puces à ADN) de modèles cancéreux exprimant ERG traités ou non avec les composés, ces expérimentations nous permettront de comprendre quels sont les gènes modulés par ERG et si cette modulation peut être inhibée directement ou indirectement par ces ligands de l'ADN contribuant ou non à la mort ou au retour à l'état normal des cellules cancéreuses. Jusqu'à présent, le modèle prostatique prédomine en littérature dans l'étude des fonctions du facteur ERG où les recherches expérimentales (par ChIP-seq ou d'étude de promoteurs isolés) ont mis en exergue de nombreux gènes cibles. Le modèle leucémique devrait être aussi étudié. Non seulement le facteur ERG est ici ciblé en tant que facteur seul mais ses protéines de fusion qui conservent son domaine d'interaction à l'ADN sont autant de cibles potentielles telles TMPRSS2-ERG, TLS/FUS-ERG ou EWS-ERG. A ces cibles s'ajoutent FLI-1 et ses protéines de fusions telle EWS-FLI-1 qui à l'instar du facteur ERG pourrait être modulée par le composé DB1255 puisque d'une part cette fusion conserve le domaine ETS d'interaction à l'ADN du facteur FLI-1 et d'autre part l'inhibition de l'activité de liaison à l'ADN de ce dernier par le composé DB1255 a été révélé *in vitro* (**Fig. 76. B. et C.**).

## **3<sup>EME</sup> PARTIE :**

### **Modulation de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription HOXA9**

## A. Données antérieurs laboratoire

Ces travaux ont débuté avec la sélection *in vitro* des composés DB818, DB1055 et DB1177 pour leur capacité d'inhibition du complexe HOXA9/ADN contrairement au DB828 (utilisé alors tout au long de l'étude comme contrôle négatif). Ces composés diffèrent à la fois par des substitutions hétérocycliques de type benzimidazole (DB818 et DB1055), benzoxazole (DB828) ou naphthalène (DB1177) mais aussi par leurs cycles centraux thiophène (DB818), furane (DB828) ou phényl (DB1055 et DB1177) (**Fig. 77**)

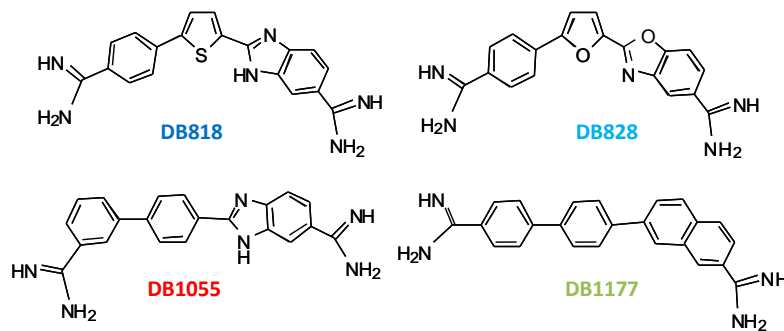


Figure 77: Structure des composés DB818, DB828, DB1055 et DB1177.

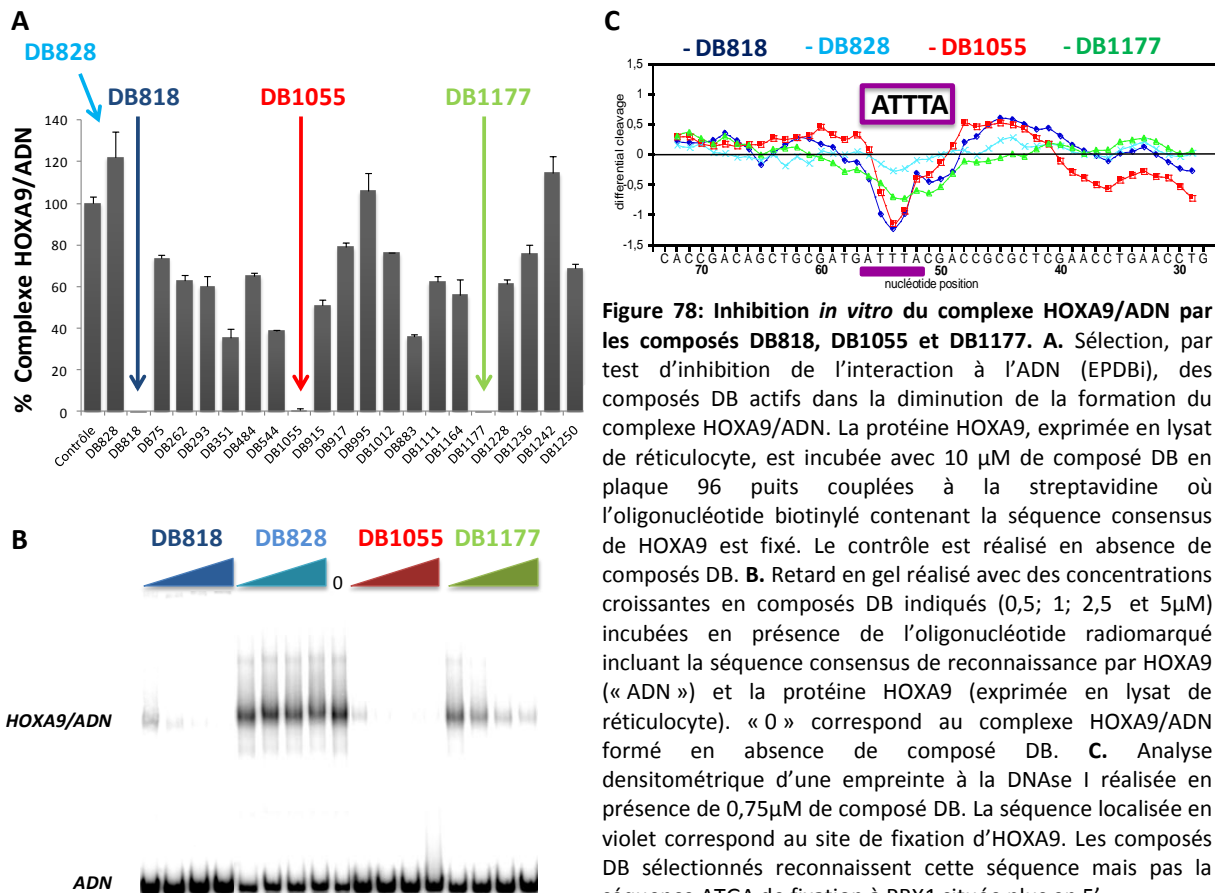


Figure 78: Inhibition *in vitro* du complexe HOXA9/ADN par les composés DB818, DB1055 et DB1177. **A.** Sélection, par test d'inhibition de l'interaction à l'ADN (EPDBi), des composés DB actifs dans la diminution de la formation du complexe HOXA9/ADN. La protéine HOXA9, exprimée en lysat de réticulocyte, est incubée avec 10  $\mu$ M de composé DB en plaque 96 puits couplées à la streptavidine où l'oligonucléotide biotinylé contenant la séquence consensus de HOXA9 est fixé. Le contrôle est réalisé en absence de composés DB. **B.** Retard en gel réalisé avec des concentrations croissantes en composés DB indiqués (0,5; 1; 2,5 et 5 $\mu$ M) incubées en présence de l'oligonucléotide radiomarqué incluant la séquence consensus de reconnaissance par HOXA9 (« ADN ») et la protéine HOXA9 (exprimée en lysat de réticulocyte). « 0 » correspond au complexe HOXA9/ADN formé en absence de composé DB. **C.** Analyse densitométrique d'une empreinte à la DNase I réalisée en présence de 0,75 $\mu$ M de composé DB. La séquence localisée en violet correspond au site de fixation d'HOXA9. Les composés DB sélectionnés reconnaissent cette séquence mais pas la séquence ATGA de fixation à PBX1 située plus en 5'.

Sélectionnés par test EPDBi (*ELISA-derived Protein/DNA Binding Inhibition*) et confirmés par retard en gel, ces composés inhibent spécifiquement l'interaction du facteur HOXA9 à un oligonucléotide contenant sa séquence consensus riche en paires de bases AT (5'-tgATTTAcg). Déterminée par empreinte à la DNaseI, ce site corrèle parfaitement avec les séquences d'ADN ciblées par les composés DB sélectionnés (**Fig. 78**).

En premier lieu nous nous sommes intéressés à la spécificité d'action des composés DB sélectionnés dans l'inhibition du complexe HOXA9/ADN, étant donné la similitude des séquences consensus ciblées par les protéines HOX et l'expression très souvent conjointe, au sein des leucémies, des gènes *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9* et *HOXA10*. Ces premières expérimentations ont pour but de déterminer si les composés DB sélectionnés inhibent uniquement l'interaction à l'ADN de certaines protéines HOX ou s'ils ont un spectre d'action plus large ciblant un très large panel de protéines HOX.

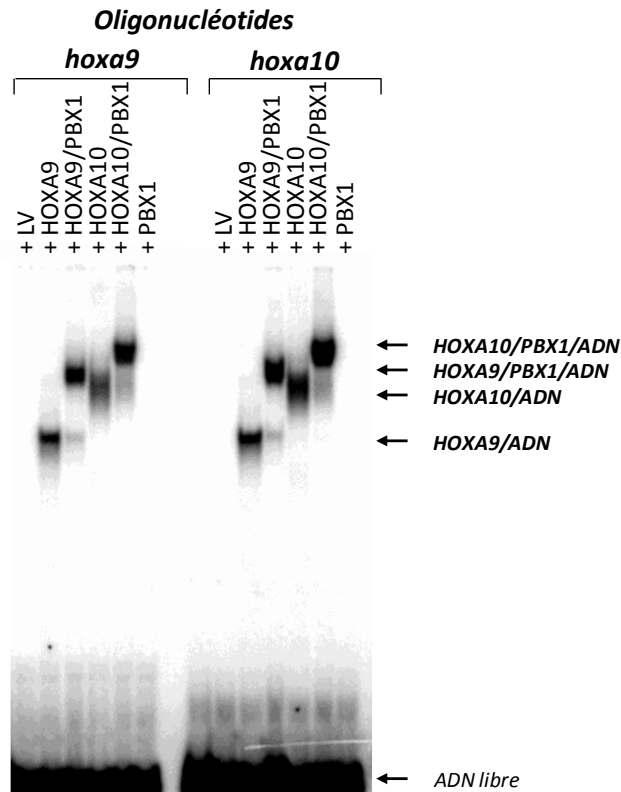
Le spectre d'action des composés DB sélectionnés a donc été évalué sur des sites consensus d'ADN ciblé par les protéines HOX conçu comme tel (sur la base des données de la littérature) et, afin de se rapprocher au mieux de la réalité cellulaire, sur des sites de promoteurs de gènes décrits comme régulés *in vivo* par certains gènes *HOX*.

#### **B. Evaluation de l'inhibition des différentes protéines HOX par les composés DB sélectionnés**

La mise en évidence de l'inhibition des complexes HOX/ADN est réalisée *in vitro* par retard en gel (EMSA) où l'oligonucléotide d'intérêt radiomarqué est incubé avec les protéines HOX, exprimées en lysats de réticulocytes, en présence ou non des composés DB. Le retard de migration en gel signe la formation du complexe HOX/ADN. La reconnaissance et la spécificité d'interaction des protéines HOX aux oligonucléotides nommés *hoxa9* et *hoxa10* ont été examinées au préalable de l'utilisation des composés DB. Ces oligonucléotides contiennent tous deux le site consensus d'interaction du complexe HOX/PBX (souligné) 5'-cgATGATTTA(c/t)g-3' mais diffèrent par la base adjacente en 3' du site (en gras: C pour *hoxa9* et T pour *hoxa10*). Ces modifications se rapprochent au mieux du site décrit en figure **10**.

L'analyse du retard en gel montre un profil d'interaction protéique relativement similaire pour les deux oligonucléotides testés (**Fig. 79**). La présence de complexes protéines/ADN caractérisée par un retard de migration est observée à la fois avec les protéines HOXA9 et HOXA10 vis-à-vis des oligonucléotides *hoxa9* et *hoxa10*. De plus, un retard de migration supplémentaire est obtenu avec l'ajout de protéines PBX1, retard de migration plus important que le monomère seul (HOXA9 ou HOXA10) complexé à l'ADN, montrant la formation d'un complexe tripartite HOX/PBX1/ADN. La protéine PBX1 seule ne lie pas les oligonucléotides. Ainsi, les protéines HOXA9 et HOXA10

reconnaissent à la fois les séquences 5'-cgATGATTTA**c**g et 5'-cgATGATTTA**t**g sous forme de monomère ou sous forme d'hétérodimère avec le cofacteur PBX1 (**Fig. 79**).



**Figure 79: Activité de liaison à l'ADN des monomères HOXA9 et HOXA10 et des hétérodimères HOXA9/PBX1 et HOXA10/PBX1 envers les oligonucléotides *hoxa9*, et *hoxa10*.**

Le retard en gel est réalisé en présence de protéines exprimées en lysats de réticulocytes (HOXA9, HOXA10 et PBX1) et d'oligonucléotides radiomarqués (*hoxa9* et *hoxa10*). LV (Lysat Vide) correspond à un contrôle négatif sans protéines.

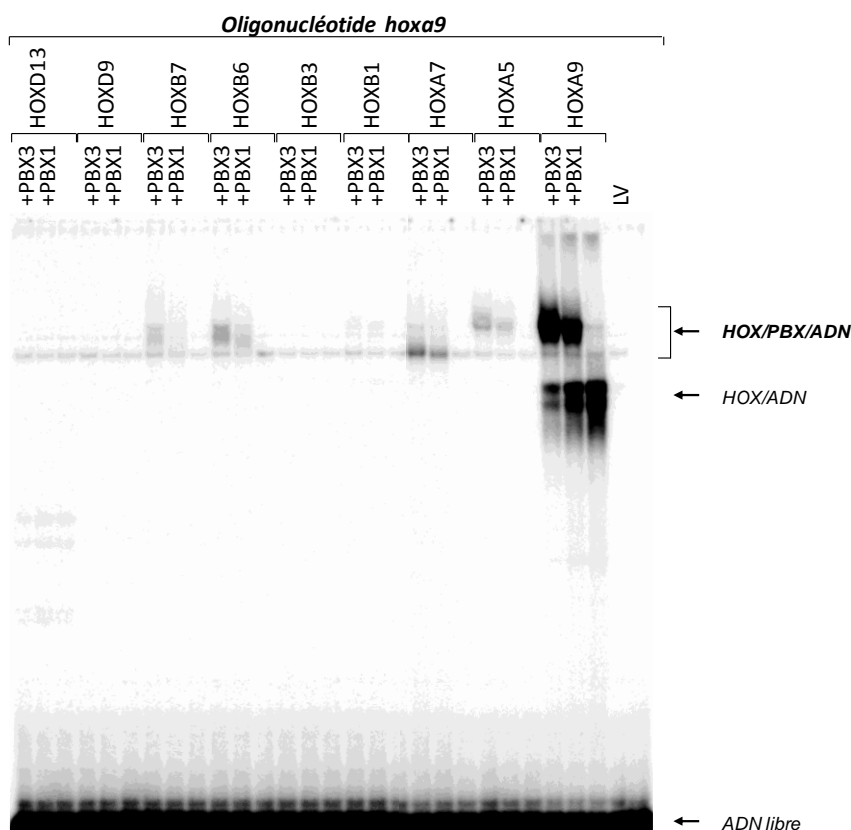
En présence du cofacteur PBX1 l'interaction sous forme d'hétérodimère prédomine traduisant une affinité plus grande de l'hétérodimère pour sa séquence consensus vis-à-vis du monomère seul. En effet le ratio d'incubation est de 1/1 en quantité de lysat (2µL lysat HOXA9/2µL lysat PBX1) et l'expression respective de ces protéines, évaluée au préalable par test d'expression en lysat de réticulocytes via l'incorporation de [<sup>35</sup>S] méthionine, est relativement équivalente. Ainsi ces deux sites ne sont pas exclusifs à l'un des deux facteurs de transcription autant sous forme de monomère que d'hétérodimère.

D'autres facteurs de transcription HOX ont aussi été évalués pour leur reconnaissance du site consensus notamment vis-à-vis du site inclus dans l'oligonucléotide *hoxa9*. Outre l'implication dans la leucémogénèse des protéines HOXA5, HOXA7, HOXA9 et HOXA10, l'utilisation des protéines HOXB1, B3, B6, B7 est justifiée en partie par leur incidence croissante dans les LAM et LAL (**Eklund, 2007**). HOXB6 est exprimé dans approximativement 40% des LAMs exemptes de translocations majeures (telles PML-RARα, AML1-ETO ou CBFβ-MYH11) et sa surexpression *in vivo* dans des modèles murins provoque l'apparition de LAMs dont la latence est drastiquement réduite lorsque le cofacteur MEIS1 est co-surexprimé avec HOXB6 (**Giampaolo et al., 2002** ;



**Fischbach et al., 2005**). La surexpression du facteur HOXB3 touche davantage le développement des lymphocytes B et T qui s'interrompt et induit des désordres myéloprolifératifs (**Björnsson et al., 2003**). HOXB7 est par ailleurs surexprimé dans plus de 40% de patients atteint de MM dont la moelle osseuse au diagnostic est caractérisée par une activité angiogénique (**Storti et al., 2011**). La protéine HOXD13 est quant-à elle décrite dans la translocation t(2;11) qui aboutit à l'expression de la protéine chimère NUP98-HOXD13 et dont la transplantation, chez des souris, de cellules de moelle osseuse cotransfectées par NUP98-HOXD13 et MEIS1 induit l'apparition de LAMs (**Pineault et al., 2003**).

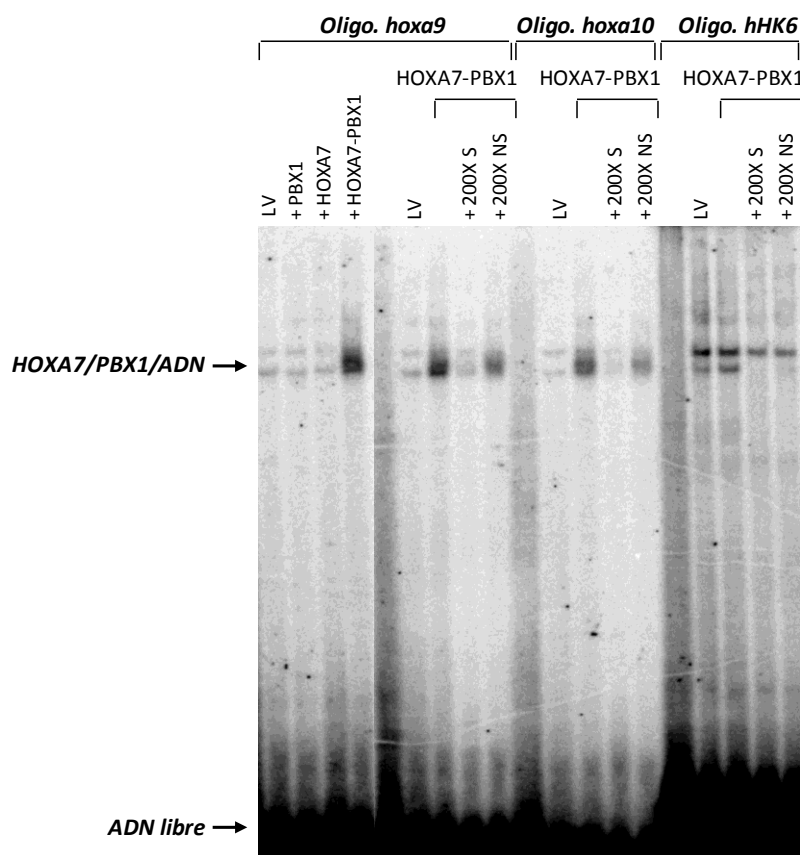
Comme précédemment, HOXA9 interagit sur sa séquence consensus (contenue dans l'oligonucléotide *hoxa9*) à la fois sous forme de monomère ou sous forme d'hétérodimère complexé avec le cofacteur PBX1 ou PBX3 (**Fig. 80**). Dans chaque cas, la reconnaissance de l'hétérodimère HOX/PBX est conjointe à celle du monomère seul mais prédomine à ce dernier notamment pour HOX/PBX3 où l'affinité de ce complexe est beaucoup plus importante envers la séquence consensus. Néanmoins, excepté pour HOXA9, aucune des autres protéines HOX n'interagit seul avec l'oligonucléotide comme le montre l'absence de retard de migration électrophorétique. En tant que monomère ces protéines possèdent donc une faible affinité de séquence pour ce consensus. Mais l'ajout du cofacteur PBX1 ou PBX3 induit l'apparition de retard de migration en présence des protéines HOXA5, HOXA7, HOXB6 et HOXB7 mais pas pour HOXB1, HOXB3, HOXD9 et HOXD13. Le complexe hétérodimérique est plus important avec le cofacteur PBX3 que PBX1 pour l'ensemble des protéines HOX impliquées (**Fig. 80**). Ainsi les hétérodimères HOX/PBX sont plus importants lorsqu'ils impliquent le cofacteur PBX3 plutôt que PBX1. Les protéines HOXB1, HOXB3, HOXD9 et HOXD13 n'interagissent pas avec l'oligonucléotide et cela malgré l'ajout des cofacteurs.



**Figure 80: Activité de liaison à l'ADN de protéines HOX sous forme de monomère ou d'hétérodimère avec les cofacteurs PBX1 et PBX3 envers l'oligonucléotide *hoxa9*.** Le retard en gel est réalisé en présence de protéines exprimées en lysats de réticulocytes (HOXA9, HOXA5, HOXA7, HOXB1, HOXB3, HOXB6, HOXB7, HOXD9, HOXD13, PBX1 et PBX3) et de l'oligonucléotide radiomarqué *hoxa9*. LV (Lysat Vide) correspond à un contrôle négatif sans protéines.

L'absence de complexe HOXD9/PBX(-1 ou -3)/*hoxa9* et HOXD13/PBX(-1 ou -3)/*hoxa9* concorde avec les données de la littérature ayant montré l'absence du motif d'interaction avec le cofacteur PBX1 contrairement aux autres protéines HOX (Phelan et al., 1995).

HOXA7 reconnaît *in vitro* la séquence consensus 5'-cgATGATTTA<sub>cg</sub>-3' uniquement sous forme d'hétérodimère. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le site 5'-cgATGATTTA<sub>tg</sub>-3' (séquence consensus contenue dans l'oligonucléotide *hoxa10*) *a contrario* d'une séquence ne contenant pas le site consensus classique mais dont la richesse en paire de bases AT est supérieure à 60% (oligonucléotide *hHK6* contenant la séquence 5'-ctATTTTATG<sub>aga</sub>-3') (Fig. 81). Cette dernière séquence, validée comme site régulé par HOXC13 (Jave-Suarez et al., 2002), présente le site d'interaction du cofacteur PBX en 3' du site reconnu par les protéines HOX ce qui semblerait être défavorable à une reconnaissance en hétérodimère.

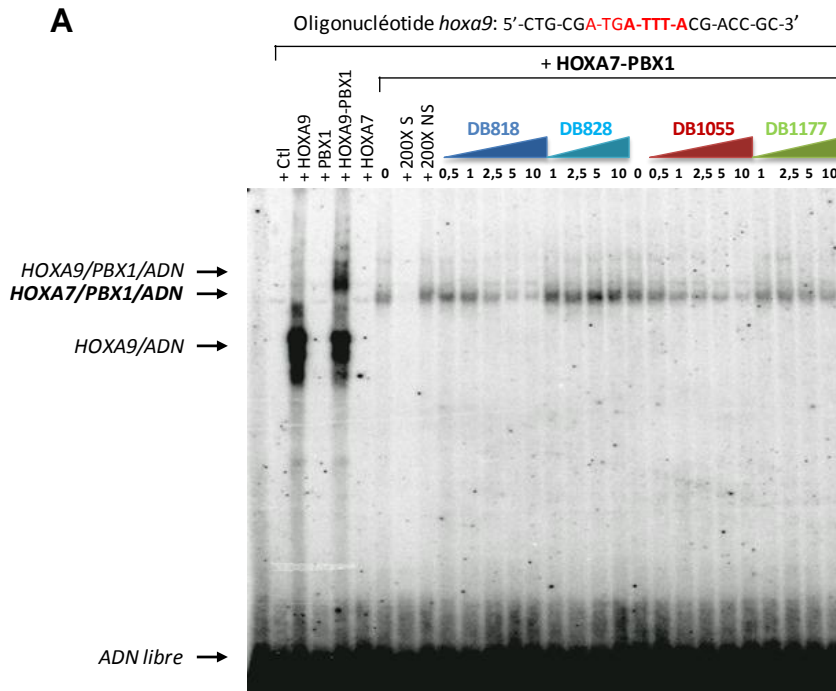


**Figure 81: Activité de liaison à l'ADN de l'hétérodimère HOXA7-PBX1 envers les oligonucléotides *hoxa9*, *hoxa10* ou *hHK6*.** Le retard en gel est réalisé en présence de protéines exprimées en lysats de réticulocytes (HOXA7 et PBX1) et d'oligonucléotides radiomarqués. La spécificité d'interaction est déterminée par l'ajout d'oligonucléotides spécifique (S) ou non spécifique (NS) non radiomarqués à fort ratio relativement à la sonde radiomarquée (200X). Les bandes présentes dans l'échantillon contrôle correspondent à des complexes non-spécifiques. Oligo.: oligonucléotide, LV : Lysat vide.

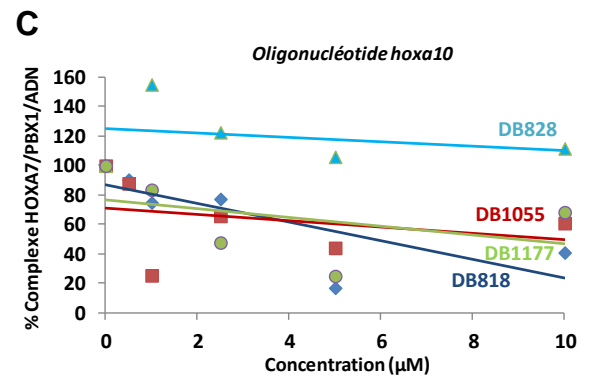
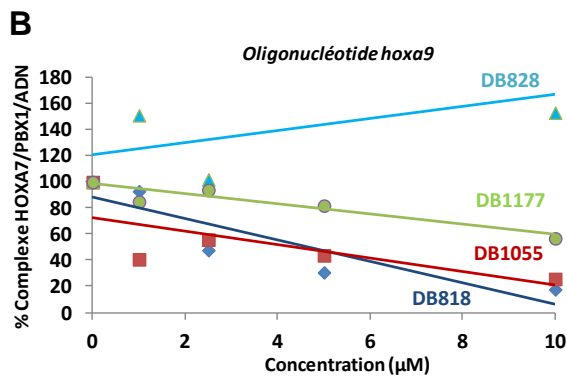
A travers cette interaction, HOXA7, à l'instar d'HOXA10, pourrait donc compenser l'inhibition de l'interaction à l'ADN du facteur HOXA9 dans certains modèles leucémiques. C'est donc dans cette optique que l'inhibition de son activité de liaison à l'ADN a été évaluée avec ces mêmes composés.

Réalisé précédemment au laboratoire, l'inhibition du facteur HOXA10 suit le même profil que celui observé pour le facteur HOXA9 à savoir une inhibition du complexe HOXA10/ADN par les composés DB818, DB1055 et DB1177 à l'inverse du DB828 qui reste inactif. En présence de ces mêmes

composés, et puisque l'activité de liaison est augmentée en présence du cofacteur PBX, nous nous sommes alors intéressés à l'inhibition des complexes HOXA9/PBX1, HOXA5/PBX1, HOXA7/PBX1, HOXB6/PBX1 et HOXB7/PBX1.

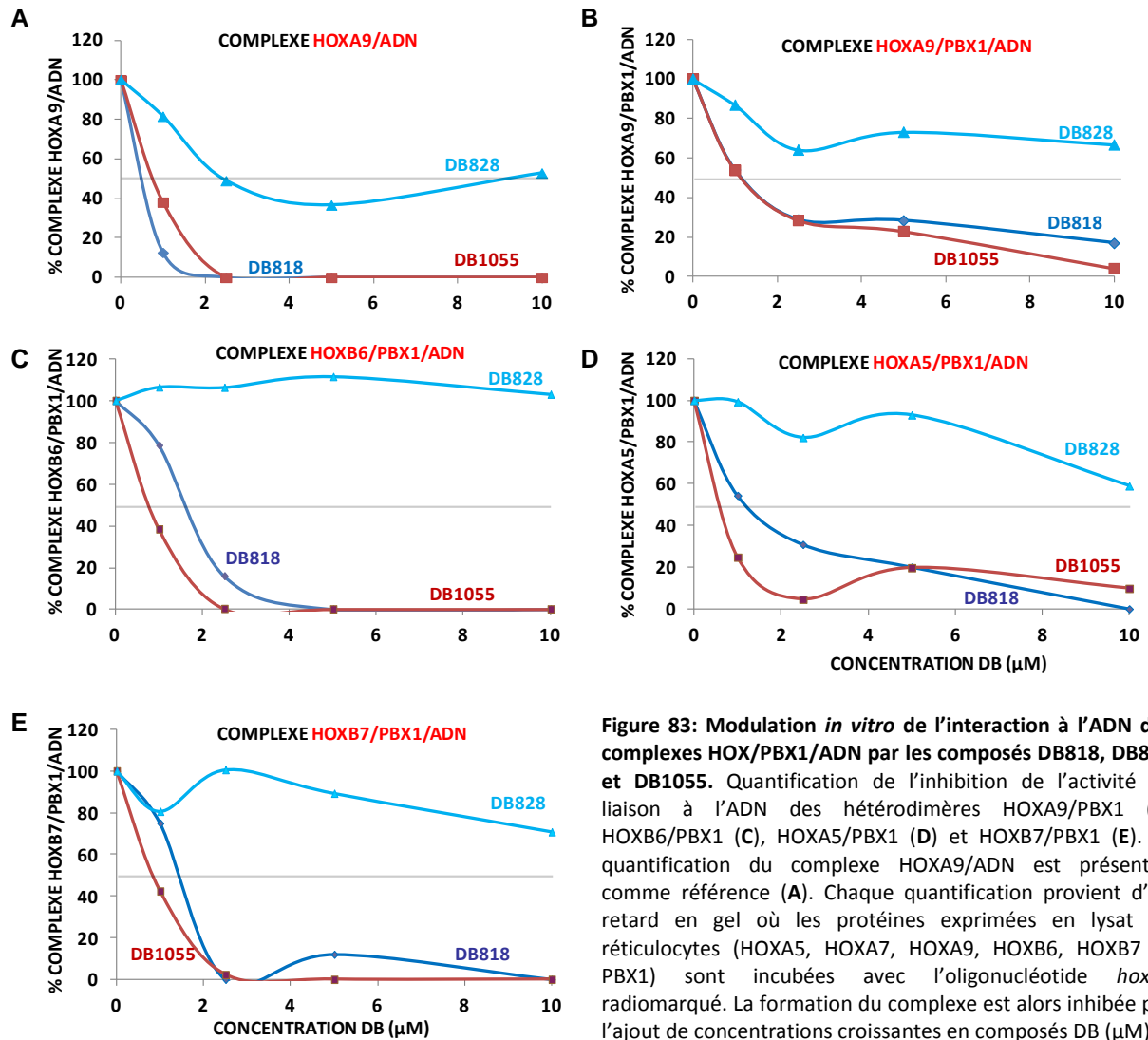


**Figure 82: Inhibition du complexe HOXA7/PBX1/ADN *in vitro* par les composés DB.** **A.** Retard en gel réalisé en présence de protéines exprimées en lysats de réticulocytes (HOXA7, HOXA9 et PBX1) et de l'oligonucléotide *hoxa9* radiomarqué. La formation du complexe est inhibée par l'ajout de concentrations croissantes en composés DB ( $\mu\text{M}$ ). **B.** Quantification de l'inhibition de l'activité de liaison à l'ADN (oligonucléotide *hoxa9*) de l'hétérodimère HOXA7-PBX1 par les composés DB. **C.** Quantification de l'inhibition de l'activité de liaison à l'ADN (oligonucléotide *hoxa10*) de l'hétérodimère HOXA7-PBX1 par les composés DB.



En présence de concentrations croissantes en dérivés DB818, DB1055 et DB1177, la formation du complexe HOXA7/PBX1/*hoxa9* est inhibée (**Fig. 82**). Toutefois cette inhibition varie en fonction des dérivés DB. Les composés DB818 et DB1055 restent les plus actifs dans l'inhibition de l'activité de liaison à l'ADN de l'hétérodimère HOXA7/PBX1 avec plus de 50% d'inhibition en présence de 5 $\mu\text{M}$  de composés contrairement au DB1177 dont l'activité inhibitrice, relativement plus faible, est à peine de 10% pour une même concentration. Le DB828 est quant-à lui inactif quelque soit la concentration évaluée (**Fig. 82**). Ces composés inhibent de manière identique le complexe HOXA7/PBX1/*hoxa10* mis en évidence (**Fig. 82. C**).

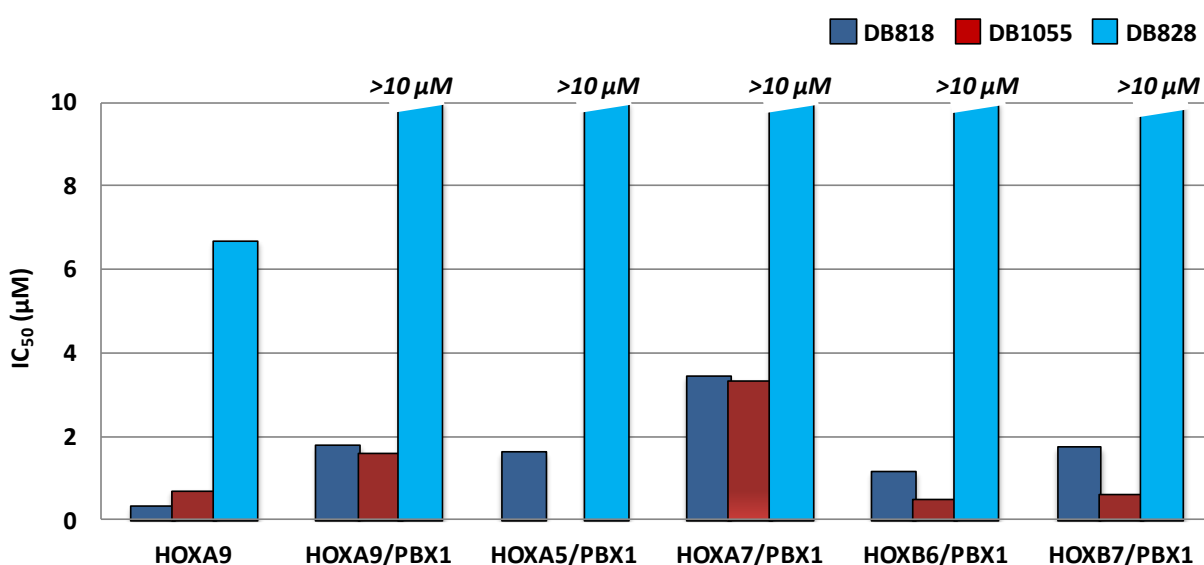
Les autres complexes obtenus ont eux aussi fait l'objet d'une modulation de leur activité de liaison à l'ADN en présence des composés DB818, DB828 et DB1055 (**Fig. 83**). La quantification des retards en gel obtenus montrent de manière générale un profil d'inhibition similaire à celui décrit précédemment pour les complexes HOXA9/*hoxa9* (**Fig. 78. B**), HOXA10/*hoxa9*, HOXA7/PBX1/*hoxa9* et HOXA7/PBX1/*hoxa10* (**Fig. 82. B et C**).



**Figure 83: Modulation *in vitro* de l'interaction à l'ADN des complexes HOX/PBX1/ADN par les composés DB818, DB828 et DB1055.** Quantification de l'inhibition de l'activité de liaison à l'ADN des hétérodimères HOXA9/PBX1 (**B**) HOXB6/PBX1 (**C**), HOXA5/PBX1 (**D**) et HOXB7/PBX1 (**E**). La quantification du complexe HOXA9/ADN est présentée comme référence (**A**). Chaque quantification provient d'un retard en gel où les protéines exprimées en lysat de réticulocytes (HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXB6, HOXB7 et PBX1) sont incubées avec l'oligonucléotide *hoxa9* radiomarqué. La formation du complexe est alors inhibée par l'ajout de concentrations croissantes en composés DB (μM).

De manière générale, les composés DB818 et DB1055 restent les plus actifs dans l'inhibition de l'interaction des hétérodimères HOXA5/PBX1, HOXA9/PBX1, HOXB6/PBX1 et HOXB7/PBX1 à la séquence consensus 5'-cgATGATTTAcg-3' à *contrario* du DB828, relativement plus faible ou inactif selon les complexes (**Fig. 83**). Néanmoins, comme pour le complexe HOXA7/PBX1, cette modulation varie à la fois selon le composé utilisé et le complexe ciblé. Le composé DB818 est le plus efficace dans l'inhibition de l'interaction à l'ADN du monomère HOXA9 où 1 μM de composé suffit à réduire 60% du complexe relativement au contrôle 100% sans composé (**Fig. 84**). Cette même concentration en DB1055 parvient à inhiber plus de 50% de ce complexe ainsi que les complexes

HOXA5/PBX1/*hoxa9*, HOXB6/PBX1/*hoxa9* et HOXB7/PBX1/*hoxa9* contrairement au DB818 qui nécessite plus du double ( $IC_{50}$ : 2,6 ; 2,5 et 2,2 $\mu$ M respectivement). Cette variation entre le DB818 et le DB1055 s'estompe dans l'inhibition des complexes HOXA9/PBX1/*hoxa9* et HOXA7/PBX1/*hoxa9*. La modulation du premier complexe (HOXA9/PBX1/*hoxa9*) par les composés DB818 et DB1055 affiche des  $IC_{50}$  de 3 et 2,6 $\mu$ M respectivement et la modulation du second (HOXA7/PBX1/*hoxa9*) présentent des  $IC_{50}$  de 4,3 et 4,6 $\mu$ M respectivement (**Fig. 84**). Excepté pour le monomère HOXA9 où l' $IC_{50}$  est atteint avec 7 $\mu$ M de composé DB828, l'interaction à l'ADN des hétérodimères HOX/PBX est faiblement impactée par la présence du DB828 qui nécessite des concentrations supérieures à 10 $\mu$ M pour affecter 50% des complexes.



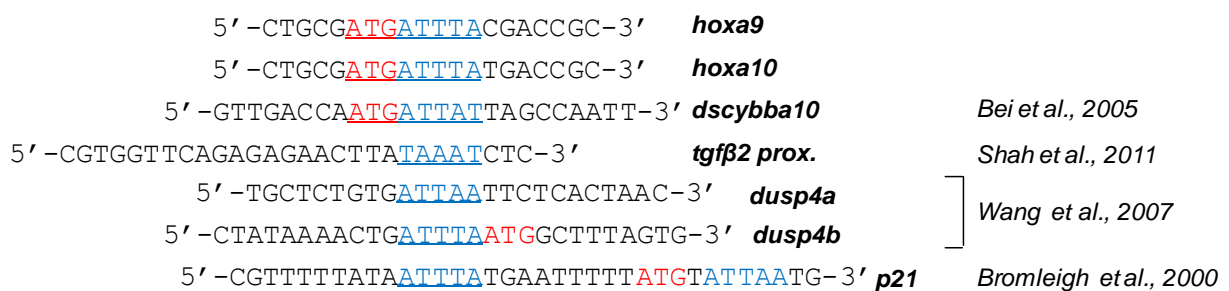
**Figure 84: Activité d'inhibition de liaison à l'ADN des hétérodimères HOX/PBX1 par les composés DB sélectionnés.** L' $IC_{50}$ , exprimée en  $\mu$ M, correspond à la concentration en composé DB pour laquelle 50% du complexe HOXA9/ADN ou HOX/PBX1/ADN est inhibée relativement au contrôle sans composé traduisant 100% du complexe HOX/ADN ou HOX/PBX1/ADN. Ces données proviennent des quantifications de retard en gels présentées dans les figures **82 B** et **83** et dont les valeurs d' $IC_{50}$  dérivent des courbes de tendances exponentielles (où  $IC_{50}(\mu M) = [(ln(50/b))/a]$  dont l'équation de la courbe est sous forme  $y = b e^{ax}$ ). Le terme ADN se rapporte ici à l'oligonucléotide *hoxa9*. Pour le complexe HOXA5/ADN, aucune valeur n'est indiquée en présence du DB1055 puisque celui-ci atteint l' $IC_{50}$  pour des concentrations nettement inférieures à 1 $\mu$ M correspondant à la concentration minimale utilisée lors de l'expérimentation. A l'inverse, excepté pour le complexe HOXA9/ADN, l' $IC_{50}$  du DB828 n'est pas atteint pour les complexes HOX/PBX1 même en présence de 10 $\mu$ M, concentration maximale utilisée.

En conclusion il existe une similarité des profils d'inhibition de l'activité d'interaction à l'ADN des monomères HOX et des hétérodimères HOX/PBX1 évalués. Les composés DB818 et DB1055, dont le site d'interaction recouvre parfaitement le site consensus 5'-ATTTA reconnu par le monomère HOX, (**Fig. 78. C**) sont les plus actifs dans la modulation de l'interaction à l'ADN du monomère mais aussi de l'hétérodimère HOX/PBX1. A contrario, l'absence de reconnaissance de ce site corrèle avec une inactivité dans la modulation de ces complexes comme pour le composé contrôle DB828. Bloquer la reconnaissance du site HOX suffit donc à déstabiliser l'hétérodimère. Bien que l'affinité d'interaction

des protéines HOX est accentuée en présence du cofacteur PBX1 (ainsi que PBX3), la modulation de l'hétérodimère formé est possible en présence des composés DB818 et DB1055 mais se traduit par une augmentation de leurs concentrations notamment pour les complexes HOXA9/PBX1/*hoxa9* et HOXA7/PBX1/*hoxa9* vis-à-vis du monomère seul. Néanmoins, bien que les autres hétérodimères (HOXA5/PBX1; HOXB6/PBX1 et HOXA7/PBX1) nécessitent des doses équivalentes en DB818 pour la modulation de leur interaction à l'ADN et supérieure à celle de l'inhibition du complexe HOXA9/*hoxa9*, le DB1055 conserve pour l'inhibition de ces mêmes complexes (excepté pour HOXA5/PBX1) des concentrations actives semblables à celles nécessaires pour l'inhibition du monomère HOXA9. L'impact de l'interaction apporté par le cofacteur semblerait avoir peu d'incidence sur ses capacités inhibitrices.

### C. Spécificité d'inhibition des composés DB sur des séquences issues de promoteurs régulés *in vivo* par HOXA9

Jusqu'à présent l'inhibition de l'interaction à l'ADN du facteur HOXA9 et des autres facteurs de la famille HOX étudiés l'ont été via l'utilisation d'oligonucléotides contenant la séquence consensus ciblée par la protéine HOXA9 ou HOXA10 ainsi décrites dans la littérature. Pour se rapprocher au mieux des réalités moléculaires *in vivo*, d'autres séquences cibles issus de promoteurs de gènes cibles régulés *in vivo* par HOXA9 ou HOXA10 ont été évaluées (**Fig. 85**).

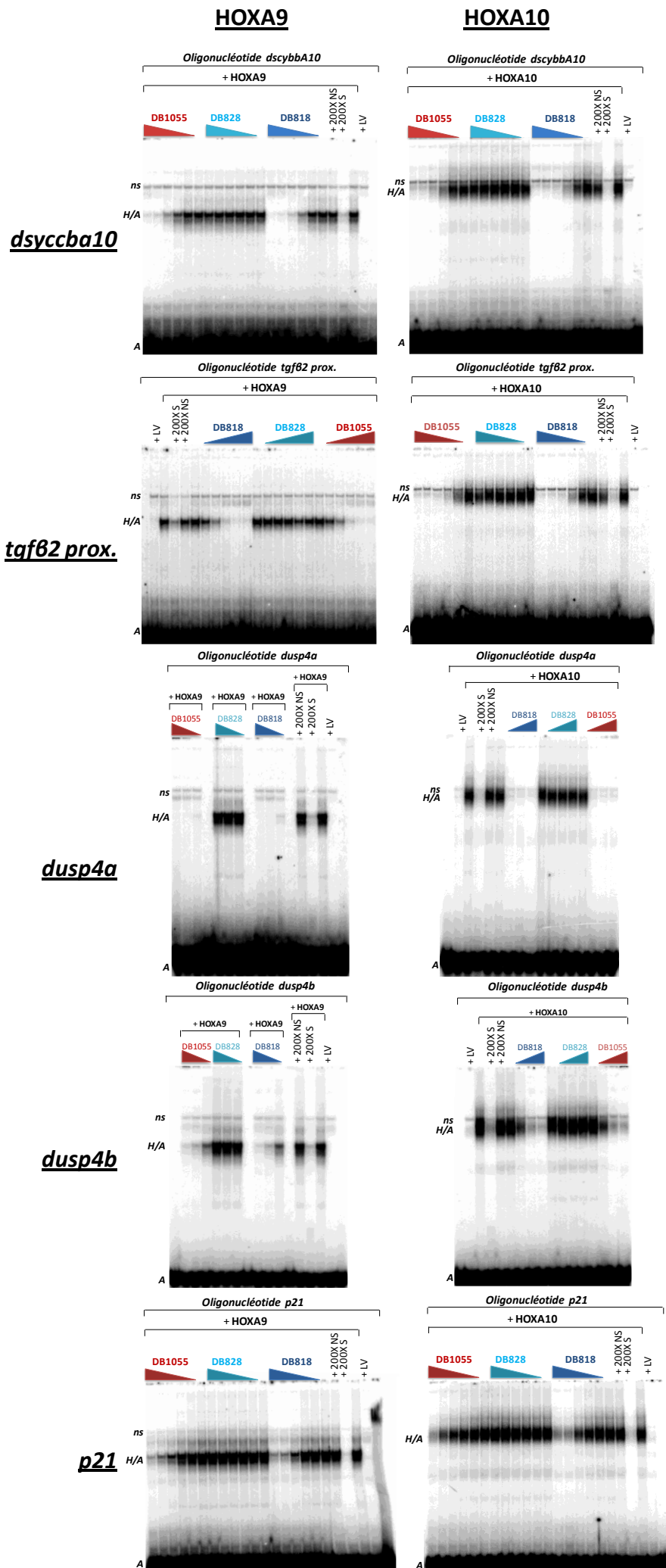


**Figure 85: Séquences nucléotidiques des oligonucléotides contenant les sites d'interaction du facteur HOXA9 ou HOXA10 décrit dans la littérature comme promoteurs de gènes cibles régulés *in vivo* par ces facteurs de transcription.** La séquence soulignée correspond au site reconnu par l'hétérodimère HOX/PBX où PBX interagit avec la séquence ATGA (rouge) et HOX la séquence adjacente (bleu). Les références des articles sont notées près de chaque oligonucléotide. *tgfβ2 prox.*: site *tgfβ2* proximal.

Le gène *CYBB* (*cytochrome b245 beta polypeptide*, dont le site promoteur est nommé *dscybb10*) code pour la protéine GP91<sup>Phox</sup> une composante du système enzymatique multimoléculaire NADPH oxydase des phagocytes. Ce gène est décrit par l'équipe d'Elizabeth A. Eklund comme une cible des deux facteurs de transcription HOXA9 et HOXA10. Dans un modèle le modèle de cellule leucémique myéloïde indifférenciée U937, HOXA10 réprime l'expression du gène *CYBB*. A l'inverse dans ces mêmes cellules différenciées (en présence d'INF $\gamma$ ), HOXA9 active directement l'expression du gène *CYBB* (Eklund et al., 2000 ; Bei et al., 2005). En 2011, ce même groupe décrit le gène *TGF $\beta$ 2* (*transforming growth factor  $\beta$ 2*, dont le site promoteur est nommé *tgfb2 prox.*), comme cible directe de HOXA10 où ce dernier active la transcription du gène *TGF $\beta$ 2* stimulant l'expansion des CSHs et des progéniteurs hématopoïétiques (Shah et al., 2011). A l'inverse, HOXA10 active l'expression du gène *DUSP4* (*dual specific phosphatase 4*, dont deux éléments de reconnaissance du facteur HOXA10 ont été nommés *dusp4a* et *dusp4b*) codant pour la protéine kinase phosphatase MKP2 (*mitogen-activated protein kinase phosphatase 2*). Cette protéine a la capacité d'inhiber indirectement l'apoptose via la déphosphorylation de la protéine JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) devenant inactive (Wang et al., 2007).

Le gène *p21<sup>waf1/cip1</sup>* (dont le site promoteur est noté *p21*) codant pour un inhibiteur de kinase cycline-dépendante est aussi une cible de HOXA10. Celui-ci peut activer l'expression de p21 induisant l'arrêt du cycle cellulaire conduisant à la différenciation de cellules myéloïdes (U937) (Bromleigh et al., 2000).

Ces séquences cibles ont toutes en commun un site riche en paires de bases AT de type 5'-ATT(A/T)A-3' correspondant aux séquences consensus (*hoxa9* et *hoxa10*) reconnues par les facteurs HOXA9 et HOXA10, site également reconnu par les composés DB actifs sélectionnés (Fig. 85). Nous avons donc évalué d'une part par retard en gel la reconnaissance des facteurs de transcription HOXA9 et HOXA10 envers ces séquences promotrices et l'inhibition de la formation de ces complexes avec les dérivés DB actifs (DB818 et DB1055) et le DB contrôle (DB828).



**Figure 86: Inhibition de l'activité de liaison à l'ADN des protéines HOXA9 et HOXA10 envers des promoteurs de gènes décrit *in vivo*.** Les retards en gels ont été réalisés avec des concentrations croissantes en composés DB (0,2; 0,5; 1; 1,5; et 2  $\mu$ M pour les gels avec les oligonucléotides *dscyba10*, *tgfb2 prox* et *p21*; 1; 2,5; et 5  $\mu$ M pour les gels avec les oligonucléotides *dusp4a* et *dusp4b*) incubées en présence de l'oligonucléotide radiomarqué (*dscyba10*, *tgfb2 prox.*, *dusp4a*, *dusp4b* ou *p21*) et la protéine HOXA9 ou HOXA10 (exprimée en lysat de réticulocyte). La spécificité d'interaction est déterminée par l'ajout d'oligonucléotides spécifique (S) ou non spécifique (NS) non radiomarqué à fort ratio relativement à la sonde radiomarquée (200X). LV: lysat vide; ns: complexe non spécifique; H/A: complexe HOX/ADN; A: ADN libre.



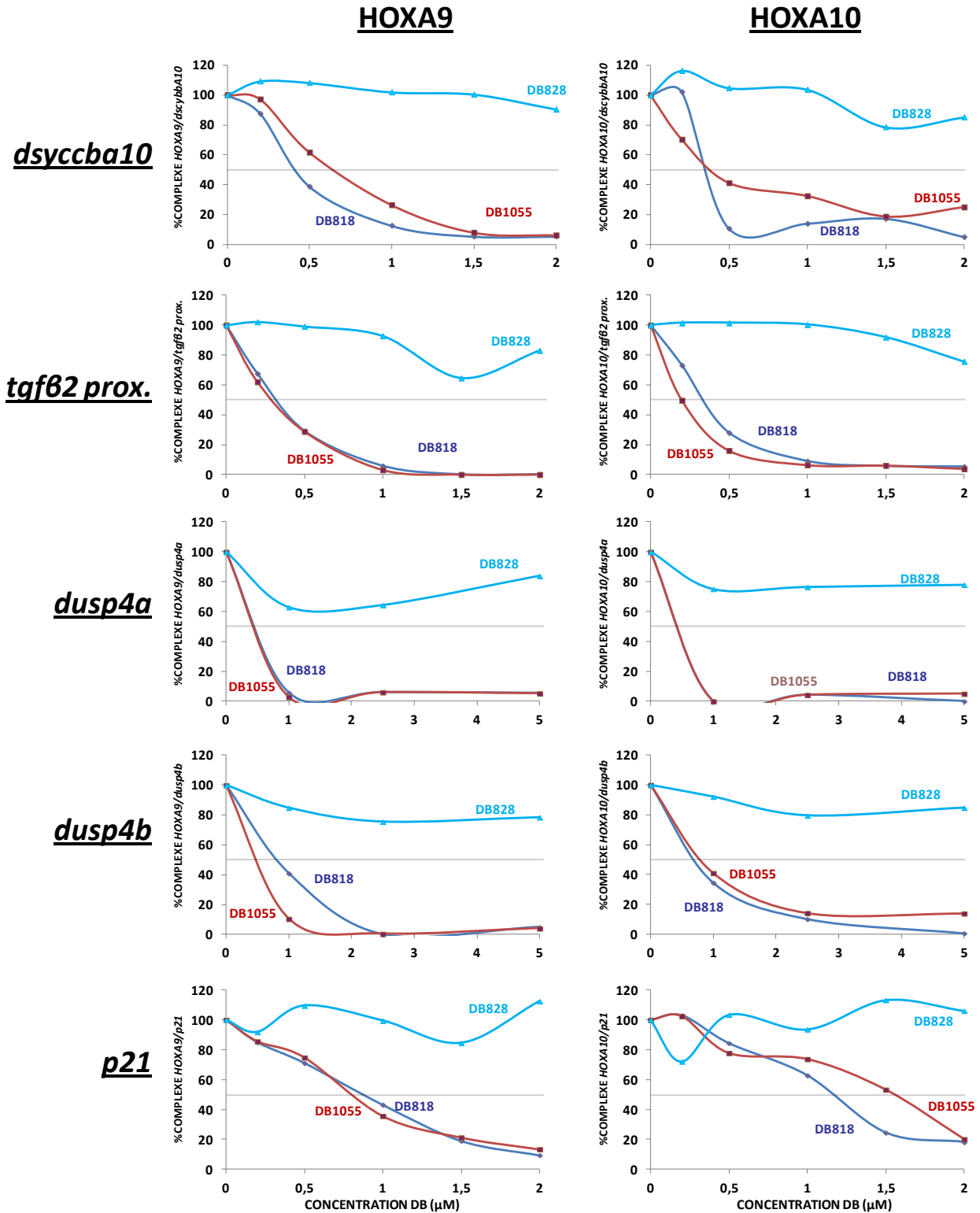
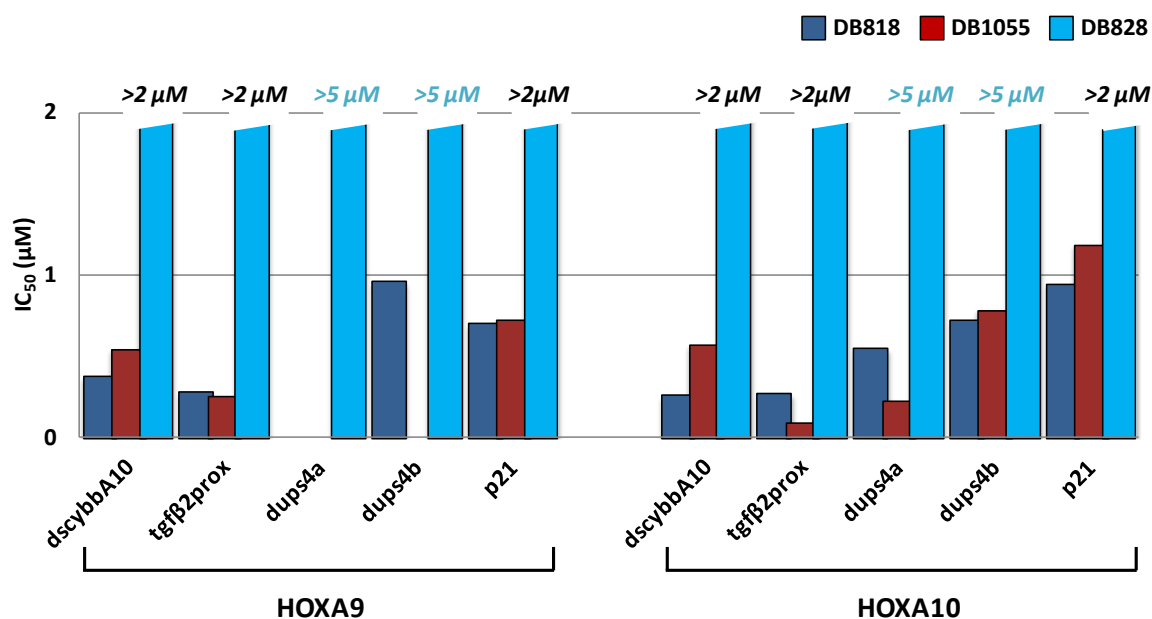


Figure 87: Quantification de la modulation de l'activité de liaison à l'ADN des protéines HOXA9 et HOXA10 envers des promoteurs de gènes cibles décrit *in vivo*. Les quantifications ont été réalisées à partir des retards en gel présentés en figure 86.

Non seulement, l'inhibition des complexes HOX/ADN est constatée mais de plus celle-ci a un profil similaire qualitativement (**Fig. 86**) et quantitativement (**Fig. 87**) aux complexes évalués précédemment où les DB les plus actifs sont les DB818 et DB1055 à l'inverse du DB828 qui reste inactif. En effet pour l'ensemble des complexes formés moins de 1  $\mu\text{M}$  de composé est nécessaire à inhiber 50% ou plus du complexe HOX/ADN contrairement au dérivé DB828 pour lequel l' $\text{IC}_{50}$  n'est jamais atteint même en présence des concentrations maximales utilisées lors de l'expérimentation (2 ou 5  $\mu\text{M}$ ) (**Fig. 88**). Pour certains complexes, tels HOXA9/dusp4a et HOXA9/dusp4b, l' $\text{IC}_{50}$  est atteinte pour des concentrations inférieures à la concentration minimale (0,2  $\mu\text{M}$ ) témoignant d'une activité inhibitrice plus accrue (**Fig. 88**). Par contre, l'efficacité est moindre pour la séquence issue du promoteur p21. En conclusion, d'une part HOXA9 et HOXA10 reconnaissent de manière similaire les séquences promotrices et d'autres part l'inhibition de leur complexes est quasiment identique avec toutefois une légère activité inhibitrice supérieur envers le complexe HOXA9/ADN pour les composés DB818 et DB1055.



**Figure 88: Activité d'inhibition de liaison à l'ADN des complexes HOX/ADN par les composés DB sélectionnés.** L' $\text{IC}_{50}$ , exprimée en  $\mu\text{M}$ , correspond à la concentration en composé DB pour laquelle 50% du complexe HOXA9/ADN ou HOXA10/ADN est inhibée relativement au contrôle sans composé traduisant 100% du complexe HOXA9/ADN ou HOXA10/ADN. Ces données proviennent des quantifications de retard en gels présentées dans la figure 87 et dont les valeurs d' $\text{IC}_{50}$  dérivent des courbes de tendances exponentielles (où  $\text{IC}_{50}(\mu\text{M}) = [(\ln(50/b))/a]$  dont l'équation de la courbe est sous forme  $y = b e^{ax}$ ). Pour le complexe HOXA9/dusp4a et HOXA9/dusp4b, aucune valeur n'est indiquée en présence du DB818 ou du DB1055 puisque ceux-ci atteignent l' $\text{IC}_{50}$  pour des concentrations inférieures à 1  $\mu\text{M}$  correspondant à la concentration minimale utilisée lors de l'expérimentation. A l'inverse, pour l'ensemble des complexes l' $\text{IC}_{50}$  du DB828 n'est pas atteint même en présence des concentrations maximales (2 ou 5  $\mu\text{M}$ ). Le terme ADN se rapporte ici aux oligonucléotides *dscybbA10*, *tgf $\beta$ 2prox*, *dusp4a*, *dusp4b* et *p21*.

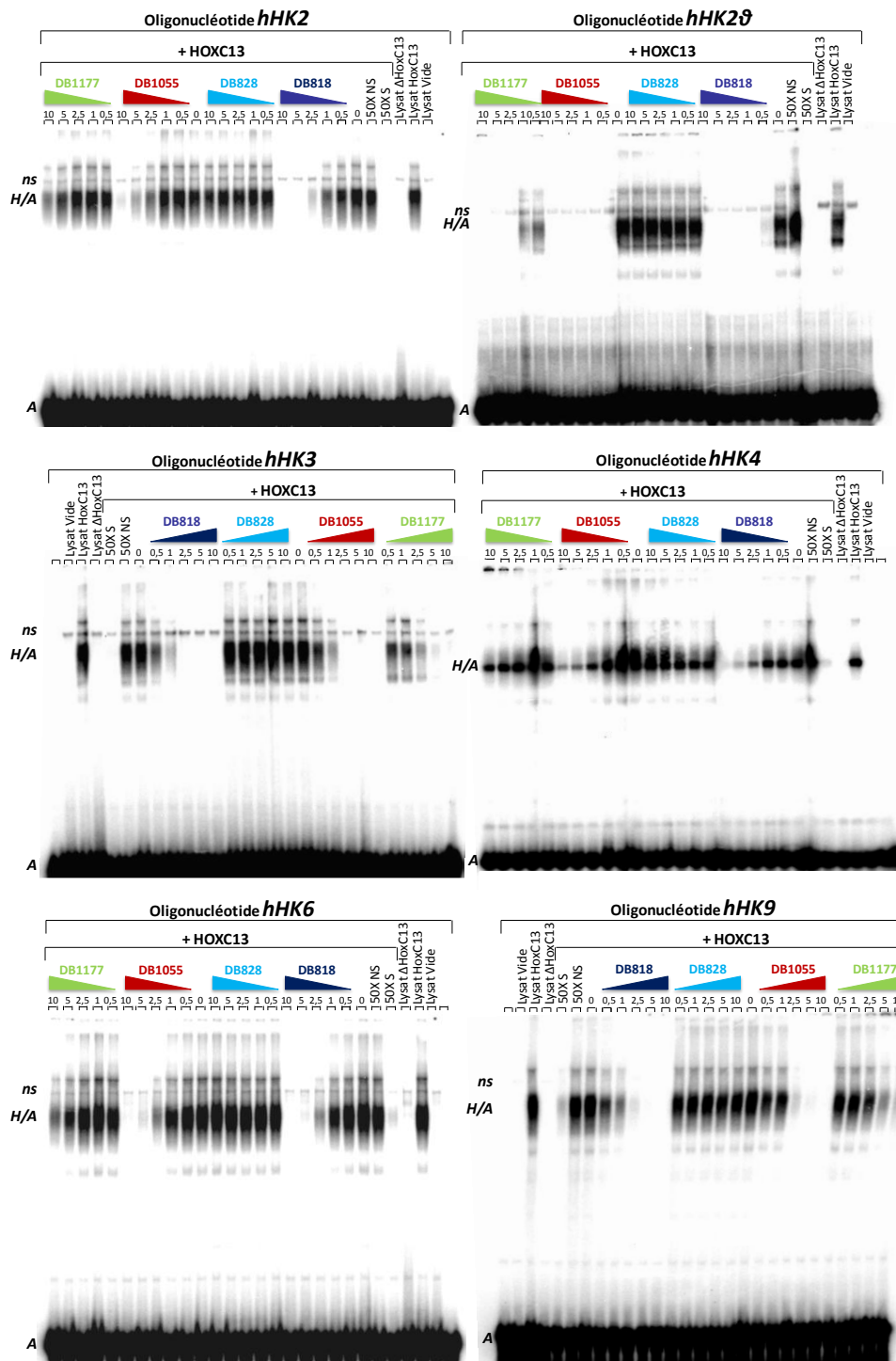
Par ailleurs, étant donné la pauvreté des données transcriptionnelles décrites dans la littérature quant aux séquences promotrices des gènes cibles du facteur HOXA9 et HOXA10 *in vivo*, nous avons entrepris la validation de ce modèle via l'utilisation du facteur HOXC13. Bien que ce facteur ne soit pas impliqué dans la tumorigenèse, la caractérisation de séquences *hHK* (*human hair keratin*) comme promoteurs de gènes cibles (codant ici pour la kératine des cheveux) du facteur HOXC13 (**Jave-Suarez et al., 2002**) en font un modèle transcriptionnel pour l'évaluation de la modulation de l'interaction à l'ADN des protéines HOX par les composés DB.



**Figure 89: Séquences nucléotidiques des oligonucléotides contenant les sites d'interaction du facteur HOXC13 décrit dans la littérature comme promoteurs de gène cible régulé *in vivo* par ce facteur de transcription.** La séquence soulignée correspond au site reconnu par HOX (bleu). La référence de l'article est indiquée à droite du schéma.

Ces séquences riches en paire de base AT ont des motifs de type 5'-ATTA, son inverse 5'-TAAT, 5'-TTTA et 5'-TAAA (**Fig. 89**). A travers une collaboration avec le Dr. Jave-Suarez nous avons obtenus les plasmides d'expressions de la protéine HOXC13 (pcDNA3-HOXC13) et la protéine ΔHOXC13 (pcDNA3-HOXC13) mutée dans la séquence codante pour l'homéodomaine (intégration d'un codon stop).

A l'instar des évaluations précédentes, l'inhibition des complexes HOXC13/*hHK* par les composés DB les plus actifs (DB818, DB1055 et DB1177) est constatée en retard en gel à l'opposé du DB828, composé contrôle inactif (**Fig. 90 et Fig. 91**).



**Figure 90: Inhibition de l'activité de liaison à l'ADN du facteur HOXC13 envers des promoteurs de gènes cibles décrit *in vivo*.** Les retards en gels ont été réalisés avec des concentrations croissantes en composés DB (0,5; 1; 2,5; 5 et 10 $\mu$ M) incubées en présence de l'oligonucléotide radiomarqué (*hHK2*, *hHK2 $\theta$* , *hHK3*, *hHK4*, *hHK6* et *hHK9*) et la protéine HOXC13 ou  $\Delta$ HOXC13 (protéine mutée au niveau de son homéodomaine aboutissant à un codon stop et dépourvue de capacité d'interaction à l'ADN) exprimés en lysat de réticulocyte. La spécificité d'interaction est déterminée par l'ajout d'oligonucléotides spécifique (S) ou non spécifique (NS) non radiomarqué à fort ratio relativement à la sonde radiomarquée (50X). ns: complexe non spécifique; H/A : complexe HOX/ADN; A: ADN libre.

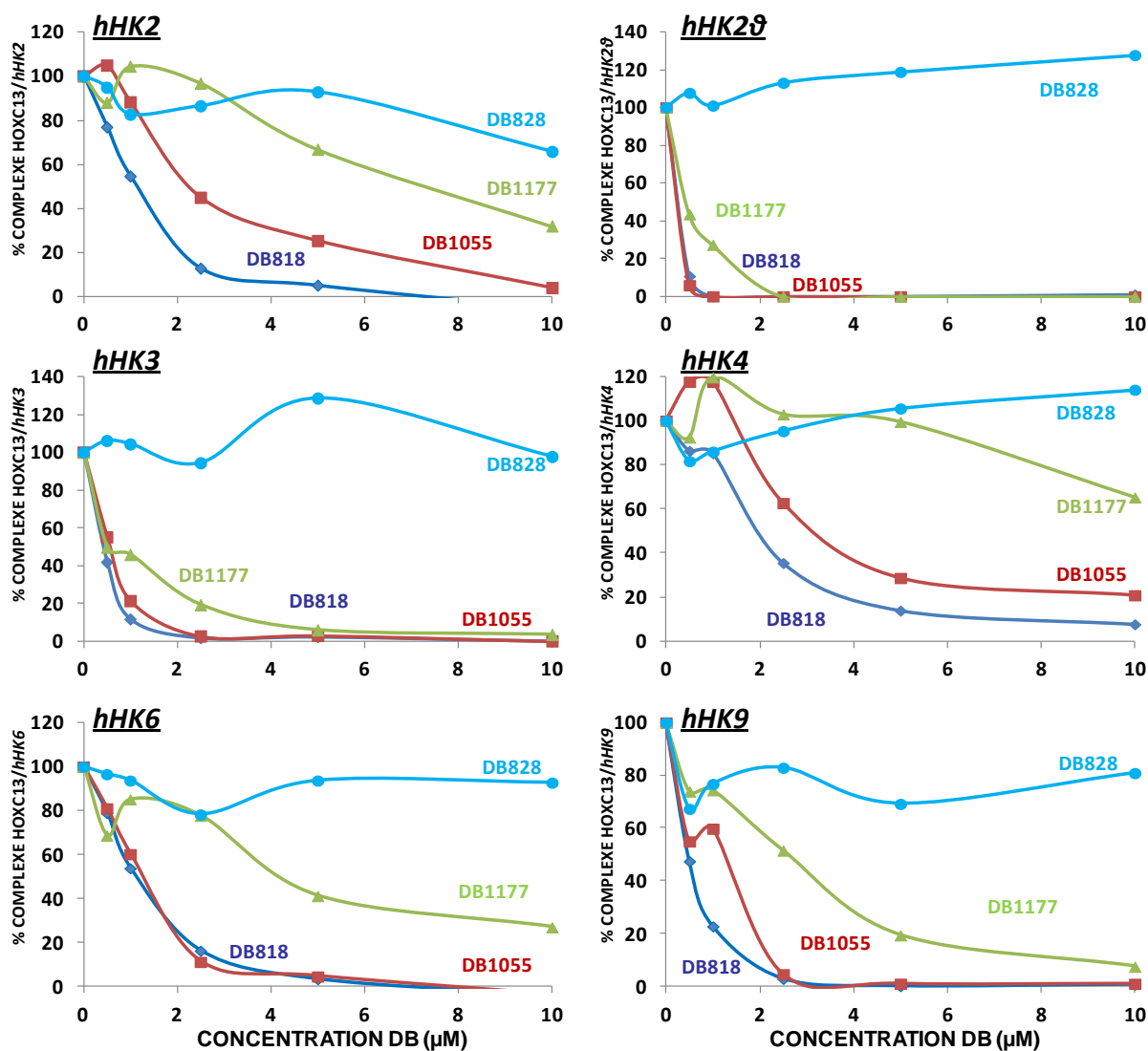
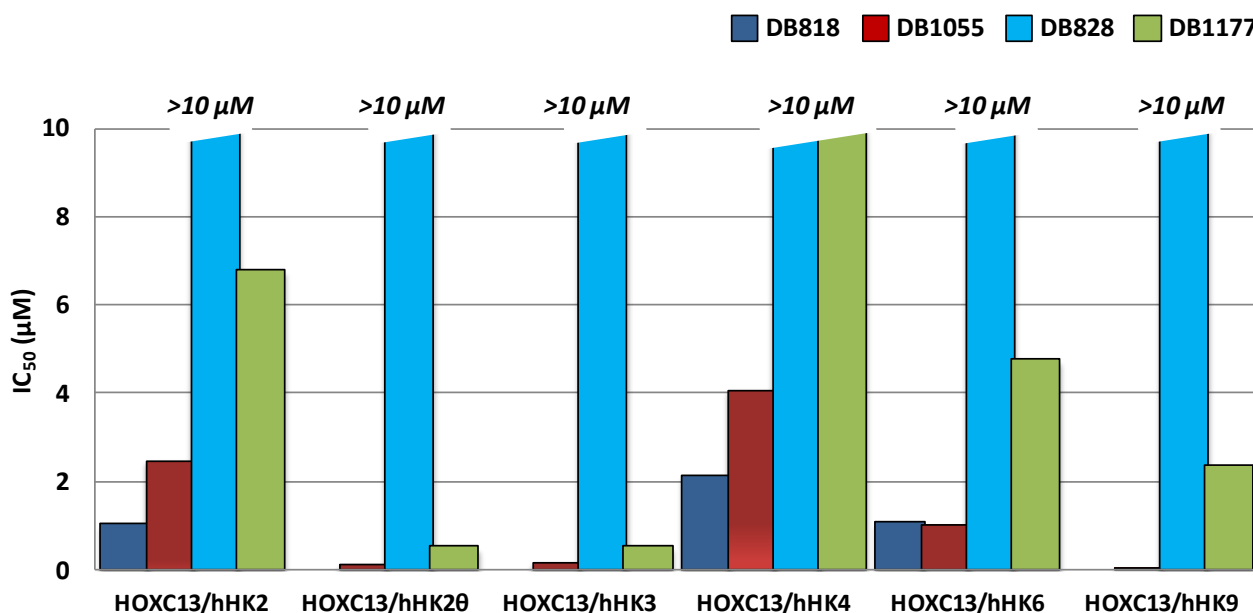


Figure 91: Quantification de la modulation de l'activité de liaison à l'ADN des protéines HOXA9 et HOXA10 envers des promoteurs de gènes cibles décrit *in vivo*. Les quantifications ont été réalisées à partir des retards en gel présentés en figure 90.

Moins de 4μM de composés DB actifs (DB818, DB1055 ou DB1177) réussissent à inhiber 50% ou plus du complexe HOXC13/hHK. Parmi ces composés le DB818 est le plus actif dans l'inhibition de la reconnaissance des séquences *hHK* par HOXC13 contrairement au dérivé DB828 pour lequel l'IC<sub>50</sub> n'est jamais atteint même en présence de 10μM de composé, concentration maximale utilisée lors de l'expérimentation (Fig. 92). Enfin pour certains complexes, tels HOXC13/hHk2θ, HOXC13/hHk3 et HOXC13/hHk9, l'IC<sub>50</sub> est atteinte pour des concentrations inférieures à la concentration minimale (0,5μM) témoignant d'une activité inhibitrice plus importante en particulier pour le DB818 (Fig. 92). Les composés semblent être moins actifs dans l'inhibition du complexe HOXC13/hHK4 bien que le cœur du site 5'-TTAATG soit similaire à la séquence *hHK2* ce qui pourrait s'expliquer par un défaut de séchage du gel influant sur la quantification de celui-ci (Fig. 90).



**Figure 92: Activité d'inhibition de liaison à l'ADN des complexes HOXC13/hHK par les composés DB sélectionnés.** L' $IC_{50}$ , exprimée en  $\mu M$ , correspond à la concentration en composé DB pour laquelle 50% du complexe HOXC13/Hhk est inhibée relativement au contrôle sans composé traduisant 100% du complexe HOXC13/hHK. Ces données proviennent des quantifications de retard en gels présentées dans la **figure 91** et dont les valeurs d' $IC_{50}$  dérivent des courbes de tendances exponentielles (où  $IC_{50}(\mu M) = \frac{\ln(50/b)}{a}$ ) dont l'équation de la courbe est sous forme  $y = b e^{ax}$ ). Pour le complexe HOXC13/Hhk2θ, aucune valeur n'est indiquée en présence du DB818, DB1055 et DB1177 puisque celui-ci atteint l' $IC_{50}$  pour des concentrations inférieures à  $0,5\mu M$  correspondant à la concentration minimale utilisée lors de l'expérimentation. A l'inverse, pour certains complexes, l' $IC_{50}$  du DB828 ou du DB1177 n'est pas atteint même en présence de  $10\mu M$  de composés, concentration maximale utilisée lors de l'expérimentation.

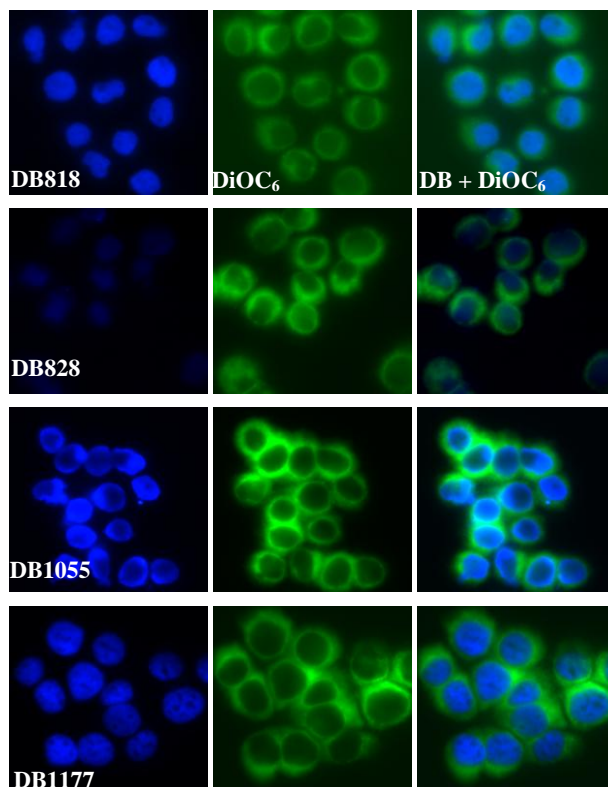
En conclusion, l'utilisation de ce modèle montrent une fois de plus la modulation possible *in vitro* des facteurs de transcription HOX par des ligands du petit sillon de l'ADN, dont l'activité d'inhibition suit un profil similaire pouvant être classé dans cette ordre décroissant DB818 > DB1055 > DB1177 et DB828 inactif.

## D. Modulation du complexe HOXA9/ADN *in cellulo*

Outre la détermination de la spécificité d'inhibition des composés DB, l'un des objectifs majeurs de ce projet de thèse fut la validation *in cellulo* de la modulation de l'interaction à l'ADN du facteur de transcription oncogène HOXA9 dans un modèle de leucémie.

### 1. Localisation cellulaire des composés DB sélectionnés

La localisation nucléaire des composés DB sélectionnés est essentielle pour en faire des candidats inhibiteurs de l'interaction à l'ADN d'HOXA9 *in vivo*. Etant donné les propriétés de fluorescence intrinsèque de ces composés, leur localisation cellulaire a été évaluée par microscopie de fluorescence via l'utilisation d'une lignée cellulaire HT29, utilisée comme modèle de par ses propriétés d'adhérence qui permettent une très bonne visualisation des compartiments nucléaires et cytoplasmiques. Un marqueur du cytoplasme (marqueur des mitochondries: DiOC<sub>6</sub>) est utilisé. Les photos présentées en figure 93 mettent donc en avant la fluorescence du cytoplasme (DiOC<sub>6</sub>), celle du composé (DB) et la colocalisation des deux (DB+ DiOC<sub>6</sub>). L'ensemble des composés présentent une localisation nucléaire confortée par l'absence de colocalisation du marqueur cytoplasmique avec le composé.

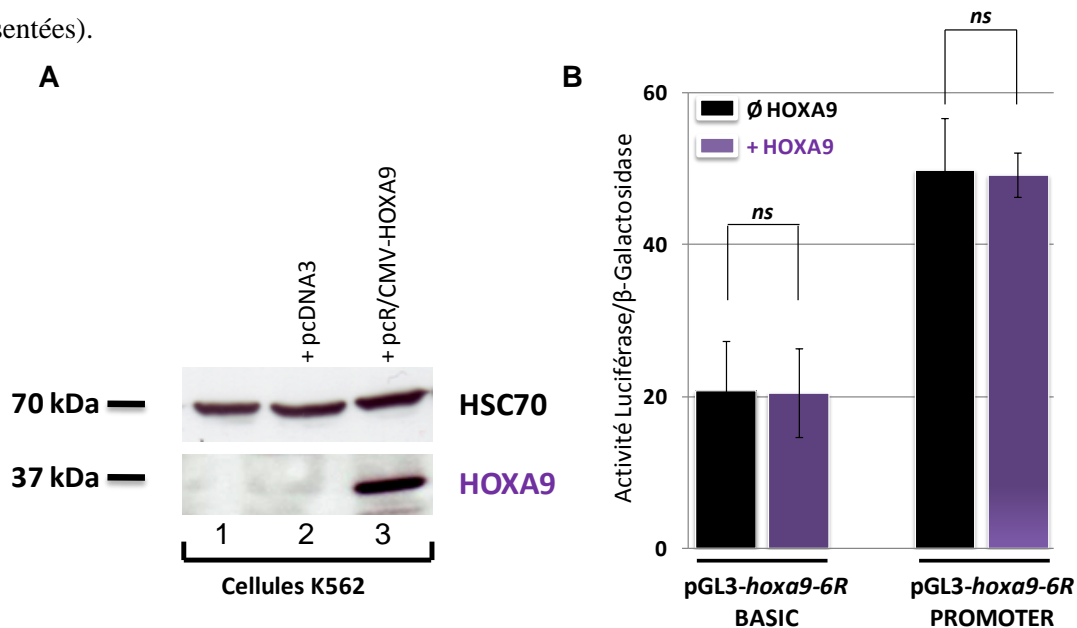


**Figure 93: Localisation intracellulaire des composés DB818, DB828, DB1055 et DB1177.** Les cellules HT29 sont incubées avec 5 $\mu$ M de composés DB pendant 16h et traitées avec un marqueur cytoplasmique (marqueur des mitochondries: DiOC<sub>6</sub>). La localisation des composés DB est distinguée grâce à leur fluorescence intrinsèque. Afin de mettre en évidence la fluorescence du DB828, le contraste a du être augmenté étant donné la plus faible fluorescence du composé.

Ces données de microscopie ont donc mis en évidence d'une part la pénétration cellulaire de ces composés à l'instar des composés précédents testés et d'autre part leurs localisations nucléaires, lieu de l'ADN génomique.

## 2. Modulation *in cellulo* de l'activité transcriptionnelle des composés DB sélectionnés

Etant donné la nature protéique de l'oncogène HOXA9 et le mode d'inhibition envisagé par ces ligands du petit sillon de l'ADN, la validation cellulaire s'est orientée vers une approche transcriptionnelle. Celle-ci permet, après transfection de plasmides exprimant le facteur de transcription HOXA9 et d'un gène rapporteur sous le contrôle de la séquence de fixation du facteur HOXA9 répétée 6 fois en tandem, d'observer l'activité transcriptionnelle en présence ou en absence des dérivés DB inhibiteurs. Les cellules K562, lignée leucémique de type LMC, ont été choisies comme modèle d'étude transcriptionnelle pour leur haut rendement de transfection, l'absence d'expression endogène du facteur HOXA9 (**Fig. 94. A**) et la faible toxicité des composés DB envers celle-ci. En premier lieu nous nous sommes alors focalisés sur l'activité transcriptionnelle du facteur HOXA9 dont l'expression est médié par transfection du plasmide pRc/CMV-HOXA9 sous le contrôle du promoteur minimale CMV (*cytomegalovirus*). Le vecteur pcDNA3 a été utilisé comme contrôle de transfection « plasmide vide ». L'expression de chaque ADNc (ADN complémentaire) contenu dans les différentes constructions plasmidiques est évaluée qualitativement et quantitativement par test d'expression en lysat de réticulocytes via l'incorporation de [<sup>35</sup>S] méthionine (données non présentées).



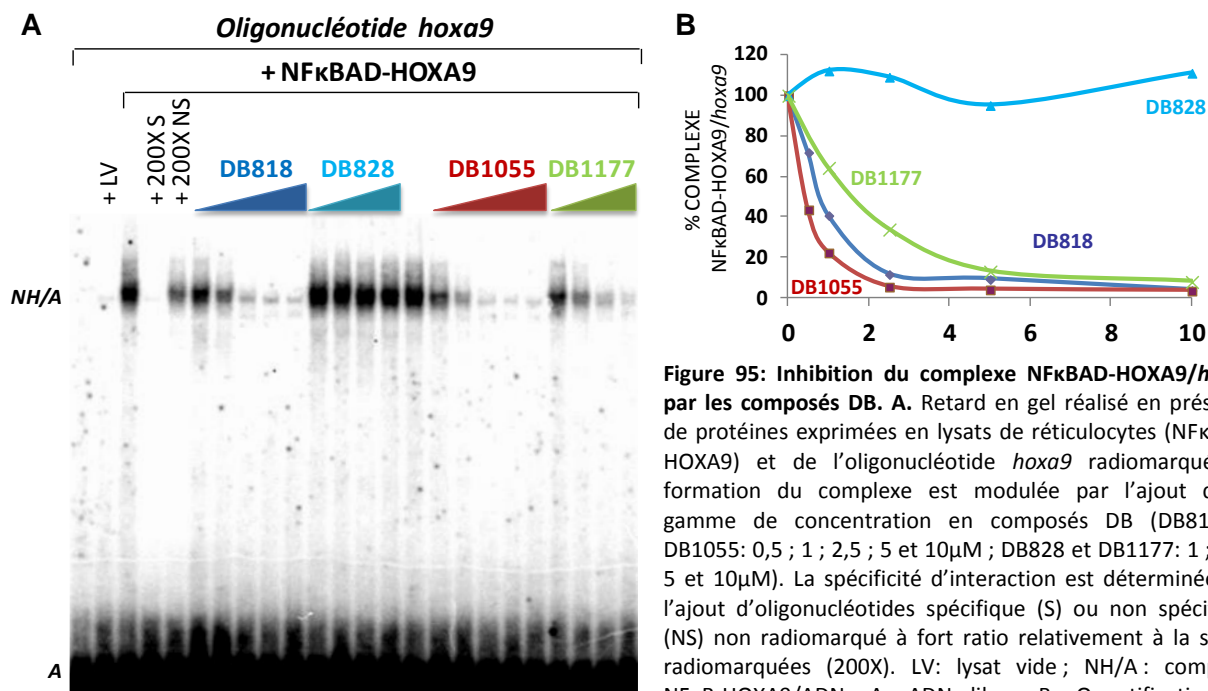
**Figure 94: A. Expression du facteur HOXA9 dans les cellules K562 transfectées.** Les cellules K562 (1) ont été transfectées avec 5µg de vecteur pcDNA3 (+ pcDNA3) (2) ou pRc/CMV-HoxA9 (+ pRc/CMV-HoxA9) (3). **B. Ratios d'activités luciférase/β-galactosidase en présence ou non de l'expression de la protéine HOXA9 au sein de cellules K562.** L'expression ou non du facteur HOXA9 est obtenue par transfection du plasmide pRc/CMV-HOXA9 ou du pcDNA3 respectivement. Les caractéristiques des vecteurs pGL3-hoxa9-6RWT BASIC et pGL3-hoxa9-6RWT PROMOTER sont décrites dans le matériel et méthode. Les valeurs obtenues sont issues de la moyenne de 2 expériences indépendantes réalisées ± l'erreur standard de cette moyenne (s.e.m.). Les données statistiques sont apportées par le test ANOVA: ns, non spécifique (P>0,05).



La transfection du vecteur pRc/CMV-HOXA9 au sein des cellules K562 permet l'expression exogène du facteur de transcription HOXA9 dans des cellules qui en sont dépourvues (**Fig. 94. A**). Décrit comme faible transactivateur en absence de cofacteurs ou d'un contexte favorable malgré la reconnaissance de son site consensus (**Fig. 78**), la mise en évidence d'une activité transcriptionnelle de ce facteur a fait l'objet de quelques mises au points notamment dans le choix de vecteurs rapporteurs avec (pGL3-*hoxa9-6RWT* PROMOTER) ou sans (pGL3-*hoxa9-6RWT* BASIC) promoteur minimal du virus SV40 où les éléments de réponses reconnus par HOXA9 sont clonés en amont (clonage réalisé précédemment au laboratoire). Néanmoins quelque soit le vecteur rapporteur utilisé, l'expression ou non du facteur HOXA9 au sein du modèle cellulaire K562 n'influe guère sur l'activité luciférase et donc sur l'activité transcriptionnelle (**Fig. 94. B.**). En effet dans ce contexte HOXA9 n'a pas d'effet transactivateur concordant ainsi avec les données de la littérature.

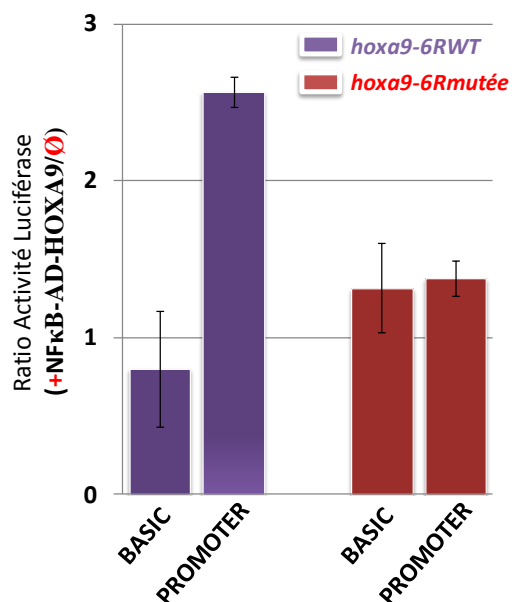
Pour pallier à cette faible transactivation deux approches moléculaires ont été expérimentées. La première est la cotransfection de cofacteurs (tel PBX ou MEIS) afin d'accroître la transactivation ainsi démontré dans la littérature et dont l'implication leucémique a été largement décrite tel MEIS considéré comme un accélérateur du phénomène de leucémogénèse induit par HOXA9 (**Kroon et al., 1998 ; LaRonde-LeBlanc et al., 2003**). De même la protéine chimère NUP98-HOXA9 est incluse dans l'évaluation de ce modèle à la fois pour son activité transcriptionnelle plus importante que celle du facteur HOXA9 seul mais aussi pour son implication récurrente dans les leucémies (**Ghannam et al. 2004**). La seconde approche consiste à potentialiser directement l'activité transcriptionnelle du facteur HOXA9 par expression de la protéine chimère NFκBAD-HOXA9 où HOXA9 est fusionné au domaine transactivateur du facteur de transcription NFκB. L'ADNc du facteur HOXA9 est alors cloné dans le vecteur pCMV-AD intégrant ce domaine transactivateur.

La réalisation de ces transfections a donc nécessité au préalable la construction de ces vecteurs plasmidiques par clonages et comme précédemment la validation qualitative et quantitative de l'expression de chaque ADNc, inséré ou remanié, en lysat de réticulocytes par incorporation de [<sup>35</sup>S] méthionine. Toutefois l'utilisation de la protéine chimère NFκBAD-HOXA9 requiert la non altération des propriétés d'interaction de l'homéodomaine du facteur HOXA9 et des propriétés d'inhibition par les composés DB actifs (**Fig. 78**). Ceci a notamment été évalué au préalable dont les résultats présentés en figure **95** montrent un profil similaire au facteur HOXA9 à la fois dans l'interaction à sa séquence consensus mais aussi envers l'inhibition de son interaction à l'ADN par les composés DB.



**Figure 95: Inhibition du complexe NFκBAD-HOXA9/hoxa9 par les composés DB.** A. Retard en gel réalisé en présence de protéines exprimées en lysats de réticulocytes (NFκBAD-HOXA9) et de l'oligonucléotide *hoxa9* radiomarqué. La formation du complexe est modulée par l'ajout d'une gamme de concentration en composés DB (DB818 et DB1055: 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 10μM ; DB828 et DB1177: 1 ; 2,5 ; 5 et 10μM). La spécificité d'interaction est déterminée par l'ajout d'oligonucléotides spécifique (S) ou non spécifique (NS) non radiomarqué à fort ratio relativement à la sonde radiomarquée (200X). LV: lysat vide ; NH/A : complexe NFκB-HOXA9/ADN ; A: ADN libre. B. Quantification de l'inhibition de l'activité DNA-binding de NFκBAD-HOXA9 par les composés DB.

Cet outil moléculaire validé, nous avons donc évalué l'activité transcriptionnelle de HOXA9 sous forme de protéine chimère NFκBAD-HOXA9, au sein des cellules K562, envers l'expression de la luciférase, gène rapporteur des vecteurs avec (pGL3-*hoxa9-6RWT* PROMOTER) ou sans (pGL3-*hoxa9-6RWT* BASIC) promoteur minimal. Seules les conditions de transfections impliquant le vecteur rapporteur pGL3-*hoxa9-6RWT* PROMOTER en présence de la protéine chimère NFκBAD-HOXA9 aboutissent à une transactivation 2,5 fois supérieur vis-à-vis des cellules transfectées avec le plasmide contrôle pcDNA3 vide (**Fig. 96**). La spécificité de transactivation a été évalué par des vecteurs rapporteurs équivalents (pGL3-*hoxa9-6Rmutée* PROMOTER ou pGL3-*hoxa9-6Rmutée* BASIC) qui diffèrent uniquement par la mutation des éléments de réponses reconnus par HOXA9 et dont la présence ou l'absence de la protéine NFκBAD-HOXA9 n'influe guère sur l'expression de la luciférase (**Fig. 96**).



**Figure 96: Ratios d'activités luciférase en présence ou non de l'expression de la protéine chimère NFκBAD-HOXA9 et des vecteurs rapporteurs intégrant 6 fois en tandem la séquence consensus reconnus par le facteur HOXA9 WT (pGL3-*hoxa9-6RWT* BASIC ou pGL3-*hoxa9-6RWT* PROMOTER) ou mutée (pGL3-*hoxa9-6Rmutée* BASIC ou pGL3-*hoxa9-6Rmutée* PROMOTER).** L'expression ou non du facteur NFκBAD-HOXA9 est obtenue par transfection du plasmide pCMVAD-NFκBAD-HOXA9 ou du pcDNA3 respectivement au sein des cellules K562. Les valeurs obtenues sont issues de la moyenne de 2 expériences indépendantes réalisées ± l'erreur standard de cette moyenne (s.e.m.).

Ces données nous ont donc orienté vers le choix du vecteur rapporteur pGL3-*hoxa9-6RWT* PROMOTER dont l'activité transcriptionnelle est observée non seulement en présence de la protéine chimère NFκBAD-HOXA9 (**Fig. 96**) mais aussi en présence des hétérodimères NFκBAD-HOXA9/PBX1, NFκBAD-HOXA9/MEIS1 et de la protéine de fusion NFκBAD-NUP98-HOXA9 uniquement envers les séquences sauvage (*hoxa9-6RWT*) (**Fig. 97**). Les valeurs d'activation transcriptionnelle peuvent varier d'une expérimentation à l'autre pour une même protéine telle NFκBAD-HOXA9 (**Fig. 97. A, B et C**) témoignant de la variabilité du statut des cellules (tel le temps de culture), toutefois la présence du cofacteur PBX1 additionné au facteur NFκBAD-HOXA9 augmentent considérablement l'activité transcriptionnelle comme l'est la transfection de la protéine chimère NFκBAD-NUP98-HOXA9 vis-à-vis de NFκBAD-HOXA9 seul (**Fig. 97. D, E, F et G**).

Par cette approche, nous avons alors pu montrer l'inhibition de l'activité d'interaction à l'ADN du facteur de transcription HOXA9 en présence des composés DB1055 et DB818 actifs contrairement au DB828 inactif. Cette modulation transcriptionnelle est constatée pour les complexes [HOXA9/ADN], [HOXA9/PBX1/ADN], [HOXA9/MEIS1A/ADN] et [NUP98-HOXA9/ADN] uniquement en présence des composés DB actifs (DB818 et DB1055) et des séquences consensus WT suggérant à la fois une spécificité d'interaction, du monomère seul ou en complexe, et d'inhibition par les composés DB actifs seuls. Le DB828, inactif, est incapable de moduler le complexe [HOXA9/ADN] *in cellulo* (**Fig. 97. C**). En présence des composés DB818 et DB1055, l'activité transcriptionnelle des complexes n'est certes pas réduites à néant mais est inhibée approximativement d'un facteur 2 ou plus.

Ainsi, les composés DB actifs sont capables d'inhiber l'interaction à l'ADN de l'oncogène HOXA9 seul mais aussi lorsqu'il est en lien avec d'autres partenaires protéiques sous forme de complexe avec le cofacteur PBX ou MEIS ou sous forme de protéine chimère NUP98-HOXA9 *in cellulo* via l'utilisation de ce modèle de transfection.

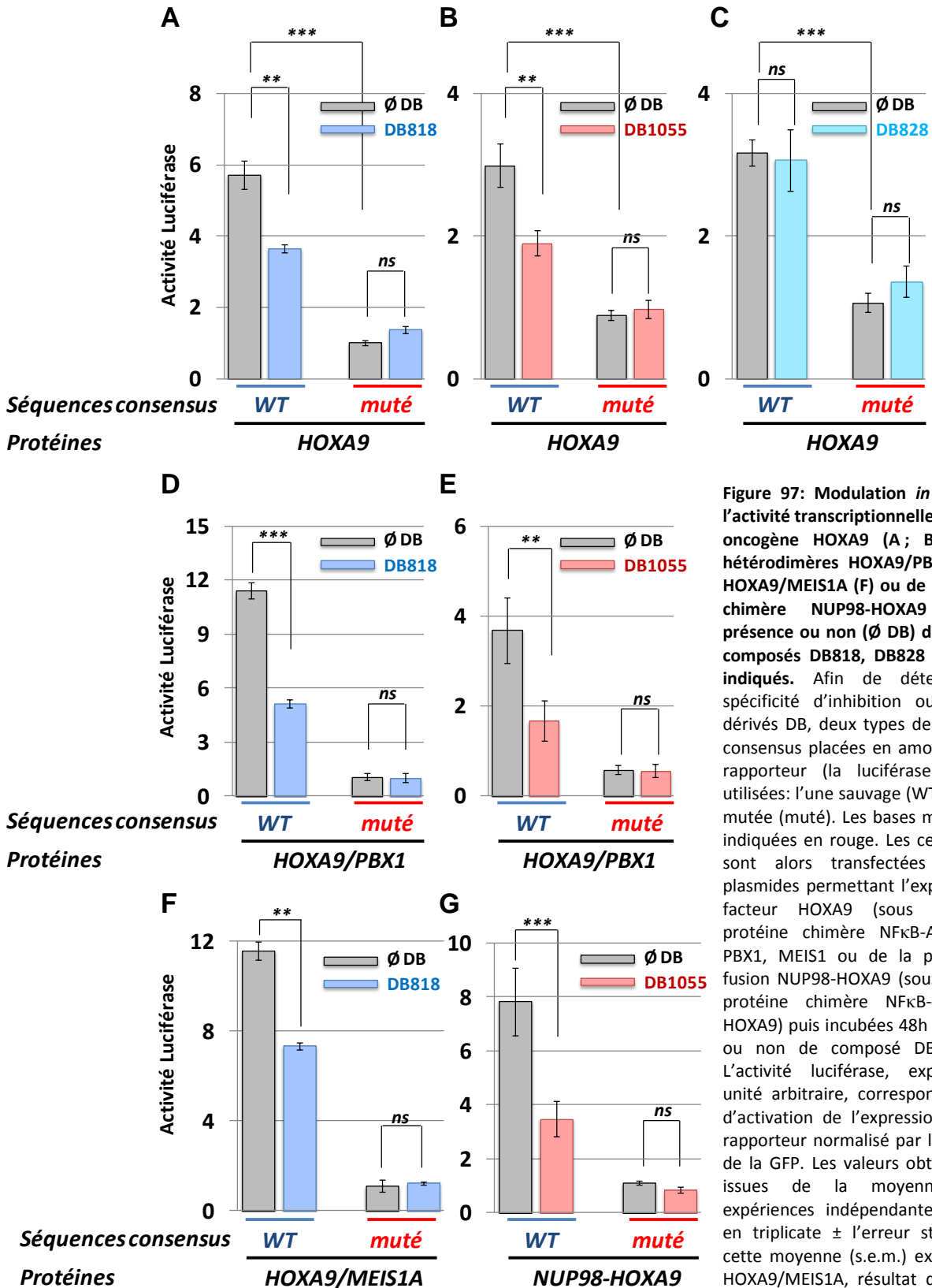
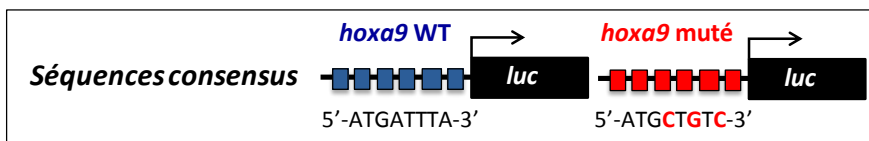


Figure 97: Modulation *in cellulo* de l'activité transcriptionnelle du facteur oncogène HOXA9 (A ; B ; C), des hétérodimères HOXA9/PBX1 (D ; E), HOXA9/MEIS1A (F) ou de la protéine chimère NUP98-HOXA9 (G) en présence ou non (Ø DB) de 20µM de composés DB818, DB828 et DB1055 indiqués. Afin de déterminer la spécificité d'inhibition ou non des dérivés DB, deux types de séquences consensus placées en amont du gène rapporteur (la luciférase) ont été utilisées: l'une sauvage (WT) et l'autre mutée (muté). Les bases mutées sont indiquées en rouge. Les cellules K562 sont alors transfectées avec les plasmides permettant l'expression du facteur HOXA9 (sous forme de protéine chimère NFκB-AD-HOXA9), PBX1, MEIS1 ou de la protéine de fusion NUP98-HOXA9 (sous forme de protéine chimère NFκB-AD-NUP98-HOXA9) puis incubées 48h avec 20µM ou non de composé DB indiqués. L'activité luciférase, exprimée en unité arbitraire, correspond au ratio d'activation de l'expression du gène rapporteur normalisé par l'expression de la GFP. Les valeurs obtenues sont issues de la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicate ± l'erreur standard de cette moyenne (s.e.m.) excepté pour HOXA9/MEIS1A, résultat d'une seule expérience réalisée en triplicate qui demande à être réitérée pour conforter ce résultat. Les données statistiques sont apportées par le test ANOVA où \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; ns, non spécifique ( $P > 0,05$ ).



### 3. Evaluation de la cytotoxicité cellulaires des composés DB sélectionnées

Pour cela plusieurs lignées cellulaires leucémiques issues de patients atteints de LAM, associées ou non à des réarrangements du gène *mll*, ont été utilisées d'une part pour quantifier l'expression du facteur HOXA9 par PCR quantitative en temps réel (Q-RT-PCR) et d'autre part pour la détermination de la cytotoxicité des composés DB actifs sélectionnés (DB818 et DB1055) en comparaison au DB contrôle (DB828) par test MTS. Les majeures parties de ces expérimentations ont été effectués par différents étudiants au laboratoire, avec ma participation sur une partie de celles-ci.

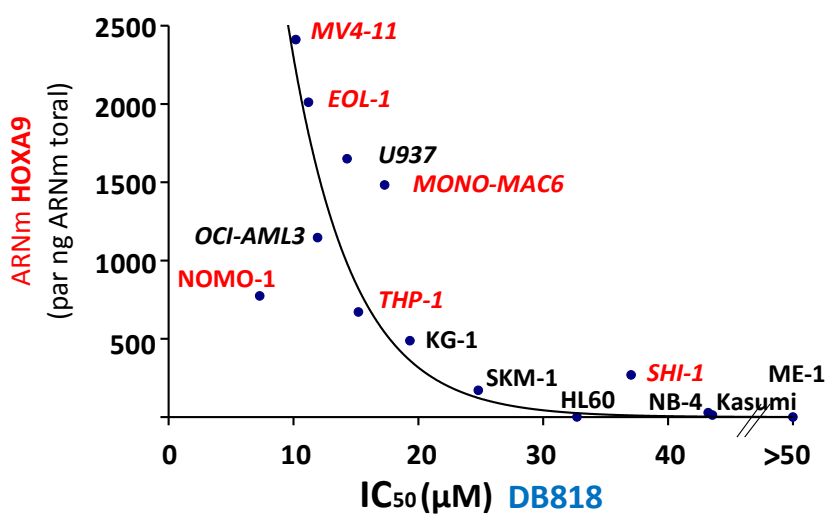


Figure 98: Cytotoxicité du DB818 sur des lignées cellulaires de type LAM en fonction du taux d'expression du facteur HOXA9. L'expression de HOXA9 est quantifiée par PCR quantitative en temps réel. L'IC<sub>50</sub> correspond à la concentration pour laquelle 50% de la population cellulaire est vivante relativement à la population totale définie dans les points contrôles non traités. Le nom des lignées cellulaires indiqués correspond à des LAM associées (en rouge) ou non (en noir) à des réarrangements du gène *MLL*.

Les résultats exposés en figure 98 mettent en avant la toxicité préférentielle du composé DB818 envers les lignées cellulaires surexprimant HOXA9 vis-à-vis de celles dont l'expression est diminuée ou absente. Les mêmes effets sont constatés pour le DB1055 à l'inverse du DB828, inactif *in vitro*, dont la cytotoxicité est faible et indépendante de niveau d'expression du facteur HOXA9 (données non présentées). De plus, le composé DB1177, utilisé jusqu'à présent *in vitro*, a fait preuve d'une toxicité cellulaire plus importante et ceci quelque soit le statut d'expression de HOXA9 et a n'a donc plus été utilisé dans la suite du projet du fait d'un mode d'action plus complexe et indépendant d'HOXA9.

Afin d'appuyer cette validation cellulaire effectuée sur des modèles de lignées cellulaires, nous l'avons élargie aux échantillons de blastes issus de patients. En étroite collaboration avec le laboratoire d'hématologie (Pr. Claude Preudhomme) et le service de maladie du sang (Pr Bruno Quesnel) du CHRU de Lille, et dans le cadre du projet national ALFA (*Acute Leukemia French Association*), les composés DB ont été évalués (et continuent à l'être actuellement) sur des blastes humains isolés de sang ou de moelle osseuse de patients atteints de LAM (ou, pour certains, de LAL) au diagnostic. J'ai participé à ces expérimentations dans le cadre d'un travail d'équipe avec d'autres personnes du laboratoire. La corrélation entre l'expression d'HOXA9 et la cytotoxicité est présentée en figure 99.

La cytotoxicité des composés actifs, évaluée ici par test MTT, est corrélée avec le taux d'expression du facteur HOXA9 déterminée par Q-RT-PCR.

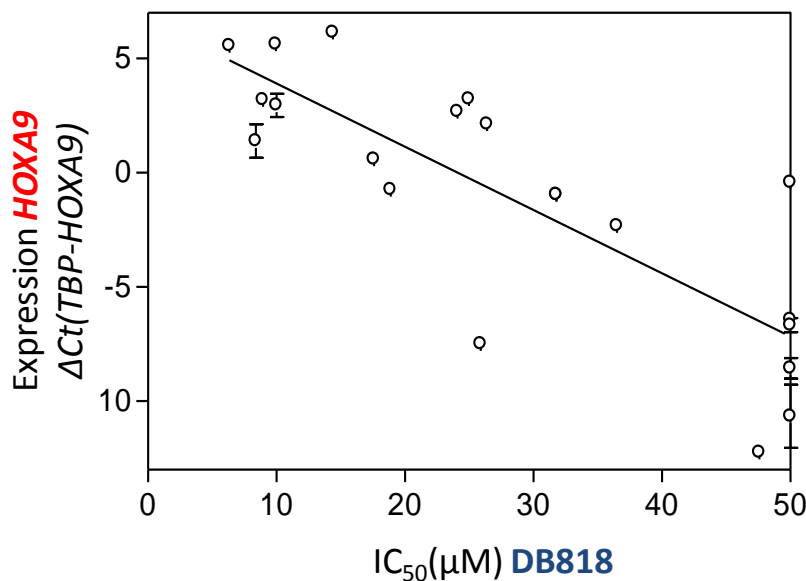


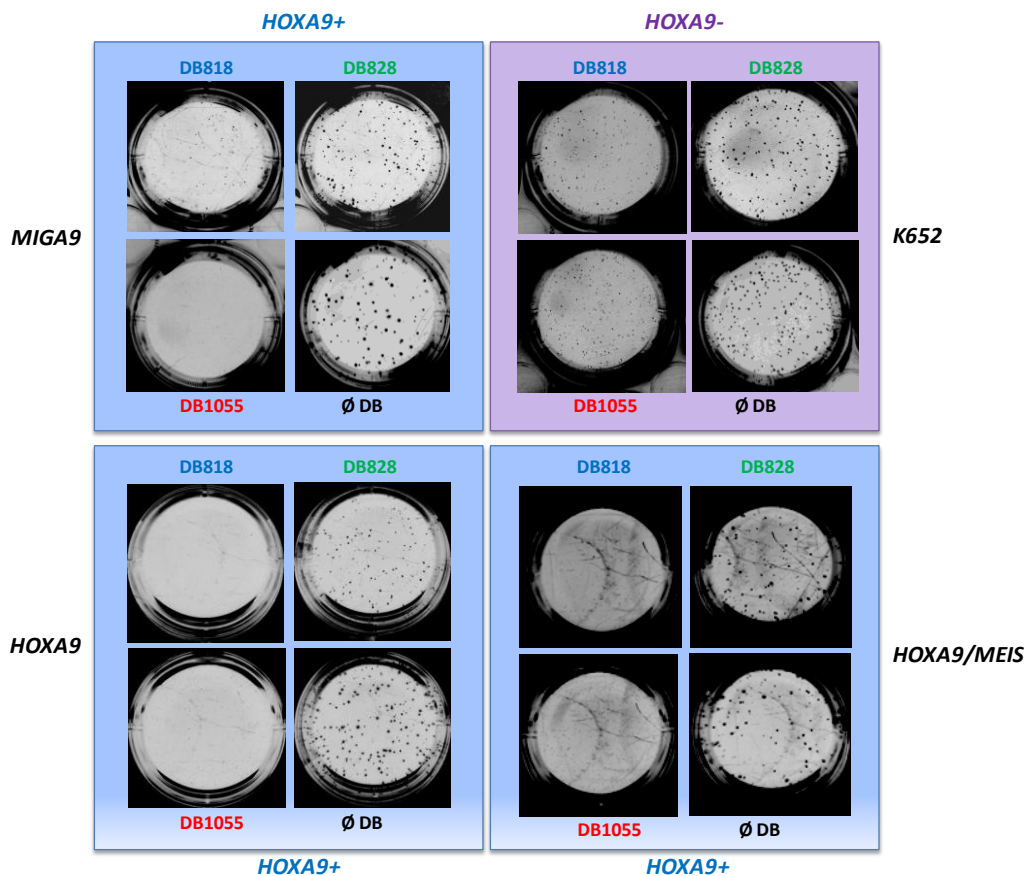
Figure 99: Cytotoxicité du DB818 sur des blastes prélevés au diagnostic de patients atteints de LAM en fonction du taux d'expression du facteur HOXA9. L'expression de HOXA9 est quantifiée par Q-RT-PCR relativement à l'expression de la TBP (*TATA-box binding protein*). L'IC<sub>50</sub> correspond à la concentration pour laquelle 50% de la population cellulaire est vivante relativement à la population totale définie dans les points contrôles non traités

A l'identique des lignées leucémiques, les blastes exprimant le plus HOXA9 sont ceux qui répondent le plus au dérivé DB actif le DB818 (Fig. 99). Les mêmes résultats ont été obtenus avec le DB1055 contrairement au DB828 faiblement cytotoxique quelque soit le statut HOXA9 des échantillons de patients (données non présentées).

Il existe donc une corrélation entre le taux d'expression du facteur de transcription de HOXA9 et la cytotoxicité des composés DB818 et DB1055, décrit comme actif *in vitro*, à la fois dans des modèles de lignées cellulaires leucémiques et de blastes de patients atteint de leucémies. Ce qui suggère un mécanisme d'action cytotoxique dépendant de HOXA9.

#### 4. Potentiel anti-prolifératif des composés DB sélectionnés

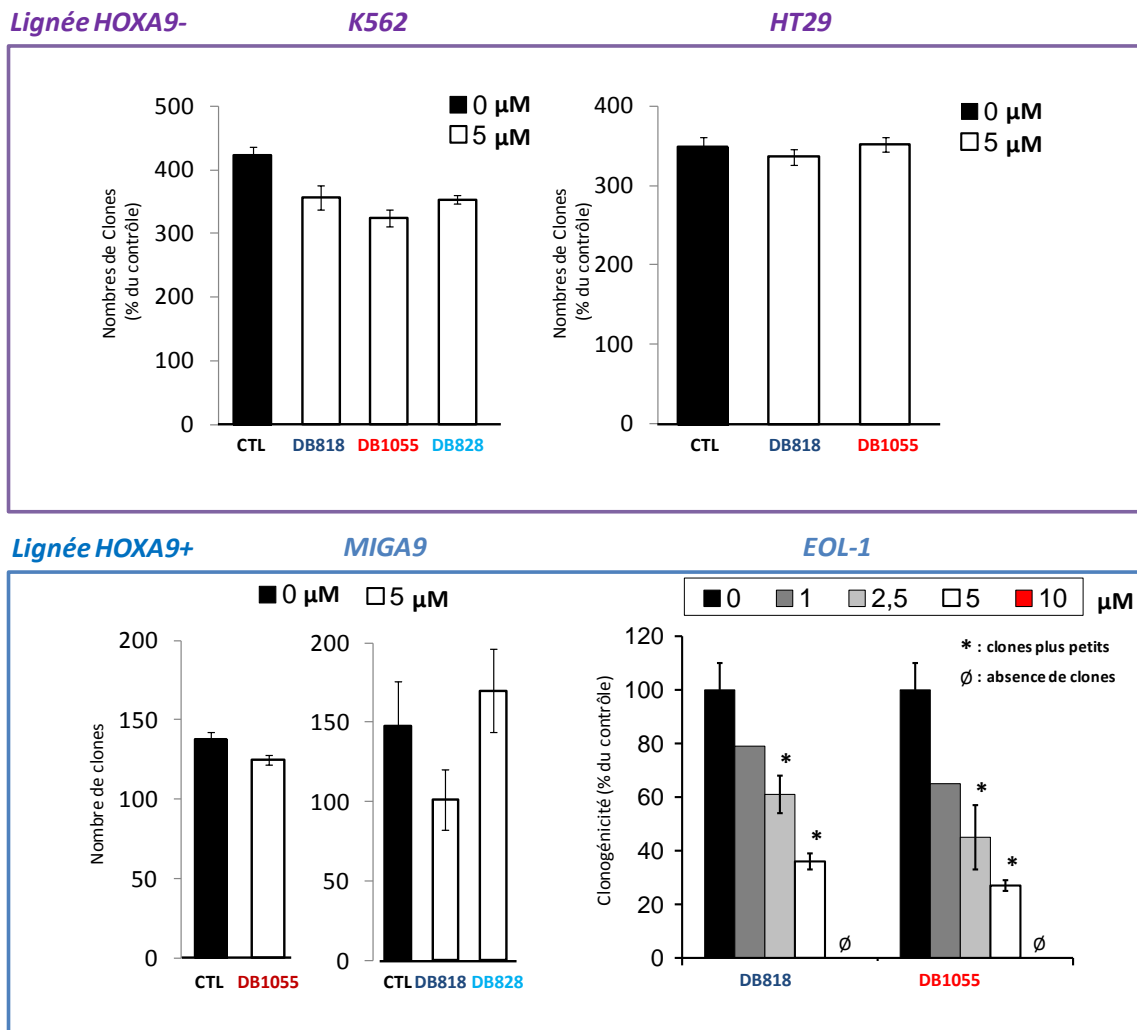
Jusqu'à présent, les composés DB ont été évalués pour leur cytotoxicité corrélant avec le statut d'expression du facteur HOXA9. L'intérêt par la suite a été de décrypter les causes de cette cytotoxicité et notamment de déterminer si la présence de ces composés DB peut induire un effet antiprolifératif. Pour cela, des tests clonogéniques ont été effectués avec diverses lignées cellulaires leucémiques positives ou non pour l'expression du facteur HOXA9. Ce test permet d'évaluer la capacité de progéniteurs hématopoïétiques à proliférer et à former des clones en présence ou en absence des composés DB.



**Figure 100:** Effets des composés DB sur la clonogénicité des lignées cellulaires MIGA9, HOXA9, HOXA9/MEIS et K562. Les lignées MIGA9 et HOXA9 sont des lignées murines transformées par HOXA9 et la lignée HOXA9/MEIS par HOXA9 et son cofacteur MEIS. Ces tests clonogéniques ont été réalisés en présence de 5 $\mu$ M de composés DB. Les cellules ensemencées sont cultivées en milieu semi-solide gélosé. Les photos représentent les puits à 14 jours avec ou sans traitement.

Incubées ou non en présence des composés actifs, les cellules leucémiques réagissent différemment aux composés selon les lignées. Celles caractérisées par une surexpression du facteur HOXA9 (MIGA9, HOXA9, HOXA9/MEIS) prolifèrent nettement moins lorsqu'elles sont incubées avec les composés DB818 et DB1055 vis-à-vis des puits contrôles et des cellules K562 n'exprimant pas HOXA9 (**Fig. 100**). Toujours de manière qualitative, le DB828 ne semble avoir aucun effet sur la prolifération des clones de cellules HOXA9+ et HOXA9- en accord avec son inactivité *in vitro* et *in cellulo* (**Fig. 100**).

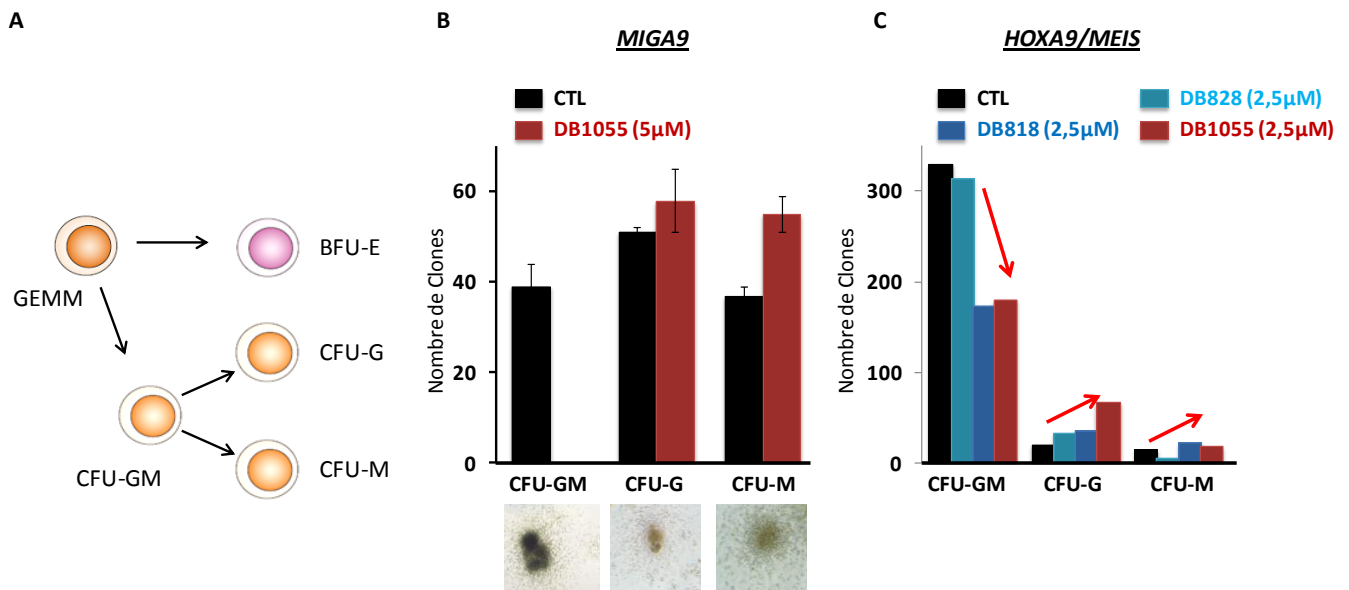
Lorsque l'on s'intéresse à l'aspect quantitatif plusieurs observations peuvent être émises. D'une part les composés DB actifs ne modifient que très peu le nombre de clones des cellules HOXA9- (K562 ou HT29) contrairement aux cellules HOXA9+ (MIGA9 et EOL-1) (**Fig. 101**). De même le composé DB828 est inactif envers l'ensemble des lignées évaluées (**Fig. 101**). Par contre, le nombre et la taille des clones formés pour les cellules HOXA9+ positives, notamment pour les cellules EOL-1, est fortement réduit en présence des composés DB818 et DB1055 (**Fig. 101**).



**Figure 101: Dénombrements des clones par microscopie optique des tests clonogéniques réalisés sur diverses lignées cellulaire.** Les cellules K562 et HT29 sont considérées comme HOXA9- (absence de l'expression de HOXA9) comparé aux cellules MIGA9 et EOL1 le surexprimant (HOXA9+).

Non seulement les cellules MIGA9 et HOXA9/MEIS forment des clones plus petits en présence des composé DB actifs mais ces clones montrent des différences morphologiques accentuées par rapport aux clones contrôles. En effet une analyse morphologique des clones nous a permis de les classer en colonies CFU-GM, CFU-G, CFU-M ou BFU-E (selon les critères du fournisseur Stem Cell). En présence du composé DB1055 le nombre de colonies CFU-GM diminue et coïncide avec une augmentation du nombre de clones différenciés de type GFU-G et CFU-M (Fig. 102).





**Figure 102: Dénombrements des différents clones (A) obtenus avec les cellules murines MIGA9 (HOXA9+) (B) ou transformées par HoxA9 + Meis1 (C) en présence ou en absence des composés sélectionnés.** Cette distinction clonale repose sur des critères morphologique selon les descriptions apportées par le fournisseur Stem Cell. **A.** Schéma de la différenciation des cellules souches murines: GEMM (*colony forming unit granulocytary erythrocytary megakaryocytary monocytary*) en CFU-GM (*colony forming unit granulo-monocytary*), BFU-E (*burst forming unit erythrocytary*), CFU-G (*colony forming unit granulocytary*) et CFU-M (*colony forming unit monocytary*). **B.** Quantification des sous-types de clones CFU-GM, CFU-G et CFU-M issues des cellules MIGA9 en absence (noir) ou présence (rouge) de DB1055. **C.** Quantification des clones issues de cellules de moelle osseuse de souris transformées par HOXA9 et MEIS1 sans (contrôle: CTL) ou avec traitement par les différents composés (2,5µM).

Ainsi les composés DB actifs possèdent un effet anticlonogénique spécifique aux lignées surexprimant HOXA9 contrairement au DB contrôle inactif. Par ailleurs, l'analyse morphologique des clones suggère un effet de ces composés en termes de différenciation des précurseurs leucémiques, effet confirmé ensuite au laboratoire par la mise en évidence de marqueurs de différenciation cellulaire.

## 5. Conclusions/Perspectives

Moduler l'interaction à l'ADN de facteurs de transcription oncogènes constitue une nouvelle approche thérapeutique pouvant permettre de réguler *in fine* l'expression de gènes cibles, effecteurs de ces protéines. Cette modulation peut tout à fait aboutir à l'inhibition d'une expression et/ou à la levée d'une répression transcriptionnelle suffisantes à altérer le processus de cancérogenèse. A l'exemple de la modulation du facteur de transcription ERG, HOXA9 fut notre deuxième cible.

### *Spécificité d'inhibition des composés DB*

Les diamidines sont depuis de nombreuses années étudiées pour leur capacité d'interaction dans le petit sillon de l'ADN et cela de manière séquence spécifique. Le laboratoire s'est alors orienté vers de tels composés susceptibles d'interagir avec la double hélice d'ADN afin d'altérer la reconnaissance de protéines clés tels des facteurs de transcription. Se pose alors la question du choix de la cible et de la spécificité de séquence des composés. A l'évidence, et contrairement au facteur ERG, les données de la littérature ont orienté le choix de cette cible en tant qu'oncogène leucémique puisque le maintien du phénotype cancéreux de certaines leucémies dépend étroitement de sa surexpression (**Faber et al., 2009 ; Chapman et al., 2011**).

Les premières modulations du complexe HOXA9/ADN ont alors ont été effectuées *in vitro* où l'ADN correspond à un oligonucléotide incluant sa séquence consensus de type 5'-ATT(A/T)AT (**Hung et al., 2012**), séquence coïncidant parfaitement avec celle reconnue par trois diamidines de types benzimidazoles (DB818 et DB1055) et naphthalène (DB1177) (**Fig. 78. C**). La reconnaissance exacte du site expliquerait en partie l'inhibition importante de ce complexe en particulier pour les composés DB818 et DB1055 dont leur efficacité est supérieure à celle du DB1177. Ce dernier, dépourvu de groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogènes dans sa structure centrale malgré ses groupements amidines terminaux, pourraient expliquer cette plus faible activité. Bien que le DB828 soit constitué d'un cycle furane donneur de liaisons hydrogènes, son inactivité serait davantage liée à l'orientation de la molécule dont l'atome d'oxygène du cycle furane (DB828), plus petit que le soufre du cycle thiophène du DB818, diminue la courbure du composé mais accroît la rotation des cycles phényles autour du cycle central et donc module la position des groupements amidines, donneurs de liaisons hydrogènes. Cette libre rotation permettrait une meilleur reconnaissance au sein du petit sillon du DB818 en comparaison au DB828 de la même manière que pour le composé thiophène DB351 versus son équivalent furane DB75 (**Liu et al., 2008**).

Ces composés sont à la fois capables d'inhiber l'interaction à l'ADN du facteur HOXA9 seul mais aussi lorsque celui-ci est sous forme d'hétérodimère avec PBX dont le site de reconnaissance est alors élargi à 5'-ATGATTTA. Le cofacteur seul n'interagit guère avec la séquence consensus bien que son site soit présent suggérant la nécessité du facteur HOXA9 dans l'établissement de ce complexe (**Fig. 79**). Malgré l'affinité d'interaction du complexe HOX/PBX plus élevée pour l'ADN que celle du monomère, la reconnaissance du site d'interaction du facteur HOX par les composés DB actifs suffit à déstabiliser l'interaction de l'hétérodimère (**Fig. 83**). Afin de compléter ces données, il serait intéressant de déterminer si les composés DB sélectionnés sont capables d'inhiber l'interaction à l'ADN du complexe HOX/PBX3, comme mis en évidence pour HOX/PBX1 et dont les récentes publications le décrivent comme un accélérateur de leucémogénèse comme l'est MEIS (**Li et al., 2012b**).

Par ailleurs, nos expériences *in vitro* montrent la modulation de l'interaction à l'ADN des facteurs HOXA9, HOXA5, HOXA7/PBX1 et HOXA10 souvent surexprimés de manière concomitante dans les LAM et ciblant des sites communs sur les promoteurs régulés et décrivent leur potentiel inhibiteur envers les complexes HOXB6/ADN et HOXB7/ADN fréquemment impliqués dans les LAL (**Eklund, 2007**). Cette modulation devra être confortée au sein de modèle cellulaire comme elle l'a été HOXA9 nous permettant de savoir si des phénomènes de compensation peuvent être évités notamment pour les facteurs HOXA7 et HOXA10. En effet, nombre de données expérimentales démontrent l'expression conjointe des protéines HOXA7, HOXA9 et HOXA10 dans les LAM et LAL associées à des réarrangements du gène *MLL* dont leurs gènes sont décrits comme cibles des protéines de fusions *MLL* (**Armstrong et al., 2002**).

Évalués *in vitro* sur des séquences de promoteurs de gènes cibles décrits comme régulés *in vivo* par HOXA9 et/ou HOXA10, ces composés DB ont fait preuve d'activités inhibitrices similaires à celle observées avec les séquences consensus synthétiques. Les DB818 et DB1055 sont aussi actifs dans l'inhibition de la reconnaissance des séquences de promoteurs cibles des facteurs de transcription HOXA9 et HOXA10 contrairement au DB828. En effet, le site consensus de ces facteurs riches en paires de bases AT de type 5'-ATT(A/T)A est retrouvé dans chaque promoteur concordant ainsi avec la séquence oligonucléotidique utilisée jusqu'à présent pour nos validations. Nous avons par ailleurs mis en évidence la reconnaissance par le facteur HOXA9 de promoteurs de gènes cibles du facteur HOXA10 comme initialement décrit dans la littérature. Ceci est le cas des séquences *dusp4*, *tgfb2 prox.* et *p21*. Parmi ces séquences, seul l'oligonucléotide p21 intègre deux sites consensus laissant présager une reconnaissance plus importante par les dérivés DB et donc une activité inhibitrice accrue. Or, le résultat inverse a été mis en évidence. L'étude de la localisation des sites efficaces de reconnaissance par les composés DB devra être réalisée par empreinte à la DNase I sur les portions de

promoteurs concernés, en corrélation avec les effets en tests luciférase pour comprendre ces différences fonctionnelles.

L'utilisation du modèle HOXC13 nous a permis de conforter nos résultats montrant un profil d'inhibition similaire. Toutefois, celui-ci semble varier en fonction des bases entourant le site consensus des promoteurs *hHK*. L'activité d'inhibition de liaison à l'ADN par les dérivés DB est plus faible lorsque le site 5'-TAAT est suivi d'une base G (tels *hHK2* et *hHK4*) altérant probablement l'interaction des composés DB contrairement aux sites suivit d'une base C ou A (tels *hHK2* $\vartheta$ , *hHK3* et *hHk9*).

Il sera ainsi essentiel d'évaluer l'activité d'inhibition de liaison à l'ADN de ces promoteurs de gènes cibles décrit comme régulés *in vivo* par HOXA9 et/ou HOXA10 dans un modèle cellulaire d'activité transcriptionnelle (tel le modèle K562) mais aussi de quantifier cette potentielle modulation *in vivo* par ChIP et Q-RT-PCR.

#### ***Validation cellulaire de l'inhibition de liaison à l'ADN du facteur HOXA9***

Les quelques gènes cibles décrits *in vivo* comme régulés par le facteur HOXA9 l'ont soit été récemment ou requiert un contexte cellulaire spécifique à l'exemple du modèle de régulation du gène *CYBB* par HOXA9 uniquement décrit dans la lignée U937 traitées par l'INF $\gamma$  (Bei et al., 2005).

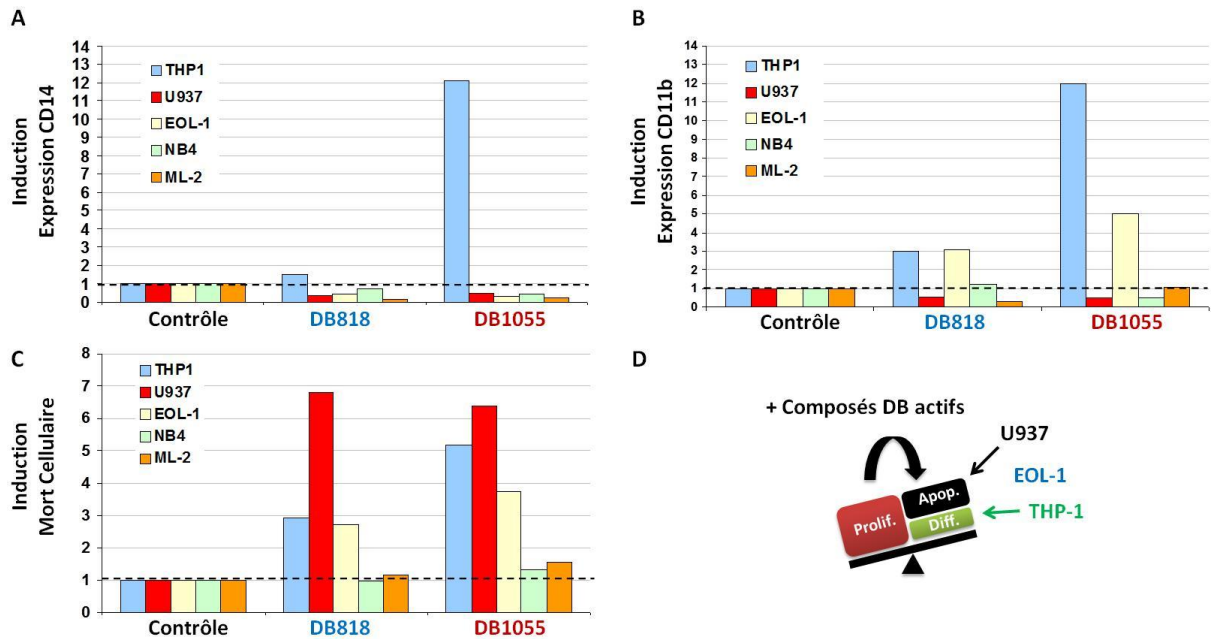
De manière générale, très peu de gènes cibles du facteur HOXA9 ont été décrits dans le cas de modèles cellulaires humains. Pour pallier à ce manque de données, le laboratoire va s'attacher à déterminer les cibles du facteur HOXA9 dans un modèle humain par ChIP-seq. Les promoteurs cibles seront ensuite validés par tests luciférase, la localisation du site de fixation sera recherchée par empreinte à la DNase I et la fonctionnalité de l'inhibition de l'expression endogène sera recherchée par RT-PCR quantitative de l'expression de l'ARNm correspondant. Ces dernières données seront comparées entre un échantillon cellulaire traité avec les composés DB actifs et un échantillon non traité. L'analyse du transcriptome de cellules traitées ou non avec les composés DB permettra par ailleurs de déterminer l'existence ou non d'une régulation transcriptionnelle et quels sont les gènes dont l'expression est régulée directement par le composé actif. Ces données seront comparées à celles de la même lignée infectée par un lentivirus exprimant un shRNA dirigé spécifiquement contre HOXA9.

Les constructions oligonucléotidiques de bases (séquences intégrant le site consensus qui correspond d'ailleurs parfaitement avec les sites décrits *in vivo* depuis) ont été utilisées pour le modèle cellulaire en tests luciférase. Celui-ci nous a permis de mettre en évidence une régulation significative et spécifique de l'interaction à sa séquence consensus du facteur HOXA9 *in cellulo*. Non seulement l'inhibition de liaison est observée pour le monomère seul mais elle l'est aussi pour les hétérodimères

HOXA9/PBX1 et HOXA9/MEIS1 et pour la protéine de fusion NUP98-HOXA9. A l'identique des tests réalisés *in vitro*, les cofacteurs seuls ne montrent pas d'activité transcriptionnelle et celle-ci n'est constatée qu'en présence d'HOXA9. Par ailleurs, les hétérodimères HOXA9/PBX1, HOXA9/MEIS1 ainsi que la protéine de fusion NUP98-HOXA9 augmentent l'activité transcriptionnelle de base d'HOXA9 en monomère, corrélant ainsi avec les données d'interaction *in vitro* et leur description dans la littérature (**LaRonde-LeBlanc et al., 2003 ; Ghannam et al., 2004**). Afin de compléter ces données, la modulation transcriptionnelle de l'hétérodimère HOXA9/PBX3 et de l'hétérotrimère HOXA9/PBX/MEIS devra être également évaluée. Ce modèle nous a donc permis de mettre en évidence une modulation transcriptionnelle par les composés DB actifs. Cette inhibition n'est certes pas totale mais suffirait probablement à induire la différenciation et ou la mort des cellules leucémiques puisque l'expression du facteur HOXA9 diminue au cours de la différenciation des CSHs suggérant une différenciation hématopoïétique terminale indépendante du facteur. Cette remarque est étayée par de récentes données expérimentales indiquant qu'HOXA9 n'est indispensable ni à la génération ni à la différenciation des lignées cellulaires NK (*natural killer*) et dendritiques de moelle osseuse intervenant davantage en amont (**Gwin et al., 2013**).

Les résultats des tests clonogéniques, notamment ceux ayant inclus des lignées murines transformées par HOXA9 seul (MIGA9 ou HoxA9) ou avec le cofacteur MEIS (HOXA9/MEIS), suggèrent une induction de la différenciation des clones lorsque les cellules sont traitées avec les composés DB actifs. Cette hypothèse a été évaluée en parallèle au laboratoire dont quelques résultats représentatifs sont présentés en figure **103**.

Les composés DB actifs (DB818 et DB1055) induisent l'expression de marqueurs de différenciation des cellules myéloïdes (différenciées en monocytes et macrophages) CD14 et CD11b principalement envers les lignées de LAM THP-1 et EOL-1. A l'inverse ces mêmes composés induisent davantage la mort des cellules U937 (**Fig. 103**).



**Figure 103: Induction de la différenciation et de l'apoptose par les composés DB818 et DB1055 envers des lignées leucémiques de type LAM.** Les lignées surexprimant (THP-1, U937, ML2, EOL-1) ou non (NB4) HOXA9 sont incubées en présence de 10 $\mu$ M de composés pendant 72h. La quantification de l'induction de l'expression des marqueurs de différenciation CD14 et CD11b (A, B) et de la mort cellulaire par apoptose en double marquage annexine V / iodure de propidium (C) est déterminée par analyse en cytométrie en flux. Les trois lignées cellulaires sensibles en MTS (THP-1, EOL-1, U937) présentent trois profils cellulaires distincts en réponse au composé (D). Les lignées NB4 et ML2 ne montrent elles pas de changement en terme de différenciation ou de mort cellulaire, en accord avec les données recueillies en MTS (Figure 98 et données complémentaires)

A l'instar de la thérapie différenciatrice utilisant l'ATRA pour le traitement des LAP, ces composés seraient susceptibles de mener les cellules leucémiques vers un retour à l'état normal caractérisé par une différenciation des blastes et *in fine* mourir par apoptose. Toutefois, devant la variabilité des modèles cellulaires utilisés et leurs réponses à la présence des composés, il est essentiel de caractériser ces lignées afin de mettre en avant le rôle fonctionnel de ce facteur. Evalué en parallèle au laboratoire, par invalidation de l'expression de l'ARNm de *hoxa9* (*sh-hoxa9*), les résultats expérimentaux permettront de déterminer quelles sont les lignées cellulaires dont la survie dépend étroitement de l'expression d'HOXA9 et si cette dépendance corrèle avec la sensibilité aux composés DB actifs.

La corrélation entre la cytotoxicité des composés DB actifs et la surexpression du facteur HOXA9, à la fois au sein des lignées cellulaires leucémiques et sur les blastes de patients (atteint de LAM ou de LAL au diagnostic), conforte l'idée d'une inhibition, par les composés DB sélectionnés, des effets leucémogènes d'HOXA9.

***Moduler l'interaction à l'ADN de facteurs de transcription oncogènes est donc une réalité expérimentale qui demande à être validée in vivo sur modèles animaux.***

# **IV. MATÉRIEL & MÉTHODES**

## A. Composés Étudiés

Les dérivés DB sont obtenus dans le cadre d'une collaboration avec les professeurs David Boykin et David Wilson de l'université d'Atlanta (Géorgie, USA). Les composés KZ font l'objet d'une collaboration avec le Pr. Grace Karminski-Zamola de l'université de Zagreb (Croatie). Reçus sous forme de poudre, ils sont repris, selon leurs propriétés physico-chimiques, dans du DMSO ou de l'eau stérile pour une concentration finale de 10 mM et aliquotés pour stockage à -20°C.

## B. Oligonucléotides

Les séquences nucléotidiques de l'ensemble des oligonucléotides utilisés sont regroupées dans le tableau 3. Ils ont été synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique).

Dénomination	Séquences nucléotidiques	Utilisation
<i>EBS-WT</i>	5' -GATCTCGAGCAGGAAGTTCGA	EMSA
<i>EBSm (-2) C</i>	5' -GATCTCGAGCCGGAAGTTCGA	EMSA
<i>EBSm (-4) A</i>	5' -GATCTCGAACAGGAAGTTCGA	EMSA
<i>hoxa9</i>	5' -CTGCGATGATTTACGACCGC	EMSA
<i>hoxa10</i>	5' -CTGCGATGATTTATGACCGC	EMSA
<i>dscybb10</i>	5' -GTTGACCAATGATTATTAGCCAATT	EMSA
<i>tgfb2 prox.</i>	5' -CGTGGTTCAGAGAGAACTTATAAATCTC	EMSA
<i>dusp4a</i>	5' -TGCTCTGTGATTAATTCTCACTAAC-3	EMSA
<i>dusp4b</i>	5' -CTATAAAACTGATTTAATGGCTTTAGTG	EMSA
<i>p21</i>	5' -CGTTTTTATAATTTATGAATTTTTTATGTATTAATG	EMSA
<i>hHK2</i>	5' -AGCTAACTTTAATGAGGAGAA	EMSA
<i>hHK2θ</i>	5' -AGCTGCCAAATTACAAATTAATTAGCAGCG	EMSA
<i>hHK3</i>	5' -AGCTGGTTTTAATAGAAAGTG	EMSA
<i>hHK4</i>	5' -AGCTGCAGGTTAATGAGGGGTG	EMSA
<i>hHK6</i>	5' -AGCTCCTATTTTATGAGACTGGT	EMSA
<i>hHK9</i>	5' -AGCTGCCAATAAAAGAAGTCAA	EMSA

Tableau 3: Séquences des oligonucléotides utilisés.

## C. Vecteurs Plasmidiques

L'ensemble des vecteurs plasmidiques utilisés est regroupé dans le tableau 4.



Dénomination	Origine	Type d'inserts et séquences	Sites d'insertion	Utilisation
pGL3-PROMOTER	Promega			
pGL3-ebs-6RWT PROMOTER	Clonage Laboratoire	<b>ebs-6RWT</b> 5'-ctagcAGCAGGAAGttcgAGCAGGAAGttcgAGCAGGAAGttcg AGCAGGAAGttcgAGCAGGAAGttcgAGCAGGAAGttcg	NheI/XhoI	TRANSFECTION
pGL3-ebs-6REm PROMOTER	Clonage Laboratoire	<b>ebs-6REm</b> 5'-ctagcAGCACCAAGttcgAGCACCAAGttcgAGCACCAAGttcg AGCACCAAGttcgAGCACCAAGttcgAGCACCAAGttcg	NheI/XhoI	TRANSFECTION
pGL3-ebs-6RDm PROMOTER	Clonage Laboratoire	<b>ebs-6RDm</b> 5'-ctagcAGCAGGAAGtgggAGCAGGAAGtgggAGCAGGAAGtggg AGCAGGAAGtgggAGCAGGAAGtgggAGCAGGAAGtggg	NheI/XhoI	TRANSFECTION
pSG5	Stratagen			TRANSFECTION EMSA
pSG5-ERG	Dr. M. Duterque	ADNc ERG humain		TRANSFECTION EMSA
pSG5-EWS-ERG	Dr. M. Duterque	ADNc EWS-ERG		EMSA
pSG5-FLI1	Dr. M. Duterque	ADNc FLI1 murin		EMSA
pSG5-EWS-FLI1	Dr. M. Duterque			EMSA
pSG5-ETS-1	Dr. M. Aumercier	ADNc ETS-1 humain		EMSA
pSG5-ETS-2	Dr. M. Aumercier	ADNc ETS-2 humain		EMSA
pRSV-ERM	Dr. J.L. Beart	ADNc ERM humain		EMSA
pRSV-ETV1	Dr. J.L. Beart	ADNc ETV-1 humain		EMSA
pRSV-PEA3	Dr. J.L. Beart	ADNc PEA3 humain		EMSA
pCDNA3	Invitrogen			TRANSFECTION EMSA
pCDNA3-HOXA9	Dr. N. B. Yaseen	ADNc HOXA9 humain		EMSA
pcDNA3-PBX1	Clonage Laboratoire	ADNc PBX1A humain	EcoRI	TRANSFECTION EMSA
pSP65-PBX3	Adgene	ADNc PBX3 humain		EMSA
pVP16-MEIS1A	Adgene	ADNc MEI1A humain		TRANSFECTION
pCDNA3-NUP98-HOXA9	Dr. N. B. Yaseen	ADNc NUP98-HOXA9 humain		TRANSFECTION
pRc/CMV-HOXA9	Dr. C. Largman	ADNc HOXA9 humain		TRANSFECTION EMSA
pCMV-AD-HOXA9	Clonage Laboratoire	ADNc HOXA9 humain	XmaI/XbaI	TRANSFECTION EMSA
pCMV-AD-NUP98-HOXA9	Clonage Laboratoire	ADNc NUP98-HOXA9 humain	XmaI/XbaI	TRANSFECTION
pET28a-HOXA5	Dr. C. Largman	ADNc HOXA5 humain		EMSA
pCDNA3-HOXA7	Dr. R. Polakowska	ADNc HOXA7 humain		EMSA
pET28b-HOXA10	Dr. C. Largman	ADNc HOXA10 humain		EMSA
pET28c-HOXB1	Dr. C. Largman	ADNc HOXB1 humain		EMSA
pET28a-HOXB3	Dr. C. Largman	ADNc HOXB3 humain		EMSA
pET28a-HOXB6	Dr. C. Largman	ADNc HOXB6 humain		EMSA
pET28c-HOXB7	Dr. C. Largman	ADNc HOXB7 humain		EMSA
pET28a-HOXD9	Dr. C. Largman	ADNc HOXD9 humain		EMSA
pET28c-HOXD13	Dr. C. Largman	ADNc HOXD13 chicken		EMSA
pGL3-BASIC	Promega			TRANSFECTION
pGL3-hoxa9-6RWT BASIC	Clonage Laboratoire	<b>hoxa9-6RWT</b> 5'-cgcggttctcgATGATTTAcggATGATTTActg ATGATTTAcggATGATTTAcagATGATTTAcggATGATTTAcgtgct	MluI/NheI	TRANSFECTION
pGL3-hoxa9-6Rmutée BASIC	Clonage Laboratoire	<b>hoxa9-6Rmutée</b> 5'-cgcggttctcgATGCTGTCcggATGCTGTCcgtg ATGCTGTCcggATGCTGTCcagATGCTGTCcggATGCTGTCcgtgct	MluI/NheI	TRANSFECTION
pGL3-hoxa9-6RWT PROMOTER	Clonage Laboratoire	<b>hoxa9-6RWT</b> 5'-cgcggttctcgATGATTTAcggATGATTTActg ATGATTTAcggATGATTTAcagATGATTTAcggATGATTTAcgtgct	MluI/NheI	TRANSFECTION
pGL3-hoxa9-6Rmutée PROMOTER	Clonage Laboratoire	<b>hoxa9-6Rmutée</b> 5'-cgcggttctcgATGCTGTCcggATGCTGTCcgtg ATGCTGTCcggATGCTGTCcagATGCTGTCcggATGCTGTCcgtgct	MluI/NheI	TRANSFECTION

**Tableau 4: Description des vecteurs plasmidiques et des constructions plasmidiques utilisées.**

## D. Biologie Moléculaire

### 1. Clonage

Les vecteurs plasmidiques et les enzymes de restriction (sites d'insertions) employés sont listés dans le tableau 4. 4 µg de vecteurs plasmidiques donneurs ou receveurs sont digérés par 4 unités d'enzyme de restriction (Biolabs) 1h à 37°C dans 30 µL de tampon de digestion 1X spécifique. L'ADN est ensuite précipité par ajout de 200 µL d'éthanol absolu à -20°C suivi d'une centrifugation de 20 min à 13000g à 4°C. Le culot séché est repris dans 30 µL d'eau stérile. L'insert extrait à l'identique provient d'un vecteur plasmidique ou correspond à un oligonucléotide de synthèse (**Tableau 3**).

Après ajout de 5 µL de tampon de charge non dénaturant (Gel loading Dye Blue 6X, Biolabs), l'insert ou le vecteur plasmidique sont isolés par migration électrophorétique 1h à 120 V sur gel d'agarose 1% contenant 1% de BET (Bromure d'Ethidium) contre un tampon Tris-Borate-EDTA 1X (TBE, Invitrogen™). Après excision sous UV de la bande d'intérêt, l'ADN est extrait du gel à l'aide du kit Nucleospin (Macherey-Nagel) selon le protocole fourni. Le construit d'intérêt est obtenu par ligation des extrémités de l'insert à celles du vecteur plasmidique choisi (rapport molaire 3:1) par 4 unités de T4 DNA ligase (Invitrogen™) dans le tampon de ligation (Invitrogen™) fourni pendant 16h à 16°C.

### 2. Transformation bactérienne

La souche bactérienne d'*Escherichia coli* XLI-Blue strain possède le génotype suivant: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F', *proAB*, *lac*<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10, (Tet<sup>r</sup>)]. Cette souche est communément utilisée pour amplifier des plasmides d'intérêts.

Un clone de souche bactérienne *Escherichia coli* XLI-Blue strain est cultivé en milieu Luria-Bertani (LB : peptone 10g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 86mM; pH 7,5) à 37°C une nuit sous agitation, réensemencé au 1/20<sup>ème</sup> dans 10 mL de LB et incubée 3h à 37°C sous agitation afin de permettre aux bactéries d'être en phase exponentielle de croissance nécessaire au processus de transformation. La suspension est alors centrifugée 8 min à 5000g. Le culot bactérien est repris dans 1 mL de solution TSS (Transformation & Storage Solution : 15mL LB, 10g polyéthylène glycol (PEG-600), 750µL MgSO<sub>4</sub>, 750µL DMSO). 200ng de plasmide (ou 20 µl de produit de ligation pour le clonage bactérien) sont ajoutés à 100µL de bactéries ainsi rendues compétentes. Après incubation 30 min dans la glace, 900 µL d'un mélange TSS-glucose (14mL de TSS, 150µL de glucose 2M) sont ajoutés. La solution bactérienne est incubée 1h à 37°C sous agitation pour permettre l'expression du facteur de résistance à l'antibiotique de sélection. Enfin, 60µL de la suspension bactérienne sont étalés sur boîte de pétri de LB gélosé supplémenté de l'antibiotique de sélection spécifique (LB-agar 15g/L, ampicilline

0,05µg/µL). Les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve à 37°C une nuit pour permettre une pousse suffisante pour rendre visible à l'œil nu de chaque clone bactérien à partir d'une seule bactérie.

### **3. Amplification/Extraction des plasmides amplifiés**

Un clone bactérien isolé d'une boîte de pétri est mis en culture dans 10mL de LB avec ajout de l'antibiotique de sélection durant une nuit à 37°C sous agitation. La suspension est reprise dans 200mL de LB + antibiotique de sélection et de nouveau incubée une nuit à 37°C sous agitation. L'extraction des plasmides est réalisée à l'aide du kit NucleoBond®Xtra Maxi (Macherey-Nagel) selon le protocole fourni. Le culot d'ADN plasmidique obtenu est séché puis repris dans 300µL d'eau stérile et quantifié par mesure de l'absorbance à 260nm.

### **4. Quantification de l'ADN**

La quantité d'ADN est déterminée au spectrophotomètre UV par balayage spectral de 230 à 320 nm de la solution diluée au 1/200<sup>ème</sup>. Sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 50 µg d'ADN double brin, la concentration de l'échantillon est obtenue par application de la formule suivante :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = [50 \times \text{facteur de dilution} \times (\text{DO}_{\text{max}} - \text{DO}_{\text{min}})] / \text{Volume } (\mu\text{L}).$$

## **E. Modulation de l'interaction protéines/ADN**

### **1. Marquages de l'ADN par des radioéléments**

Le marquage des oligonucléotides de synthèse (**Tableau 3**) se fait par incorporation de groupement radiomarqué sur l'extrémité 5'-OH. 50µM d'oligonucléotide simple brin sont radiomarqués à l'extrémité 5' durant 2h à 37°C en présence de 1,85 MBq de  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (GE Healthcare), 20U d'enzyme T4 polynucleotide kinase (PNK, 10U/µL, BioLabs), 5µL de tampon spécifique (T4 PNK Reaction 10X Buffer, Biolabs) qsp 50 µL d'eau MQ. L'enzyme est inactivée 10 min à 90°C puis 1,5 µL du brin complémentaire à 50µM sont ajoutés et l'hybridation des deux oligonucléotides simples brins en un oligonucléotide double brin est obtenue par diminution lente de la température de 90°C à 20°C.

10 µL de tampon de dépôt non dénaturant (0,015% bleu de bromophénol, 0,015% xylène cyanole, 50% glycérol, TBE 0,08X, 0,01M EDTA) sont ajoutés aux échantillons radiomarqués et le mélange est déposé sur gel de polyacrylamide 10% non dénaturant (25mL acrylamide/bis-acrylamide : 29/1 ;

10mL TBE 10X ; 0,1% d'ammonium persulfate (APS) ; 0,01% de NNN'N'-tétra-éthylène-diamine (TEMED) ; qsp 100mL d'eau stérile) puis soumis à une électrophorèse 2h à 120V contre un tampon de migration TBE 1X (Invitrogen™). Le gel est révélé au Storm860 (Molecular Dynamics) par l'utilisation du logiciel ImageQuant™. Les fragments de gels de polyacrylamide contenant les bandes d'ADN double brin d'intérêt sont excisées, broyées dans 400µL de tampon TE-NaCl (10mM Tris, 1mM EDTA, 100mM NaCl, pH 8) et incubées une nuit à 4°C. L'ADN radiomarqué est alors filtré (0,45µm, Millipore) par centrifugation 10 min à 13000g et séparé du gel de polyacrylamide. Enfin, cet ADN est précipité à l'éthanol absolu -20°C par centrifugation 20 min à 13000g. Le culot séché est alors repris dans de l'eau stérile et stocké à -20°C.

## **2. Expression des protéines en lysat de réticulocytes**

Ce système biologique permet l'expression rapide de protéines en présence des vecteurs d'expression contenant les séquences codantes pour des protéines d'intérêt. Pour cela, les kits SP6, T3 ou T7 TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) et les vecteurs référencés dans le tableau 4 ont été utilisés. 25µL de lysat de réticulocyte de lapin sont incubés 1h30 à 30°C en présence de 2 µL de tampon de réaction (TNT® Reaction Buffer), 1µL de SP6, T3 ou T7 ARN polymérase (TNT® RNA Polymerase) en fonction du plasmide d'intérêt, 1µL d'acides aminés à 1mM, 1µL d'inhibiteur de ribonucléase (40U/µL, Invitrogen™) et 1µg de plasmides d'intérêt, qsp 50µL d'eau « sans nucléase ». Un contrôle est effectué en présence de plasmide sans insert. Les protéines obtenues sont stockées à -80°C.

## **3. Expression des protéines marquées au <sup>35</sup>S**

L'expression des protéines est vérifiée en substituant l'acide aminé méthionine par la [<sup>35</sup>S]-méthionine (1,1 MBq; GE Healthcare) conduisant à l'expression d'une protéine radiomarquée. Les lysats protéiques sont déposés sur gel de polyacrylamide 10 % constitué de deux parties :

- un gel de concentration de faible réticulation (0,312mL acrylamide/bisacrylamide 5% 37,5/1 ; 0,625mL Tris-HCl 0,5M, SDS 10%, qsp 2,5mL H<sub>2</sub>O additionné extemporanément de 30µL d'APS à 0,1g/mL et de 3µL de TEMED) pour concentrer les échantillons déposés
- un gel de séparation (1,25mL acrylamide/bisacrylamide 10% 37,5/1 ; 2,5mL Tris-HCl 0,75M ; 50µL SDS 10% ; qsp 5mL H<sub>2</sub>O additionné extemporanément de 60µL APS à 0,1g/mL et de 6µL de TEMED) afin de permettre la migration et la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire.

La migration électrophorétique s'effectue contre un tampon de migration (Tris 0,025M; Glycine 0,192M; SDS 0,1% ; qsp H<sub>2</sub>O) 4h à 50 mA. Le gel est alors séché, placé sur un écran de phosphorimagerie pour être ensuite révélé et analysé au Storm860.

#### **4. Retard en gel (ou EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

Basée sur le retard de migration électrophorétique d'ADN radio-marqué complexé avec une ou des protéine(s) reconnaissant spécifiquement leur séquence cible par rapport à celle de l'oligonucléotide radio-marqué seul, la technique de retard en gel permet de mettre en évidence les interactions protéines/ADN *in vitro*.

500Bq d'oligonucléotides double-brins radiomarqués sont incubés 30 min dans la glace en présence d'1µL de poly(dGdC)<sub>2</sub> (0,66µg/µL, Sigma-Aldrich), 1µL de BSA 1X (10X ; Sigma-Aldrich), 2,4µL de tampon d'interaction 1X (5X: 15mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM KCl, 1,5mM DTT, 1,5 mM EDTA, 6,25mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycérol), 2µL de lysat de réticulocytes ou 5µg d'extraits nucléaires, QSP 12µL d'eau stérile. Les échantillons sont alors séparés sur gel de polyacrylamide 6% non dénaturant (acrylamide/bisacrylamide: 37,5/1 ; TBE 0,5X ; 0,1% APS ; 0,01% TEMED) contre du tampon TBE 0,5X durant 3h30 à 300 V. La spécificité d'interaction du complexe ADN-ligand est évaluée en présence de compétiteur non-marqué spécifique (de séquence identique à celle de l'oligonucléotide radio-marqué) ou non (différente à celle radio-marquée) ajoutée en excès (200X la sonde radio-marquée). La spécificité d'interaction peut aussi être mise en évidence par ajout d'1µL d'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt afin d'observer un super-retard (*super-shift*). L'inhibition de la fixation des protéines d'intérêt est évaluée par ajout des composés DB à des concentrations variables au mélange ADN-lysate protéiques. Les composés DB sont incubés en présence des duplexes d'ADN radiomarqués auxquels 2µL de lysate protéique ou 5µg d'extraits nucléaires sont ajoutés 30 min dans la glace. Une fois la migration achevée, le gel est séché sous vide à 80°C et l'analyse se fait par phosphorimagerie suivie d'une quantification densitométrique avec le logiciel ImageQuant™.

### **F. Etude de l'effet cellulaire des composés**

#### **1. Culture cellulaire**

Les lignées cellulaires utilisées sont regroupées dans le tableau 5. Ces lignées, mises en culture en étuve à 37°C sous atmosphère saturée en humidité et 5% de CO<sub>2</sub>, ont été maintenues en phase exponentielle de croissance par passages successifs selon les modalités suivantes.

Dénomination	Caractéristiques	Mode de culture	Utilisation
HeLa	Carcinome ovarien	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MTS
HT29	Carcinome de colon	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	TRANSFECTION/ MTS
PC3	Carcinome prostatique	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MTS
LNCaP	Carcinome prostatique	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MTS
DU145	Carcinome prostatique	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MTS
VCaP	Carcinome prostatique Fusion TMPRSS2-ERG	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MTS
SK-ES1	Sarcome d'Ewing Fusion EWS-FLI1	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MTS
MHH-ES1	Sarcome d'Ewing Fusion EWS-FLI1	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MTS
CADO-ES1	Sarcome d'Ewing Fusion EWS-ERG	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MTS

Tableau 5: Listes des lignées cellulaires utilisées pour la seconde partie de l'étude concernant le facteur de transcription ERG.

Dénomination	Caractéristiques	Mode de culture	Utilisation
MV4-11	LAM Fusion MLL t(4;11)	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS
EOL-1	LAM Duplication MLL	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS / TEST CLONOGENIQUE
MONO-MAC6	LAM Fusion MLL t(9;11)	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS
THP1	LAM Fusion MLL t(9;11)	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS
SHI-1	LAM Fusion MLL t(6;11)	IMDM + 20% SVF	MTS
NOMO-1	LAM Fusion MLL t(9;11)	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS
U937	LAM Fusion CALM-AF10	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS
OCI-AML3	LAM Surexpression gène <i>RAR</i>	MEM-alpha + 20% SVF	MTS
KG-1	LAM	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS
SKM-1	LAM Fusion E2A/PBX	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 20% SVF	MTS
HL60	LAM	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 20% SVF	MTS
NB4	LAM Fusion PML-RAR1 $\alpha$	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS
Kasumi	LAM Fusion AML1-ETO	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS
ME-1	LAM	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	MTS
K562	LMC Fusion BCR-ABL	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF	TRANSFECTION / MTS
HT29	Carcinome de colon	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MICROSCOPIE / TEST CLONOGENIQUE
A549	Carcinome de poumon	DMEM-glutaMAX + 10% SVF	MICROSCOPIE
MIGA9	Lignée murine transformée par HOXA9	RPMI 1640 GlutaMAX + 10% SVF + 1% filtrat de culture des cellules B16	TEST CLONOGENIQUE
HOXA9	Lignée murine transformée par HOXA9	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF + 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l IL3 + 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l SCF	TEST CLONOGENIQUE
HOXA9/MEIS	Lignée murine transformée par HOXA9/MEIS	RPMI 1640 GlutaMAX-I + 10% SVF + 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l IL3 + 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l SCF	TEST CLONOGENIQUE

Tableau 6: Listes des lignées cellulaires utilisées pour la troisième partie de l'étude concernant le facteur de transcription HOXA9.

## **2. Extractions des protéines totales**

Les sont centrifugées 5 min à 500g pour éliminer le milieu. Le culot cellulaire est lavé dans du PBS (Phosphate Buffered Saline Solution, Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen) et la solution recentrifugée 5 min à 500g. Pour les cellules adhérentes, le tapis cellulaire est lavé par du PBS avant ajout de trypsine-EDTA (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen). Les cellules sont ensuite décollées, centrifugées 5 min à 500g pour éliminer le milieu, lavées dans du PBS et recentrifugées pour éliminer le PBS de lavage. Le culot est alors repris dans 150 µL de tampon de lyse (SDS 1%, Na-vanadate 1mM, Tris-base 10mM; pH 7,4) auxquels sont ajoutés extemporanément des inhibiteurs de protéases (PMSF 0,1mM ; aprotinine 10µg/mL ; leupeptine 5µg/mL). Après 1h à 4°C, le lysat cellulaire est centrifugé 10 min à 13000g et le surnageant protéique est récupéré et conservé à -80°C.

## **3. Dosage protéiques**

La quantité en protéines totales dans les échantillons est déterminée par mesure de l'absorbance à 595 nm à l'aide du kit BIO-RAD protein assay (dosage de BRADFORD; BIO-RAD). La courbe étalon est établie en présence de concentrations établies sérum albumine bovine (BSA, Sigma Aldrich).

## **4. Distribution cellulaire des composés par microscopie de fluorescence**

Les cellules adhérentes HT29 ou A549 sontensemencées la veille à raison de 30000 cellules dans 500µL de milieu (DMEM) par puits. Aux cellules sont ensuite ajoutés 5 µM des différentes molécules d'intérêt avant une incubation à l'étuve 16 heures. Après 2 lavages de 5 min au PBS, les cellules sont fixées sur la lame par ajout de 200µL de paraformaldéhyde 2 % durant 15 minutes. Les cellules sont de nouveau lavées 2 fois 5 min au PBS, puis marquées soit au DiOC<sub>6</sub> (75nM, Molecular Probes, Invitrogen) pendant 15 minutes à température ambiante ou au MitoFluor Red 588 (250nM, Molecular Probes, Invitrogen) durant 30 minutes à 37°C, tous deux étant des marqueurs cytoplasmiques des mitochondries avec des fluorescences différentes. Les cellules sont de nouveau lavées 3 fois 5 min au PBS dans l'obscurité. Après que la lame soit sèche, 8 µL de solution VECTASHIELD<sup>®</sup> (AbCys S.A.) sont déposés sur chaque puits. La lame est ainsi recouverte d'une lamelle. L'observation se fait au microscope à fluorescence ApoTome (Zeiss) avec l'objectif à immersion x63. Le logiciel AxioVision est utilisé pour la capture d'image.

## **5. Expression protéique: Westerm Blotting**

10µg d'extraits protéiques préalablement dénaturés 3 min à 95°C dans un volume équivalent de bleu de migration (Tris-HCl 100mM, pH 7,8, DTT 200mM, SDS 4%, bleu de bromophénol 0,2%, glycérol

20%, qsp H<sub>2</sub>O) sont déposés sur gel de polyacrylamide 10% (**cf. E.3.**). La migration s'effectue 1h30 à 120 V.

Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare). Chacun des éléments (membrane, feuilles de papier Whatman et éponges) sont imbibés de tampon de transfert (Glycine 0,192M ; Tris-base 25mM, pH 8,3 ; SDS 1,3mM ; Méthanol 20%, qsp H<sub>2</sub>O). Le gel récupéré est placé sous la membrane entre deux feuilles de papier Wattman. L'ensemble est encadré de deux éponges. Les électrodes prennent en sandwich cet ensemble. Ainsi disposé, le transfert s'effectue de l'anode (du côté du gel) vers la cathode (du côté de la membrane) dans le tampon de transfert 1h30 à 90V.

La membrane récupérée est saturée 1h dans une solution de TBS-T 0,5% (Tris-HCl 10mM pH 8, NaCl 0,15M ; qsp H<sub>2</sub>O ; Tween 0,5%) contenant 10% de lait en poudre afin de limiter les fixations non spécifiques. La membrane est ensuite incubée 1h en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt diluée dans une solution de TBS-T 0,5% à laquelle est ajoutée 1% de lait en poudre. Trois lavages de 5 min au TBS-T 0,5% sont effectués avant que la membrane ne soit mise en présence d'un anticorps secondaire dilué dans une solution de TBS-T 0,5% à laquelle est ajoutée 1% de lait en poudre. Cet anticorps est conjugué de manière covalente à l'enzyme *Horse Radish Peroxidase* (HRP), ce qui permettra de détecter son activité par une méthode de chimioluminescence et ainsi de localiser la protéine d'intérêt sur la membrane. Finalement, la membrane est lavée deux fois 5 min au TBS-T 0,5% et une fois au TBS. La révélation s'effectue en chambre noire par mise en présence de la membrane séchée avec une solution de révélation de chimioluminescence ECL (GE Healthcare) pendant 1 min. La membrane est alors exposée dans une cassette avec un film photographique pendant 5 à 10 min et révélée par incubation dans différents bains (solutions de révélation, de rinçage puis de fixation). Comme contrôle quantitatif des dépôts protéiques, la révélation de la protéine HSC70 (Heat Shock Cognate 70; Santa Cruz, Biotechnology), exprimée de manière constitutive au sein des cellules, est effectuée en parallèle suivant le même protocole avec des anticorps spécifiques.

## **6. Mesure des effets cytotoxiques des composés**

La cytotoxicité des dérivés DB est mesurée par méthode colorimétrique (CellTiter 96® AqueousOne Solution Cell Proliferation Assay, Promega®) basée sur la réduction du tétrazolium (MTS). Ce dérivé jaune est réduit en formazan pourpre dans les cellules vivantes. La quantité de formazan produite est mesurée par absorption à 492 nm. 15000 cellules/puits sontensemencées en plaques 96 puits. Après 4h d'incubation, des concentrations croissantes en dérivés DB sont ajoutées aux cellules pour 72h. 20µL de solution MTS sont alors ajoutés dans chaque puits. Après incubation 1 à 2 h à 37°C en fonction du type cellulaire, l'absorbance est mesurée au lecteur de plaques Versamax microplate (Molecular Devices). Les données sont analysées sur le logiciel SoftMax Pro permettant de déduire la valeur de l'IC<sub>50</sub>.



## 7. Test de Clonogénicité

Réalisé en milieu semi-solide, ce test permet d'évaluer le potentiel clonogénique de cellules à travers leur capacité de prolifération cellulaire et/ou de différenciation. Adapté à notre étude, l'intérêt de ce test est d'observer le comportement clonogénique de cellules leucémiques par leurs capacités de prolifération et/ou de différenciation en présence des dérivés DB. Le milieu semi-solide utilisé pour les lignées murines est un milieu gélosé complet riche en facteurs de croissance indispensables à la prolifération et la différenciation de progéniteurs murins (kit M3434 MethoCult®, Stem Cell Technologies). Un milieu semi-solide minimal correspondant à un milieu contenant 40% de méthylcellulose complété avec 60% de milieu RPMI – SVF est utilisé pour les lignées humaines (kit M3134 MethoCult®, Stem Cell Technologies).

1000 cellules/mL sontensemencées en plaques 6 puits avec 1mL de milieu semi-solide et 2,5µM de composés DB évalués, puis mises en culture à 37°C en étuve. Au bout de 10 à 12 jours de culture selon les types cellulaires, les puits sont photographiés et les clones dénombrés d'après les critères morphologiques définis précisément par le fournisseur et sous microscope optique (Leica, objectif x50). 4 types de clones ont été dénombrés. D'une part, les CFU-GM (*colony forming unit-granulocytaire et macrophagique*) correspondent à de grandes colonies au centre dense entouré de 2 types cellulaires différenciables par leur taille et leur granulosité. Ces colonies sont issues de précurseurs peu engagés dans l'hématopoïèse et peuvent se différencier en CFU-G (*colony forming unit* de type granulocytaire), colonies de taille moyenne diffusant autour d'un centre clair et peu dense formées de petites cellules granuleuses, ou en CFU-M (*colony forming unit* de type macrophagique), colonies moins bien délimitées formées de grandes cellules peu réfringentes de type macrophagique. Des colonies BFU-E (*burst forming unit* de type érythrocytaire), formées de cellules progénitrices érythroïdes très dispersées sont également parfois identifiées.

## 8. Modulation de l'activité transcriptionnelle

Les techniques de transfections diffèrent selon le modèle cellulaire utilisé.

*Modèle K562* : Les cellules sontensemencées la veille afin d'être en phase exponentielle de croissance. 2mL de milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™-I (Gibco®) sont pré-incubés en plaques 6 puits, à l'étuve (37°C). 2 millions de cellules sont repris dans 100µL de tampon V (solution Nucleofector® LONZA, kit V) auxquels sont ajoutés les différents plasmides décrits dans le tableau 4. La solution obtenue est transférée dans une cuve à électroporation. L'électroporation est réalisée par un électroporateur (programme T-016 pour les cellules K562, recommandé par le fournisseur

LONZA). Avec une pipette stérile, les cellules électroporées sont alors transférées dans le milieu pré-incubé et placées à 37°C durant 48h.

*Modèle HT29* : Les cellules sontensemencées la veille à raison de 150000 cellules/mL/puit en plaque 12 puits dans du milieu complet DMEM + GlutaMAX<sup>TM</sup>-I (Gibco®). Le milieu est alors remplacé par 500µL de milieu appauvri (sans SVF ni antibiotique). La transfection est effectuée par mélange de 3µL de lipofectamine (Lipofectamine2000, Invitrogen), 1,5µg de plasmide reporter contenant l'ADNc du gène *luc* (relatif à l'expression de la luciférase, décrit dans le tableau 4), 0,5µg de pmaxGFP (comme contrôle de transfection, décrit dans le tableau 4) qsp 100µL de milieu OptiMEM (Gibco®) incubé au préalable 20 minutes à température ambiante. Après 6 heures d'incubation des cellules avec le mélange lipofectamine-ADN, le milieu est remplacé par du milieu complet supplémenté ou non par les composés testés aux concentrations indiquées et les cellules sont remises en culture 24h à 37°C sous étuve.

Après 24h (modèle HT29) ou 48h (modèle K562) de culture, les cellules transfectées sont lysées avec un tampon de lyse passive (Lysis Passive Buffer 5X, Promega) 20 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est alors récupéré après centrifugation 15 min à 13000g. Le dosage de l'activité luciférase nécessite l'emploi d'un tampon spécifique comprenant la luciférine (Promega®). Le dosage de l'activité β-galactosidase est réalisé en présence de 200 µL de mélange réactif (4µL de substrat et 196µL de tampon réactionnel du kit Clontech). La luminescence émise et la fluorescence de la GFP ( $\lambda_{excitation} = 485nm$  and  $\lambda_{émission} = 535nm$ ) sont quantifiées au MITHRAS (LB 940 BERTHOLD). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test statistique ANOVA: \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$  et ns, non-spécifique ( $p > 0,05$ ).

## 9. PCR Quantitative en temps réel (Q-RT-PCR)

Ce type de PCR diffère de la PCR classique par apport de données quantitatives. En effet, cette méthode permet de déterminer le taux d'ADN présent dans l'échantillon en comparaison à un contrôle interne ou à un échantillon négatif. La quantification utilise les sondes fluorescentes (sondes Taqman). La quantification nécessite dans un premier temps l'extraction des ARN totaux, la réalisation d'une transcriptase inverse afin de travailler sur l'ADN complémentaire, beaucoup plus stable, et enfin l'amplification de cette ADNc par Q-RT-PCR.

### a. Extraction des ARNs

L'extraction des ARNs est réalisée selon le protocole du Kit Qiagen RNeasy (Qiagen). L'ARN récupéré est alors dosé au NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) et stocké à -80°C.

#### b. Transcriptase Inverse

Dix  $\mu\text{L}$  de mix (2 $\mu\text{L}$  RT Buffer, 0,8 $\mu\text{L}$  à 100mM dNTP mix, 2 $\mu\text{L}$  TR Random Primers, 1 $\mu\text{L}$  MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 $\mu\text{L}$  inhibiteur de RNase, qsp 10 $\mu\text{L}$  d'eau MQ) sont mis en présence de 10 $\mu\text{L}$  d'ARN (correspondant au maximum à 2 $\mu\text{g}$ ). La réaction est réalisée par le thermocycleur (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystem®) qui effectue le programme suivant: 25°C pendant 10 min, 37°C pendant 120 min, 85°C pendant 5 ou 2 min puis maintenue à 4°C.

#### c. Q-RT-PCR

Cette réaction se sert de l'activité 3' exonucléase de l'ADN polymérase AmpliTaq Gold® pour cliver la sonde Taqman. La sonde est marquée à la fois par un fluorochrome émetteur (reporter) à l'extrémité 5' et par un fluorochrome supresseur (quencher) à l'extrémité 3'. Le clivage au cours de la réaction va séparer le reporter du quencher permettant ainsi l'émission d'un signal. La spécificité de réaction est donc apportée à la fois par les amorces et la sonde.

La quantification absolue de HOXA9 se réfère à la gamme de concentration réalisée avec le plasmide pcDNA3-HOXA9 portant la séquence d'intérêt et de concentration connue. 16 $\mu\text{L}$  de mix (10 $\mu\text{L}$  PCR Master Mix Taqman 2X, 0,33 $\mu\text{L}$  amorces 60X (amorces HOXA9: Hs00365956\_m1 ; amorce TBP: Hs99999910\_m1) qsp 16 $\mu\text{L}$  d'eau DNase free) sont mis dans une plaque 96 puits en présence de 4 $\mu\text{L}$  d'eau DNase free pour les contrôles, 4 $\mu\text{L}$  d'ADNc (dilué au 1/20<sup>ème</sup>, 2,5ng/ $\mu\text{L}$ ) pour les échantillons ou 4 $\mu\text{L}$  de pcDNA3-HOXA9 pour la gamme. La PCR est réalisée sur l'appareil StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) selon le protocole de PCR suivant : 40 cycles : 2 min à 50°C, 10min à 95°C, 15s à 95°C et 1 min à 60°C.

# V. BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Wahab, O., Adli, M., LaFave, L.M., Gao, J., Hricik, T., Shih, A.H., Pandey, S., Patel, J.P., Chung, Y.R., Koche, R., Perna, F., Zhao, X., Taylor, J.E., Park, C.Y., Carroll, M., Melnick, A., Nimer, S.D., Jaffe, J.D., Aifantis, I., Bernstein, B.E. and Levine, R.L. (2012) **ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression.** *Cancer Cell.*, **22**, 180-193.
- Ablain, J. and de The, H. (2011) **Revisiting the differentiation paradigm in acute promyelocytic leukemia.** *Blood.*, **117**, 5795-5802.
- Abu-Daya, A., Brown, P.M. and Fox, K.R. (1995) **DNA sequence preferences of several AT-selective minor groove binding ligands.** *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3385-3392.
- Agbe, A. and Yielding, K.L. (1995) **Kinetoplasts play an important role in the drug responses of *Trypanosoma brucei*.** *J. Parasitol.*, **81**, 968-973.
- Ahmed, A. and Daneshtalab, M. (2012) **Nonclassical biological activities of quinolone derivatives.** *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **5**, 52-72.
- Ahuja, H.G., Popplewell, L., Tcheurekdjian, L. and Slovak, M.L. (2001) **NUP98 gene rearrangements and the clonal evolution of chronic myelogenous leukemia.** *Genes Chromosomes Cancer.*, **30**, 410-415.
- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, Keith and Walter, P. (2004) **Biologie moléculaire de la cellule.** Médecine-Science Flammarion, Paris.
- Aleman, B.M., van den Belt-Dusebout, A.W., Klokman, W.J., Van't Veer, M.B., Bartelink, H. and van Leeuwen, F.E. (2003) **Long-term cause-specific mortality of patients treated for Hodgkin's disease.** *J. Clin. Oncol.*, **21**, 3431-3139.
- Allan, J.M. and Travis L.B. (2005) **Mechanisms of therapy-related carcinogenesis.** *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 943-955.
- Álvarez, P., Marchal, J.A., Boulaiz, H., Carrillo, E., Vélez, C., Rodríguez-Serrano, F., Melguizo, C., Prados, J., Madeddu, R. and Aranega, A. (2012) **5-Fluorouracil derivatives: a patent review.** *Expert Opin. Ther. Pat.*, **22**, 107-123.
- Amsellem, S., Pflumio, F., Bardin, D., Izac, B., Charneau, P., Romeo, P.H., Dubart-Kupperschmitt, A. and Fichelson, S. (2003) **Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein.** *Nat. Med.*, **9**, 1423-1427.
- Anderson, M.K., Hernandez-Hoyos, G., Diamond, R.A. and Rothenberg, E.V. (1999) **Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage.** *Development.*, **126**, 3131-3148.
- Andreeff, M., Ruvolo, V., Gadgil, S., Zeng, C., Coombes, K., Chen, W., Kornblau, S., Barón, A.E. and Drabkin, H.A. (2008) **HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML.** *Leukemia.*, **22**, 2041-2047.
- Ansele, J.H., Anbazhagan, M., Brun, R., Easterbrook, J.D., Hall, J.E. and Boykin, D.W. (2004) **O-alkoxyamidine prodrugs of furamidine: in vitro transport and microsomal metabolism as indicators of in vivo efficacy in a mouse model of *Trypanosoma brucei* rhodesiense infection.** *J. Med. Chem.*, **47**, 4335-4338.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G. and Humphries, R.K. (2002) **HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo.** *Cell.*, **109**, 39-45.
- Argiropoulos, B. and Humphries, R.K. (2007) **Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis.** *Oncogene.*, **26**, 6766-6776.
- Armstrong, S.A., Staunton, J.E., Silverman, L.B., Pieters, R., den Boer, M.L., Minden, M.D., Sallan, S.E., Lander, E.S., Golub, T.R. and Korsmeyer, S.J. (2002) **MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia.** *Nat. Genet.*, **30**, 41-47.
- Athri, P. and Wilson, W.D. (2009) **Molecular dynamics of water-mediated interactions of a linear benzimidazole-biphenyl diamidine with the DNA minor groove.** *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 7618-7625.
- Attard, G., Clark, J., Ambrosini, L., Fisher, G., Kovacs, G., Flohr, P., Berney, D., Foster, C.S., Fletcher, A., Gerald, W.L., Moller, H., Reuter, V., De Bono, J.S., Scardino, P., Cuzick, J. and Cooper, C.S. (2008) **Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer.** *Oncogene.*, **27**, 253-263.
- Bailly, C. (2000) **Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs.** *Curr. Med. Chem.*, **7**, 39-58.

- Bailly, C., Dassonneville, L., Carrasco, C., Lucas, D., Kumar, A., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (1999) **Relationships between topoisomerase II inhibition, sequence-specificity and DNA binding mode of dicationic diphenylfuran derivatives.** *Anticancer Drug Des.*, **14**, 47-60.
- Bailly, C., Tardy, C., Wang, L., Armitage, B., Hopkins, K., Kumar, A., Schuster, G.B., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2001) **Recognition of ATGA sequences by the unfused aromatic dication DB293 forming stacked dimers in the DNA minor groove.** *Biochemistry*, **40**, 9770-9779.
- Baldus, C.D., Burmeister, T., Martus, P., Schwartz, S., Gökbüget, N., Bloomfield, C.D., Hoelzer, D., Thiel, E. and Hofmann, W.K. (2006) **High expression of the ETS transcription factor ERG predicts adverse outcome in acute T-lymphoblastic leukemia in adults.** *J. Clin. Oncol.*, **24**, 4714-4720.
- Baldus, C.D., Liyanarachchi, S., Mrózek, K., Auer, H., Tanner, S.M., Guimond, M., Ruppert, A.S., Mohamed, N., Davuluri, R.V., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., de la Chapelle, A. (2004) **Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 3915-3920.
- Bansal, D., Scholl, C., Fröhling, S., McDowell, E., Lee, B.H., Döhner, K., Ernst, P., Davidson, A.J., Daley, G.Q., Zon, L.I., Gilliland, D.G. and Huntly, B.J. (2006) **Cdx4 dysregulates Hox gene expression and generates acute myeloid leukemia alone and in cooperation with Meis1a in a murine model.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 16924-16929.
- Barber, B.A. and Rastegar, M. (2010) **Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease.** *Ann. Anat.*, **192**, 261-274.
- Barber-Rotenberg, J.S., Selvanathan, S.P., Kong, Y., Erkizan, H.V., Snyder, T.M., Hong, S.P., Kobs, C.L., South, N.L., Summer, S., Monroe, P.J., Chruszcz, M., Dobrev, V., Tosso, P.N., Scher, L.J., Minor, W., Brown, M.L., Metallo, S.J., Üren, A. and Toretsky, J.A. (2012) **Single enantiomer of YK-4-279 demonstrates specificity in targeting the oncogene EWS-FLI1.** *Oncotarget.*, **3**, 172-182.
- Baron, B.W., Anastasi, J., Montag, A., Huo, D., Baron, R.M., Karrison, T., Thirman, M.J., Subudhi, S.K., Chin, R.K., Felsher, D.W., Fu, Y.-X., McKeithan, T.W. and Baron, J.M. (2004) **The human BCL6 transgene promotes the development of lymphomas in the mouse.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14198-14203.
- Basso, K. and Dalla-Favera, R. (2012) **Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells.** *Immunol. Rev.*, **247**, 172-183.
- Bei, L., Lu, Y. and Eklund, E.A. (2005) **HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91Phox during myeloid differentiation.** *J. Biol. Chem.*, **280**, 12359-12370.
- Bertosa, B., Aleksić, M., Karminiski-Zamola, G. and Tomić, S. (2010) **QSAR analysis of antitumor active amides and quinolones from thiophene series.** *Int. J. Pharm.*, **394**, 106-114.
- Bijl, J., Kros, J., Lebert-Ghali, C.E., Vacher, J., Mayotte, N. and Sauvageau, G. (2008) **Evidence for Hox and E2A-PBX1 collaboration in mouse T-cell leukemia.** *Oncogene.*, **27**, 6356-6364.
- Bijl, J., Sauvageau, M., Thompson, A. and Sauvageau, G. (2005) **High incidence of proviral integrations in the Hoxa locus in a new model of E2a-PBX1-induced B-cell leukemia.** *Genes Dev.*, **19**, 224-233.
- Birdsey, G.M., Dryden, N.H., Shah, A.V., Hannah, R., Hall, M.D., Haskard, D.O., Parsons, M., Mason, J.C., Zvelebil, M., Gottgens, B., Ridley, A.J. and Randi, A.M. (2012) **The transcription factor Erg regulates expression of histone deacetylase 6 and multiple pathways involved in endothelial cell migration and angiogenesis.** *Blood.*, **119**, 894-903.
- Björkman, M., Iljin, K., Halonen, P., Sara, H., Kaivanto, E., Nees, M. and Kallioniemi, O.P. (2008) **Defining the molecular action of HDAC inhibitors and synergism with androgen deprivation in ERG-positive prostate cancer.** *Int. J. Cancer.*, **123**, 2774-2781.
- Björnsson, J.M., Larsson, N., Brun, A.C., Magnusson, M., Andersson, E., Lundström, P., Larsson, J., Repetowska, E., Ehinger, M., Humphries, R.K. and Karlsson S. (2003) **Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in Hoxb3 and Hoxb4.** *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 3872-3883.
- Blackburn, G.M., Gait, M.J., Loakes, D. and Williams, D. **Nucleic acids in chemistry and biology.** [texte imprimé] 3<sup>rd</sup> ed. Royal Society of Chemistry, 361.
- Borrow, J., Shearman, A.M., Stanton, V.P. Jr., Becher, R., Collins, T., Williams, A.J., Dubé, I., Katz, F., Kwong, Y.L., Morris, C., Ohyashiki, K., Toyama, K., Rowley, J. and Housman, D.E. (1996) **The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9.** *Nat. Genet.*, **12**, 159-167.

- Boulukos, K.E., Pognonec, P., Begue, A., Galibert, F., Gesquière, J.C., Stéhelin, D. and Ghysdael, J. (1988) **Identification in chickens of an evolutionarily conserved cellular ets-2 gene (c-ets-2) encoding nuclear proteins related to the products of the c-ets proto-oncogene.** *EMBO J.*, **7**, 697-705.
- Bouteille, B., Oukem, O., Bisser, S. and Dumas, M. (2003) **Treatment perspectives for human African trypanosomiasis.** *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **17**, 171-181.
- Boykin, D.W., Kumar, A., Xiao, G., Wilson, W.D., Bender, B.C., McCurdy, D.R., Hall, J.E. and Tidwell, R.R. (1998) **2,5-bis[4-(N-alkylamidino)phenyl]furans as anti-Pneumocystis carinii agents.** *J. Med. Chem.*, **41**, 124-129.
- Bracarda, S., de Cobelli, O., Greco, C., Prayer-Galetti, T., Valdagni, R., Gatta, G., de Braud, F. and Bartsch, G. (2005) **Cancer of the prostate.** *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **56**, 379-396.
- Bray, P.G., Barrett, M.P., Ward, S.A. and de Koning H.P. (2003) **Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future.** *Trends Parasitol.*, **19**, 232-239.
- Breitinger, C., Maethner, E., Garcia-Cuellar, M.P. and Slany, R.K. (2012) **The homeodomain region controls the phenotype of HOX-induced murine leukemia.** *Blood.*, **120**, 4018-4027.
- Bremer, R.E., Baird, E.E. and Dervan, P.B. (1998) **Inhibition of major-groove-binding proteins by pyrrole-imidazole polyamides with an Arg-Pro-Arg positive patch.** *Chem. Biol.*, **5**, 119-133.
- Bromleigh, V.C. and Freedman, L.P. (2000) **p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells.** *Genes Dev.*, **14**, 2581-2586.
- Brown, D.G., Sanderson, M.R., Skelly, J.V., Jenkins, T.C., Brown, T., Garman, E., Stuart, D.I. and Neidle, S. (1990) **Crystal structure of a berenil-dodecanucleotide complex: the role of water in sequence-specific ligand binding.** *EMBO J.*, **9**, 1329-1334.
- Brown, P., McIntyre, E., Rau, R., Meshinchi, S., Lacayo, N., Dahl, G., Alonzo, T.A., Chang, M., Arceci, R.J. and Small, D. (2007) **The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML.** *Blood.*, **110**, 979-985.
- Bruhl, T., Urbich, C., Aicher, D., Acker-Palmer, A., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2004) **Homeobox A9 transcriptionally regulates the EphB4 receptor to modulate endothelial cell migration and tube formation.** *Circ. Res.*, **94**, 743-751.
- Buccisano, F., Maurillo, L., Del Principe, M.I., Del Poeta, G., Sconocchia, G., Lo-Coco, F., Arcese, W., Amadori, S. and Venditti, A. (2012) **Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia.** *Blood.*, **119**, 332-341.
- Buchwalter, G., Gross, C. and Wasyluk, B. (2004) **Ets ternary complex transcription factors.** *Gene.*, **324**, 1-14.
- Bullinger, L., Döhner, K., Bair, E., Fröhling, S., Schlenk, R.F., Tibshirani, R., Döhner, H. and Pollack, J.R. (2004) **Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia.** *N. Engl. J. Med.*, **350**, 1605-1616.
- Caligiuri, M.A., Schichman, S.A., Strout, M.P., Mrózek, K., Baer, M.R., Frankel, S.R., Barcos, M., Herzig, G.P., Croce, C.M. and Bloomfield C.D. (2004) **Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations.** *Cancer Res.*, **54**, 370-373.
- Calvo, K.R., Sykes, D.B., Pasillas, M.P. and Kamps, M.P. (2002) **Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1.** *Oncogene.*, **21**, 4247-4256.
- Camós, M., Esteve, J., Jares, P., Colomer, D., Rozman, M., Villamor, N., Costa, D., Carrió, A., Nomdedéu, J., Monserrat, E. and Campo, E. (2006) **Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression.** *Cancer Res.*, **66**, 6947-6954.
- Cao, R., Wang, H., He, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2008) **Role of hPHF1 in H3K27 methylation and Hox gene silencing.** *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 1862-1872.
- Capelson, M., Liang, Y., Schulte, R., Mair, W., Wagner, U. and Hetzer, M.W. (2010) **Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes.** *Cell.*, **140**, 372-383.

- Carmichael, C.L., Metcalf, D., Henley, K.J., Kruse, E.A., Di Rago, L., Mifsud, S., Alexander, W.S. and Kile, B.T. (2012) **Hematopoietic overexpression of the transcription factor Erg induces lymphoid and erythro-megakaryocytic leukemia.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 15437-15442.
- Carter, N.S., Berger, B.J. and Fairlamb, A.H. (1995) **Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant Trypanosoma brucei brucei.** *J. Biol. Chem.*, **270**, 28153-28157.
- Carver, B.S., Tran, J., Gopalan, A., Chen, Z., Shaikh, S., Carracedo, A., Alimonti, A., Nardella, C., Varmeh, S., Scardino, P.T., Cordon-Cardo, C., Gerald, W., Pandolfi, P.P. (2009) **Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate.** *Nat. Genet.*, **41**, 619-624.
- Casey, O.M., Fang, L., Hynes, P.G., Abou-Kheir, W.G., Martin, P.L., Tillman, H.S., Petrovics, G., Awwad, H.O., Ward, Y., Lake, R., Zhang, L. and Kelly, K. (2012) **TMPRSS2- driven ERG expression in vivo increases self-renewal and maintains expression in a castration resistant subpopulation.** *PLoS One.*, **7**, e41668.
- Chabner, B.A. and Roberts, T.G. Jr. (2005) **Chemotherapy and the war on cancer.** *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 65-72.
- Chakrabarti, S.R., Sood, R., Nandi, S. and Nucifora, G. (2000) **Post-translational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 13281-13285.
- Champoux, J.J. (2001) **DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism.** *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 369-413.
- Chapman, M.A., Lawrence, M.S., Keats, J.J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A.C., Harview, C.L., Brunet, J.P., Ahmann, G.J., Adli, M., Anderson, K.C., Ardlie, K.G., Auclair, D., Baker, A., Bergsagel, P.L., Bernstein, B.E., Drier, Y., Fonseca, R., Gabriel, S.B., Hofmeister, C.C., Jagannath, S., Jakubowiak, A.J., Krishnan, A., Levy, J., Liefeld, T., Lonial, S., Mahan, S., Mfuko, B., Monti, S., Perkins, L.M., Onofrio, R., Pugh, T.J., Rajkumar, S.V., Ramos, A.H., Siegel, D.S., Sivachenko, A., Stewart, A.K., Trudel, S., Vij, R., Voet, D., Winckler, W., Zimmerman, T., Carpten, J., Trent, J., Hahn, W.C., Garraway, L.A., Meyerson, M., Lander, E.S., Getz, G. and Golub, T.R. (2011) **Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma.** *Nature.*, **471**, 467-472.
- Chen, F. and Capecchi, M.R. (1997) **Targeted mutations in hoxa-9 and hoxb-9 reveal synergistic interactions.** *Dev. Biol.*, **181**, 186-196.
- Chen, F. and Capecchi, M.R. (1999) **Paralogous mouse Hox genes, Hoxa9, Hoxb9, and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 541-546.
- Chen, K.N., Gu, Z.D., Ke, Y., Li, J.Y., Shi, X.T. and Xu, G.W. (2005) **Expression of 11 HOX genes is deregulated in esophageal squamous cell carcinoma.** *Clin. Cancer Res.*, **11**, 1044-1049.
- Chen, L., Deshpande, A.J., Banka, D., Bernt, K.M., Dias, S., Buske, C., Olhava, E.J., Daigle, S.R., Richon, V.M., Pollock, R.M. and Armstrong, S.A. (2012) **Abrogation of MLL-AF10 and CALM-AF10-mediated transformation through genetic inactivation or pharmacological inhibition of the H3K79 methyltransferase Dot1l.** *Leukemia.*, [Epub ahead of print].
- Chen, W., Li, Q., Hudson, W.A., Kumar, A., Kirchhof, N. and Kersey, J.H. (2006) **A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy.** *Blood.*, **108**, 669-677.
- Chng, K.R., Chang, C.W., Tan, S.K., Yang, C., Hong, S.Z., Sng, N.Y. and Cheung, E. (2012) **A transcriptional repressor co-regulatory network governing androgen response in prostate cancers.** *EMBO J.*, **31**, 2810-2823.
- Choi, H.W., Shin, M.G., Sawyer, J.R., Cho, D., Kee, S.J., Baek, H.J., Kook, H., Kim, H.J., Shin, J.H., Suh, S.P., Hwang, T.J. and Ryang, D.W. (2006) **Unusual type of TLS/FUS-ERG chimeric transcript in a pediatric acute myelocytic leukemia with 47,XX,110,t(16;21)(p11;q22).** *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **167**, 172-176.
- Chou, W.C., Chen, C.Y., Hou, H.A., Lin, L.I., Tang, J.L., Yao, M., Tsay, W., Ko, B.S., Wu, S.J., Huang, S.Y., Hsu, S.C., Chen, Y.C., Huang, Y.N., Tseng, M.H., Huang, C.F. and Tien, H.F. (2009) **Acute myeloid**



- leukemia bearing t(7;11)(p15;p15) is a distinct cytogenetic entity with poor outcome and a distinct mutation profile: comparative analysis of 493 adult patients.** *Leukemia.*, **23**, 1303-1310.
- Codrington, R., Pannell, R., Forster, A., Drynan, L.F., Daser, A., Lobato, N., Metzler, M. and Rabbitts, T.H. (2005) **The Ews-ERG fusion protein can initiate neoplasia from lineage-committed haematopoietic cells.** *PLoS Biol.*, **3**, e242.
- Cornell, R.F. and Palmer, J. (2012) **Adult acute leukemia.** *Dis. Mon.*, **58**, 219-238.
- Corral, J., Lavenir, I., Impey, H., Warren, A.J., Forster, A., Larson, T.A., Bell, S., McKenzie, A.N., King, G. and Rabbitts, T.H. (1996) **An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes.** *Cell.*, **85**, 853-861.
- Cory, M., Tidwell, R.R. and Fairley, T.A. **Structure and DNA binding activity of analogues of 1,5-bis(4-amidinophenoxy)pentane (pentamidine).** *J. Med. Chem.*, **35**, 431-438.
- Costa, B.M., Smith, J.S., Chen, Y., Chen, J., Phillips, H.S., Aldape, K.D., Zardo, G., Nigro, J., James, C.D., Fridlyand, J., Reis, R.M. and Costello, J.F. (2010) **Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma.** *Cancer Res.*, **70**, 453-462.
- Covey, J.M., Kohn, K.W., Kerrigan, D., Tilchen, E.J. and Pommier, Y. (1988) **Topoisomerase II-mediated DNA damage produced by 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide and related acridines in L1210 cells and isolated nuclei: relation to cytotoxicity.** *Cancer Res.*, **48**, 860-865.
- Cowell, I.G. and Austin, C.A. (2012) **Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents.** *Int. J. Environ Res. Public Health.*, **9**, 2075-2091.
- Cowley, D.O. and Graves, B.J. (2000) **Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition.** *Genes Dev.*, **14**, 366-376.
- Cuevas, C. and Francesch, A. (2009) **Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem.** *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 322-337.
- Cui, K., Zang, C., Roh, T.Y., Schones, D.E., Childs, R.W., Peng, W. and Zhao, K. (2009) **Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation.** *Cell Stem Cell.*, **4**, 80-93.
- Daigle, S.R., Olhava, E.J., Therkelsen, C.A., Majer, C.R., Sneeringer, C.J., Song, J., Johnston, L.D., Scott, M.P., Smith, J.J., Xiao, Y., Jin, L., Kuntz, K.W., Chesworth, R., Moyer, M.P., Bernt, K.M., Tseng, J.C., Kung, A.L., Armstrong, S.A., Copeland, R.A., Richon, V.M. and Pollock, R.M. (2011) **Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor.** *Cancer Cell.*, **20**, 53-65.
- Daniels, T.R., Neacato, I.I., Rodríguez, J.A., Pandha, H.S., Morgan, R. and Penichet, M.L. (2010) **Disruption of HOX activity leads to cell death that can be enhanced by the interference of iron uptake in malignant B cells.** *Leukemia.*, **24**, 1555-1565.
- Dassé, E., Volpe, G., Walton, D.S., Wilson, N., Del Pozzo, W., O'Neill, L.P., Slany, R.K., Frampton, J. and Dumon, S. (2012) **Distinct regulation of c-myb gene expression by HoxA9, Meis1 and Pbx proteins in normal hematopoietic progenitors and transformed myeloid cells.** *Blood Cancer J.*, **2**, e76.
- David-Cordonnier, M.H., Gajate, C., Olmea, O., Laine, W., de la Iglesia-Vicente, J., Perez, C., Cuevas, C., Otero, G., Manzanares, I., Bailly, C. and Mollinedo, F. (2005) **DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin.** *Chem. Biol.*, **12**, 1201-1210.
- De Koning, H.P. and Jarvis, S.M. (2001) **Uptake of pentamidine in Trypanosoma brucei brucei is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter.** *Acta Trop.*, **80**, 245-250.
- De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B. and Nelson, W.G. (2007) **Inflammation in prostate carcinogenesis.** *Nat. Rev. Cancer.*, **7**, 256-269.
- Demichelis, F., Fall, K., Perner, S., Andrés, O., Schmidt, F., Setlur, S.R., Hoshida, Y., Mosquera, J.M., Pawitan, Y., Lee, C., Adami, H.O., Mucci, L.A., Kantoff, P.W., Andersson, S.O., Chinnaiyan, A.M., Johansson, J.E. and Rubin, M.A. (2007) **TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort.** *Oncogene.*, **26**, 4596-4599.
- Dervan, P.B. (1986) **Design of sequence-specific DNA-binding molecules.** *Science*, **232**, 464-471.
- Dervan, P.B. and Edelson, B.S. (2003) **Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 284-299.

- Dervan, P.B., Doss, R.M. and Marques, M.A. (2005) **Programmable DNA binding oligomers for control of transcription.** *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.*, **5**, 373-387.
- DeVita, V.T. Jr. and Chu, E. (2008) **A history of cancer chemotherapy.** *Cancer Res.*, **68**, 8643-8653.
- Dhordain, P., Dewitte, F., Desbiens, X., Stehelin, D. and Duterque-Coquillaud, M. (1995) **Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation.** *Mech. Dev.*, **50**, 17-28.
- Di Pietro, M., Lao-Sirieix, P., Boyle, S., Cassidy, A., Castillo, D., Saadi, A., Eskeland, R. and Fitzgerald, R.C. (2012) **Evidence for a functional role of epigenetically regulated midcluster HOXB genes in the development of Barrett esophagus.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 9077-9082.
- Dik, W.A., Brahim, W., Braun, C., Asnafi, V., Dastugue, N., Bernard, O.A., van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Macintyre, E.A. and Delabesse, E. (2005) **CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMI1 oncogenes.** *Leukemia.*, **19**, 1948-1957.
- D'Incalci, M. and Galmarini, C.M. (2010) **A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action.** *Mol. Cancer Ther.*, **9**, 2157-2163.
- Dintilhac, A., Bihan, R., Guerrier, D., Deschamps, S. and Pellerin I. (2004) **A conserved non-homeodomain Hoxa9 isoform interacting with CBP is co-expressed with the 'typical' Hoxa9 protein during embryogenesis.** *Gene Expr. Patterns.*, **4**, 215-222.
- Dixit, S.B., Mezei, M. and Beveridge, D.L. (2012) **Studies of base pair sequence effects on DNA solvation based on all-atom molecular dynamics simulations.** *J. Biosci.*, **37**, 399-3421.
- Dobson, C.L., Warren, A.J., Pannell, R., Forster, A., Lavenir, I., Corral, J., Smith, A.J. and Rabbitts, T.H. (1999) **The *mll-AF9* gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis.** *EMBO J.*, **18**, 3564-3574.
- Dohjima, T., Lee, N.S, Li, H., Ohno, T. and Rossi, J.J. (2003) **Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/Fli-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line.** *Mol. Ther.*, **7**, 811-816.
- Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D.; European LeukemiaNet. (2010) **Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.** *Blood.*, **115**, 453-4574.
- Döhner, K., Tobis, K., Ulrich, R., Fröhling, S., Benner, A., Schlenk, R.F. and Döhner, H. (2002) **Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm.** *J. Clin. Oncol.*, **20**, 3254-3561.
- Dorrance, A.M., Liu, S., Yuan, W., Becknell, B., Arnoczky, K.J., Guimond, M., Strout, M.P., Feng, L., Nakamura, T., Yu, L., Rush, L.J., Weinstein, M., Leone, G., Wu, L., Ferketich, A., Whitman, S.P., Marcucci, G., and Caligiuri, M.A. (2006) **Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations.** *J. Clin. Invest.*, **116**, 2707-2716.
- Dostie, J. and Bickmore, W.A. (2012) **Chromosome organization in the nucleus - charting new territory across the Hi-Cs.** *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **22**, 125-131.
- Dou, Y., Milne, T.A., Tackett, A.J., Smith, E.R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C.D., Chait, B.T., Hess, J.L. and Roeder, R.G. (2005) **Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF.** *Cell.*, **121**, 873-885.
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. and Dick, J.E. (2012) **Hematopoiesis: a human perspective.** *Cell. Stem. Cell.*, **10**, 120-136.
- Draganescu, A., Levin, J.R. and Tullius, T.D. (1995) **Homeodomain proteins: what governs their ability to recognize specific DNA sequences?** *J. Mol. Biol.*, **250**, 595-608.
- Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B.L., Ghabrilove, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J.J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J.L., Radich, J.P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L. and Larson, R.A. (2006) **Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.** *N. Engl. J. Med.*, **355**, 2408-2417.

- Dryden, N.H., Sperone, A., Martin-Almedina, S., Hannah, R.L., Birdsey, G.M., Khan, S.T., Layhadi, J.A., Mason, J.C., Haskard, D.O., Göttgens, B. and Randi, A.M. (2012) **The transcription factor Erg controls endothelial cell quiescence by repressing activity of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B p65.** *J. Biol. Chem.*, **287**, 12331-12342.
- Durston, A.J., Jansen, H.J., In der Rieden, P. and Hooiveld, M.H. (2011) **Hox collinearity - a new perspective.** *Int. J. Dev. Biol.*, **55**, 899-908.
- Duterque-Coquillaud, M., Niel, C., Plaza, S. and Stehelin, D. (1993) **New human erg isoforms generated by alternative splicing are transcriptional activators.** *Oncogene.*, **8**, 1865-1873.
- Dykstra, C.C., McClernon, D.R., Elwell, L.P. and Tidwell, R.R. (1994) **Selective inhibition of topoisomerases from *Pneumocystis carinii* compared with that of topoisomerases from mammalian cells.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1890-1898.
- Edwards, K.J., Jenkins, T.C. and Neidle, S. **Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties.** *Biochemistry*, **31**, 7104-7109.
- Eklund, E.A. (2007) **The role of HOX genes in malignant myeloid disease.** *Curr. Opin. Hematol.*, **14**, 85-89.
- Eklund, E.A., Jalava, A. and Kakar, R. (2000) **Tyrosine phosphorylation of HoxA10 decreases DNA binding and transcriptional repression during interferon gamma -induced differentiation of myeloid leukemia cell lines.** *J. Biol. Chem.*, **275**, 20117-20126.
- Ellison, R.R., Carey, R.W. and Holland, J.F. (1967) **Continuous infusions of arabinosyl cytosine in patients with neoplastic disease.** *Clin. Pharmacol. Ther.*, **8**, 800-809.
- Erfurth, F.E., Popovic, R., Grembecka, J., Cierpicki, T., Theisler, C., Xia, Z.B., Stuart, T., Diaz, M.O., Bushweller, J.H. and Zeleznik-Le, N.J. (2008) **MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 7517-7522.
- Erkizan, H.V., Kong, Y., Merchant, M., Schlottmann, S., Barber-Rotenberg, J.S., Yuan, L., Abaan, O.D., Chou, T.H., Dakshnamurthy, S., Brown, M.L., Uren, A. and Toretsky, J.A. (2009) **A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma.** *Nat. Med.*, **15**, 750-756.
- Erkizan, H.V., Scher, L.J., Gamble, S.E., Barber-Rotenberg, J.S., Sajwan, K.P., Üren, A. and Toretsky, J.A. (2011) **Novel peptide binds EWS-FLI1 and reduces the oncogenic potential in Ewing tumors.** *Cell Cycle.*, **10**, 3397-3408.
- Ezoe, S. (2012) **Secondary Leukemia Associated with the Anti-Cancer Agent, Etoposide, a Topoisomerase II Inhibitor.** *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, **9**, 2444-2453.
- Faber, J., Krivtsov, A.V., Stubbs, M.C., Wright, R., Davis, T.N., van den Heuvel-Eibrink, M., Zwaan, C.M., Kung, A.L. and Armstrong, S.A. (2009) **HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias.** *Blood.*, **113**, 2375-2385.
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., Bigerna, B., Pacini, R., Pucciarini, A., Liso, A., Vignetti, M., Fazi, P., Meani, N., Pettrossi, V., Saglio, G., Mandelli, F., Lo-Coco, F., Pelicci, P.G., Martelli, M.F.; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. (2005) **Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype.** *N. Engl. J. Med.*, **352**, 254-266.
- Farber, S., Diamond, L.K., Mercer, R.D., Sylvester, R.F. Jr. and Wolff, J.A. (1948) **Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid.** *N. Engl. J. Med.*, **238**, 787-793.
- Ferraiuolo, M.A., Rousseau, M., Miyamoto, C., Shenker, S., Wang, X.Q., Nadler, M., Blanchette, M. and Dostie, J. (2010) **The three-dimensional architecture of Hox cluster silencing.** *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7472-7484.
- Ferrando, A.A., Armstrong, S.A., Neuberg, D.S., Sallan, S.E., Silverman, L.B., Korsmeyer, S.J. and Look, A.T. (2003) **Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation.** *Blood.*, **102**, 262-268.
- Fischbach, N.A., Rozenfeld, S., Shen, W., Fong, S., Chrobak, D., Ginzinger, D., Kogan, S.C., Radhakrishnan, A., Le Beau, M.M., Largman, C. and Lawrence, H.J. (2005) **HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo.** *Blood.*, **105**, 1456-1466.

- Forni, C., Minuzzo, M., Viridis, E., Tamborini, E., Simone, M., Tavecchio, M., Erba, E., Grosso, F., Gronchi, A., Aman, P., Casali, P., D'Incalci, M., Pilotti, S. and Mantovani, R. (2009) **Trabectedin (ET-743) promotes differentiation in myxoid liposarcoma tumors.** *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 449-457.
- Foronda, D., de Navas, L.F., Garaulet, D.L. and Sánchez-Herrero, E. (2009) **Function and specificity of Hox genes.** *Int. J. Dev. Biol.*, **53**, 1404-1419.
- Fortson, W.S., Kayarthodi, S., Fujimura, Y., Xu, H., Matthews, R., Grizzle, W.E., Rao, V.N., Bhat, G.K. and Reddy, E.S. (2011) **Histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin-A induce apoptosis and affect acetylation status of p53 in ERG-positive prostate cancer cells.** *Int. J. Oncol.*, **39**, 111-119.
- Fraser, J., Rousseau, M., Shenker, S., Ferraiuolo, M.A., Hayashizaki, Y., Blanchette, M. and Dostie, J. (2009) **Chromatin conformation signatures of cellular differentiation.** *Genome Biol.*, **10**, R37.1-18.
- Fromental-Ramain, C., Warot, X., Lakkaraju, S., Favier, B., Haack, H., Birling, C., Dierich, A., Dollé, P. and Chambon, P. (1996) **Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning.** *Development.*, **122**, 461-472.
- Fujimoto, S., Araki, K., Chisaka, O., Araki, M., Takagi, K. and Yamamura K. (1998) **Analysis of the murine Hoxa-9 cDNA: an alternatively spliced transcript encodes a truncated protein lacking the homeodomain.** *Gene.*, **209**, 77-85.
- Furth, J.J. and Cohen, S.S. (1968) **Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9-beta-d-arabinofuranoxyladenine.** *Cancer Res.*, **28**, 2061-2067.
- Gale, R.P. and Bennett, J.M. (2009) **Are myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia one disease?** *Leuk. Res.*, **33**, 351-354.
- Galea, A.M. and Murray, V. (2002) **The interaction of cisplatin and analogues with DNA in reconstituted chromatin.** *Biochim. Biophys. Acta.* **1579**, 142-152.
- Ghannam, G., Takeda, A., Camarata, T., Moore, M.A., Viale, A. and Yaseen, N.R. (2004) **The Oncogene Nup98-HOXA9 Induces Gene Transcription in Myeloid Cells.** *J. Biol. Chem.*, **279**, 866-875.
- Giampaolo, A., Felli, N., Diverio, D., Morsilli, O., Samoggia, P., Breccia, M., Lo Coco, F., Peschle, C. and Testa, U. (2002) **Expression pattern of HOXB6 homeobox gene in myelomonocytic differentiation and acute myeloid leukemia.** *Leukemia.*, **16**, 1293-1301.
- Giampaolo, A., Sterpetti, P., Bulgarini, D., Samoggia, P., Pelosi, E., Valtieri, M. and Peschle, C. (1994) **Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation.** *Blood.*, **84**, 3637-3647.
- Gilbert, P.M., Mouw, J.K., Unger, M.A., Lakins, J.N., Gbegnon, M.K., Clemmer, V.B., Benezra, M., Licht, J.D., Boudreau, N.J., Tsai, K.K., Welm, A.L., Feldman, M.D., Weber, B.L. and Weaver, V.M. (2010) **HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype.** *J. Clin. Invest.*, **120**, 1535-1550.
- Gilman, A. (1963) **The initial clinical trial of nitrogen mustard.** *Am. J. Surg.* **105**, 574-578.
- Ginsberg, J.P., de Alava E., Ladanyi, M., Wexler, L.H., Kovar, H., Paulussen, M., Zoubek, A., Dockhorn-Dworniczak, B., Juergens, H., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., Malik, R., Sorensen, P.H., Womer, R.B. and Barr, F.G. (1999) **EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma.** *J. Clin. Oncol.*, **17**, 1809-1814.
- Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D. and Lander, E.S. (1999) **Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring.** *Science.*, **286**, 531-537.
- Gorlick, R., Goker, E., Trippett, T., Waltham, M., Banerjee, D. and Bertino, J.R. (1996) **Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia.** *N. Engl. J. Med.*, **335**, 1041-1048.
- Gottesfeld, J.M., Neely, L., Trauger, J.W., Baird, E.E. and Dervan, P.B. (1997) **Regulation of gene expression by small molecules.** *Nature.*, **387**, 202-205.
- Gough, S.M., Slape, C.I. and Aplan, P.D. (2011) **NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights.** *Blood.*, **118**, 6247-6257.
- Green, S.M., Coyne, H.J. 3rd, McIntosh, L.P. and Graves, B.J. (2010) **DNA binding by the ETS protein TEL (ETV6) is regulated by autoinhibition and self-association.** *J. Biol. Chem.*, **285**, 18496-18504.

- Grembecka J, He S, Shi A, Purohit T, Muntean AG, Sorenson RJ, Showalter HD, Murai MJ, Belcher AM, Hartley T, Hess JL, Cierpicki T. (2012) **Menin-MLL inhibitors reverse oncogenic activity of MLL fusion proteins in leukemia.** *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 277-284.
- Grier, H.E., Krailo, M.D., Tarbell, N.J., Link, M.P., Fryer, C.J., Pritchard, D.J., Gebhardt, M.C., Dickman, P.S., Perlman, E.J., Meyers, P.A., Donaldson, S.S., Moore, S., Rausen, A.R., Vietti, T.J. and Miser, J.S. (2003) **Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone.** *N. Engl. J. Med.*, **348**, 694-701.
- Griffis, E.R., Altan, N., Lippincott-Schwartz, J. and Powers, M.A. (2002) **Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics.** *Mol. Biol. Cell.*, **13**, 1282-1297.
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A. and Goldstone, A. (1998) **The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties.** *Blood.*, **92**, 2322-2333.
- Grohar, P.J., Griffin, L.B., Yeung, C., Chen, Q.R., Pommier, Y., Khanna, C., Khan, J. and Helman, L.J. (2011a) **Ecteinascidin 743 interferes with the activity of EWS-FLI1 in Ewing sarcoma cells.** *Neoplasia.*, **13**, 145-153.
- Grohar, P.J., Woldemichael, G.M., Griffin, L.B., Mendoza, A., Chen, Q.R., Yeung, C., Currier, D.G., Davis, S., Khanna, C., Khan, J., McMahon, J.B. and Helman, L.J. (2011b) **Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening.** *J. Natl. Cancer Inst.*, **103**, 962-978.
- Guil, S. and Esteller, M. (2012) **Cis-acting noncoding RNAs: friends and foes.** *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1068-1075.
- Gunther, C.V., Nye, J.A., Bryner, R.S. and Graves, B.J. (1990) **Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ets-1 defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus.** *Genes Dev.*, **4**, 667-679.
- Guo, B. and Sharrocks, A.D. (2009) **Extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase signaling initiates a dynamic interplay between sumoylation and ubiquitination to regulate the activity of the transcriptional activator PEA3.** *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 3204-3218.
- Guo, B., Panagiotaki, N., Warwood, S. and Sharrocks, A.D. (2011) **Dynamic modification of the ETS transcription factor PEA3 by sumoylation and p300-mediated acetylation.** *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6403-6413.
- Gwin, K., Dolence, J.J., Shapiro, M.B. and Medina, K.L. (2013) **Differential requirement for Hoxa9 in the development and differentiation of B, NK, and DC-lineage cells from Flt3+ multipotential progenitors.** *BMC Immunol.*, **14**, 5-13.
- Gwin, K., Frank, E., Bossou, A. and Medina, K.L. (2010) **Hoxa9 regulates Flt3 in lymphohematopoietic progenitors.** *J. Immunol.*, **185**, 6572-6583.
- Hampshire, A.J. and Fox, K.R. (2008) **The effects of local DNA sequence on the interaction of ligands with their preferred binding sites.** *Biochimie.*, **90**, 988-998.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, **144**, 646-674.
- Harrill, A.H., Desmet, K.D., Wolf, K.K., Bridges, A.S., Eaddy, J.S., Kurtz, C.L., Hall, J.E., Paine, M.F., Tidwell, R.R. and Watkins, P.B. (2012) **A Mouse Diversity Panel Approach Reveals the Potential for Clinical Kidney Injury Due to DB289 Not Predicted by Classical Rodent Models.** *Toxicol Sci.*, **130**, 416-426.
- Hatano, Y., Miura, I., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Takahashi, N. and Miura, A.B. (1999) **Molecular heterogeneity of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in myelodysplastic syndromes associated with t(7;11)(p15;p15).** *Br. J. Haematol.*, **107**, 600-604.
- He, L.Z., Tribioli, C., Rivi, R., Peruzzi, D., Pelicci, P.G., Soares, V., Cattoretti, G. and Pandolfi, P.P. (1997) **Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 5302-5307.
- He, M., Chen, P., Arnovitz, S., Li, Y., Huang, H., Neilly, M.B., Wei, M., Rowley, J.D., Chen, J. and Li Z. (2012) **Two isoforms of HOXA9 function differently but work synergistically in human MLL-rearranged leukemia.** *Blood Cells Mol. Dis.*, **49**, 102-106.

- Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E. and Scheiner, J. (1957) **Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds.** *Nature.*, **179**, 663-666.
- Herrero, A.B., Martín-Castellanos, C., Marco, E., Gago, F. and Moreno, S. (2006) **Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin.** *Cancer Res.*, **66**, 8155-8162.
- Hess, J.L., Bittner, C.B., Zeisig, D.T., Bach, C., Fuchs, U., Borkhardt, A., Frampton, J. and Slany, R.K. (2006) **c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells.** *Blood.*, **108**, 297-304.
- Hewett, P.W., Nishi, K., Daft, E.L. and Clifford Murray J. (2001) **Selective expression of erg isoforms in human endothelial cells.** *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **33**, 347-355.
- Hollenhorst, P.C., Jones, D.A. and Graves, B.J. (2004) **Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors.** *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5693-5702.
- Hollenhorst, P.C., McIntosh, L.P. and Graves, B.J. (2011) **Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors.** *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 437-471.
- Hollenhorst, P.C., Shah, A.A., Hopkins, C. and Graves, B.J. (2007) **Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family.** *Genes Dev.*, **21**, 1882-1894.
- Hombria, J.C. and Lovegrove, B. (2003) **Beyond homeosis: HOX function in morphogenesis and organogenesis.** *Differentiation.*, **71**, 461-476.
- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F. (1985) **Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I.** *J. Biol. Chem.*, **260**, 148731-148738.
- Hu, Y.L., Fong, S., Ferrell, C., Largman, C. and Shen, W.F. (2009) **HOXA9 modulates its oncogenic partner Meis1 to influence normal hematopoiesis.** *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 5181-5192.
- Hu, Y.L., Passegué, E., Fong, S., Largman, C. and Lawrence H.J. (2007) **Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9.** *Blood.*, **109**, 4732-4738.
- Huang, Y., Sitwala, K., Bronstein, J., Sanders, D., Dandekar, M., Collins, C., Robertson, G., MacDonald, J., Cezard, T., Bilenky, M., Thiessen, N., Zhao, Y., Zeng, T., Hirst, M., Hero, A., Jones, S. and Hess J.L. (2012) **Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells.** *Blood.*, **119**, 388-398.
- Hudlebusch, H.R., Lodahl, M., Johnsen, H.E. and Rasmussen, T. (2004) **Expression of HOXA genes in patients with multiple myeloma.** *Leuk. Lymphoma.*, **45**, 1215-1217.
- Ito, T., Kwon, H.Y., Zimdahl, B., Congdon, K.L., Blum, J., Lento, W.E., Zhao, C., Lagoo, A., Gerrard, G., Foroni, L., Goldman, J., Goh, H., Kim, S.H., Kim, D.W., Chuah, C., Oehler, V.G., Radich, J.P., Jordan, C.T. and Reya, T. (2010) **Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi.** *Nature.*, **466**, 765-768.
- Iwamoto, M., Asakawa, H., Hiraoka, Y. and Haraguchi, T. (2010) **Nucleoporin Nup98: a gatekeeper in the eukaryotic kingdoms.** *Genes Cells.*, **15**, 661-669.
- Iwasaki M, Kuwata T, Yamazaki Y, Jenkins NA, Copeland NG, Osato M, Ito Y, Kroon E, Sauvageau G, Nakamura T. (2005) **Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model.** *Blood.*, **105**, 784-793.
- Jarak, I., Kralj, M., Piantanida, I., Suman, L., Zinić, M., Pavelić, K. and Karminski-Zamola, G. (2006) **Novel cyano- and amidino-substituted derivatives of thieno[2,3-b]- and thieno[3,2-b]thiophene-2-carboxanilides and thieno[3',2':4,5]thieno- and thieno[2',3':4,5]thieno [2,3-c]quinolones: synthesis, photochemical synthesis, DNA binding, and antitumor evaluation.** *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 2859-2868.
- Jarak, I., Kralj, M., Suman, L., Pavlović, G., Dogan, J., Piantanida, I., Zinić, M., Pavelić, K. and Karminski-Zamola, G. (2005) **Novel cyano- and N-isopropylamidino-substituted derivatives of benzo[b]thiophene-2-carboxanilides and benzo[b]thieno[2,3-c]quinolones: synthesis, photochemical synthesis, crystal structure determination, and antitumor evaluation. 2.** *J. Med. Chem.*, **48**, 2346-2360.
- Jave-Suarez, L.F., Winter, H., Langbein, L., Rogers, M.A. and Schweizer, J. (2002) **HOXC13 is involved in the regulation of human hair keratin gene expression.** *J. Biol. Chem.*, **277**, 3718-3726.

- Jensen, R.E. and Englund, P.T. (2012) **Network news: the replication of kinetoplast DNA.** *Annu. Rev. Microbiol.*, **66**, 473-491.
- Jousset, C., Carron, C., Boureux, A., Quang, C.T., Oury, C., Dusanter-Fourt, I., Charon, M., Levin, J., Bernard, O. and Ghysdael, J. (1997) **A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein.** *EMBO J.*, **16**, 69-82.
- Juang, Y.T., Solomou, E.E., Rellahan, B. and Tsokos, G.C. (2002) **Phosphorylation and O-linked glycosylation of Elf-1 leads to its translocation to the nucleus and binding to the promoter of the TCR zeta-chain.** *J. Immunol.*, **168**, 2865-2871.
- Kanazawa, T., Ogawa, C., Taketani, T., Taki, T., Hayashi, Y. and Morikawa, A. (2005). **TLS/FUS-ERG fusion gene in acute lymphoblastic leukemia with t(16;21)(p11;q22) and monitoring of minimal residual disease.** *Lymphoma*, **46**, 1833-1835.
- Kang, H.S., Nelson, M.L., Mackereth, C.D., Schärpf, M., Graves, B.J. and McIntosh, L.P. (2008) **Identification and structural characterization of a CBP/p300-binding domain from the ETS family transcription factor GABP alpha.** *J. Mol. Biol.*, **377**, 636-646.
- Kasper, L.H., Brindle, P.K., Schnabel, C.A., Pritchard, C.E., Cleary, M.L., van Deursen, J.M. (1999) **CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity.** *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 764-776.
- Kelland, L. (2007) **The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.** *Nat. Rev. Cancer.*, **7**, 573-584.
- Kelly, L.M. and Gilliland, D.G. (2002) **Genetics of myeloid leukemias.** *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **3**, 179-198.
- Kennedy, P.G.E. (2004) **Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges.** *J. Clin. Invest.*, **113**, 496-504.
- Khachigian, L.M., Fries, J.W., Benz, M.W., Bonthron, D.T. and Collins, T. (1994) **Novel cis-acting elements in the human platelet-derived growth factor B-chain core promoter that mediate gene expression in cultured vascular endothelial cells.** *J. Biol. Chem.*, **269**, 22647-22656.
- Khandanpour, C., Krongold, J., Schütte, J., Bouwman, F., Vassen, L., Gaudreau, M.C., Chen, R., Calero-Nieto, F.J., Diamanti, E., Hannah, R., Meyer, S.E., Grimes, H.L., van der Reijden, B.A., Jansen, J.H., Patel, C.V., Peeters, J.K., Löwenberg, B., Dührsen, U., Göttgens, B. and Möröy, T. (2012) **The human GFI136N variant induces epigenetic changes at the Hoxa9 locus and accelerates K-RAS driven myeloproliferative disorder in mice.** *Blood.*, **120**, 4006-4017.
- Kim, J., Park, T.S., Song, J., Kyung-A, L., Hong, D.J., Min, Y.H., Cheong, J.W. and Choi, J.R. (2009) **Detection of FUSErERG chimeric transcript in two cases of acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11.2;q22) with unusual characteristics.** *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **194**, 111-118.
- Kim, M.H., Chang, H.H., Shin, C., Cho, M., Park, D. and Park, H.W. (1998) **Genomic structure and sequence analysis of human HOXA-9.** *DNA Cell Biol.*, **17**, 407-414.
- Kinsey, M., Smith, R. and Lessnick S.L. (2006) **NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma.** *Mol. Cancer Res.*, **4**, 851-859.
- Kirito, K., Fox, N. and Kaushansky, K. (2004) **Thrombopoietin induces HOXA9 nuclear transport in immature hematopoietic cells: potential mechanism by which the hormone favorably affects hematopoietic stem cells.** *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 6751-6762.
- Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C. and Maki, R.A. (1990) **The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene.** *Cell.*, **61**, 113-124.
- Klezovitch, O., Risk, M., Coleman, I., Lucas, J.M., Null, M., True, L.D., Nelson, P.S. and Vasioukhin, V. (2008) **A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 2105-2110.
- Kluza, J., Arimondo, P.B., David-Cordonnier, M.H. and Bailly, C. (2007) **Camptothecins for drug design, cancer cell death, and gene targeting.** *Cancer Drug Design and Discovery*, 173-197.
- Ko, S.Y., Barengo, N., Ladanyi, A., Lee, J.S., Marini, F., Lengyel, E. and Naora, H. (2012) **HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts.** *J. Clin. Invest.*, **122**, 3603-3617.
- Köhler, A. and Hurt, E. (2010) **Gene regulation by nucleoporins and links to cancer.** *Mol. Cell.*, **38**, 6-15.
- Krivsov, A.V. and Armstrong, S.A. (2007) **MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development.** *Nature Reviews Cancer*, **7**, 823-833.

- Krivsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, E.J., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., Golub, T.R. and Armstrong, S.A. (2006) **Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLLAF9.** *Nature*, **442**, 818–822.
- Krivtsov, A.V., Feng, Z., Lemieux, M.E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A.U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A.P., Silverman, L.B., Kutok, J.L., Kung, A.L. and Armstrong, S.A. (2008) **H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias.** *Cancer Cell*, **14**, 355-368.
- Kroon, E., Kros, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A.M. and Sauvageau, G. (1998) **Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b.** *EMBO J.*, **17**, 3714-25.
- Kroon, E., Thorsteinsdottir, U., Mayotte, N., Nakamura, T. and Sauvageau, G. (2001) **NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice.** *EMBO J.*, **20**, 350-361.
- Kruse, E.A., Loughran, S.J., Baldwin, T.M., Josefsson, E.C., Ellis, S., Watson, D.K., Nurden, P., Metcalf, D., Hilton, D.J., Alexander, W.S. and Kile, B.T. (2009) **Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 13814-13819.
- Kufe, D.W., Major, P.P., Egan, E.M. and Beardsley, G.P. (1980) **Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA.** *J. Biol. Chem.*, **255**, 8997-8900.
- Kumar-Sinha, C., Tomlins, S.A. and Chinnaiyan, A.M. (2008) **Recurrent gene fusions in prostate cancer.** *Nat. Rev. Cancer.*, **8**, 497-511.
- Kunderfranco, P., Mello-Grand, M., Cangemi, R., Pellini, S., Mensah, A., Albertini, V., Malek, A., Chiorino, G., Catapano, C.V. and Carbone, G.M. (2010) **ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer.** *PLoS One.*, **5**, e10547.
- Kyle, R.A. and Rajkumar, S.V. (2008) **Multiple myeloma.** *Blood.*, **111**, 2962-2972.
- Lansiaux, A. and Bailly, C. (1999) [**Ecteinascidin 743**]. *Bull. Cancer.*, **86**, 139-141.
- Lansiaux, A., Dassonneville, L., Facompré, M., Kumar, A., Stephens, C.E., Bajic, M., Tanious, F., Wilson, W.D., Boykin, D.W. and Bailly, C. (2002) **Distribution of furamidine analogues in tumor cells: influence of the number of positive charges.** *J. Med. Chem.*, **45**, 1994-2002.
- Lansiaux, A., Tanious, F., Mishal, Z., Dassonneville, L., Kumar, A., Stephens, C.E., Hu, Q., Wilson, W.D., Boykin and D.W., Bailly, C. (2002) **Distribution of furamidine analogues in tumor cells: targeting of the nucleus or mitochondria depending on the amidine substitution.** *Cancer Res.*, **62**, 7219-7229.
- Lanteri, C.A., Stewart, M.L., Brock, J.M., Alibu, V.P., Meshnick, S.R., Tidwell, R.R. and Barrett, M.P. (2006) **Roles for the Trypanosoma brucei P2 transporter in DB75 uptake and resistance.** *Mol. Pharmacol.*, **70**, 1585-1592.
- Lanteri, C.A., Trumppower, B.L., Tidwell, R.R. and Meshnick, S.R. (2004) **DB75, a novel trypanocidal agent, disrupts mitochondrial function in Saccharomyces cerevisiae.** *Antimicrob Agents Chemother.*, **48**, 3968-3974.
- LaRonde-LeBlanc, N.A. and Wolberger, C. (2003) **Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior.** *Genes Dev.*, **17**, 2060-2072.
- Laudet, V., Hänni, C., Stéhelin, D. and Duterque-Coquillaud M. (1999) **Molecular phylogeny of the ETS gene family.** *Oncogene.*, **18**, 1351-1359.
- Laughton, C.A., Tanious, F., Nunn, C.M., Boykin, D.W., Wilson, W.D. and Neidle, S. (1996) **A crystallographic and spectroscopic study of the complex between d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> and 2,5-bis(4-guanylphenyl)furan, an analogue of berenil. Structural origins of enhanced DNA-binding affinity.** *Biochemistry.*, **35**, 5655-5661.
- Lawrence, H.J., Helgason, C.D., Sauvageau, G., Fong, S., Izon, D.J., Humphries, R.K. and Largman, C. (1997) **Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis.** *Blood.*, **89**, 1922-1930.
- Lawrence, H.J., Rozenfeld, S., Cruz, C., Matsukuma, K., Kwong, A., Kömüves, L., Buchberg, A.M. and Largman, C. (1999) **Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias.** *Leukemia.*, **13**, 1993-1999.



- Leprince, D., Gégonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stehelin, D. (1993) **A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26.** *Nature.*, **306**, 395-397.
- Leshem, O., Madar, S., Kogan-Sakin, I., Kamer, I., Goldstein, I., Brosh, R., Cohen, Y., Jacob-Hirsch, J., Ehrlich, M., Ben-Sasson, S., Goldfinger, N., Loewenthal, R., Gazit, E., Rotter, V. and Berger, R. (2011) **TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model.** *PLoS One.*, **6**, e21650.
- Li, Z., Huang, H., Chen, P., He, M., Li, Y., Arnovitz, S., Jiang, X., He, C., Hyjek, E., Zhang, J., Zhang, Z., Elkahloun, A., Cao, D., Shen, C., Wunderlich, M., Wang, Y., Neilly, M.B., Jin, J., Wei, M., Lu, J., Valk, P.J., Delwel, R., Lowenberg, B., Le Beau, M.M., Vardiman, J., Mulloy, J.C., Zeleznik-Le, N.J., Liu, P.P., Zhang, J. and Chen, J. (2012) **miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia.** *Nat. Commun.*, **3**, 688-699.
- Li, Z., Huang, H., Li, Y., Jiang, X., Chen, P., Arnovitz, S., Radmacher, M.D., Maharry, K., Elkahloun, A., Yang, X., He, C., He, M., Zhang, Z., Dohner, K., Neilly, M.B., Price, C., Lussier, Y.A., Zhang, Y., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Caligiuri, M.A., Bullinger, L., Valk, P.J., Delwel, R., Lowenberg, B., Liu, P.P., Marcucci, G., Bloomfield, C.D., Rowley, J.D. and Chen, J. (2012a) **Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML.** *Blood.*, **119**, 2314-2324.
- Li, Z., Zhang, Z., Li, Y., Arnovitz, S., Chen, P., Huang, H., Jiang, X., Hong, G.M., Kunjamma, R.B., Ren, H., He, C., Wang, C.Z., Elkahloun, A.G., Valk, P.J., Döhner, K., Neilly, M.B., Bullinger, L., Delwel, R., Lowenberg, B., Liu, P.P., Morgan, R., Rowley, J.D., Yuan, C.S. and Chen, J. (2012b) **PBX3 is an important cofactor of HOXA9 in leukemogenesis.** *Blood.*, [Epub ahead of print].
- Liang, H., Mao, X., Olejniczak, E.T., Nettesheim, D.G., Yu, L., Meadows, R.P., Thompson, C.B. and Fesik, S.W. (1994) **Solution structure of the ets domain of Fli-1 when bound to DNA.** *Nat. Struct. Biol.*, **1**, 871-875.
- Libura, J., Slater, D.J., Felix, C.A. and Richardson C. (2005) **Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34+ cells and remain stable after clonal expansion.** *Blood*, **105**, 2124-2131.
- Libura, J., Ward, M., Solecka, J. and Richardson, C. (2008) **Etoposide-initiated MLL rearrangements detected at high frequency in human primitive hematopoietic stem cells with in vitro and in vivo long-term repopulating potential.** *Eur. J. Haematol.*, **81**, 185-195.
- Licht, J.D. (2001) **AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML.** *Oncogene*, **20**, 5660-5679.
- Liu, Y., Chai, Y., Kumar, A., Tidwell, R.R., Boykin, D.W., Wilson, W.D. (2012) **Designed compounds for recognition of 10 base pairs of DNA with two at binding sites.** *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5290-5299.
- Liu, Y., Collar, C.J., Kumar, A., Stephens, C.E., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2008) **Heterocyclic diamidine interactions at AT base pairs in the DNA minor groove: effects of heterocycle differences, DNA AT sequence and length.** *J. Phys. Chem. B.*, **112**, 11809-11818.
- Longley, D.B., Harkin, D.P. and Johnston, P.G. (2003) **5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.** *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 330-338.
- Loughran, S.J., Kruse, E.A., Hacking, D.F., de Graaf, C.A., Hyland, C.D., Willson, T.A., Henley, K.J., Ellis, S., Voss, A.K., Metcalf, D., Hilton, D.J., Alexander, W.S. and Kile, B.T. (2008) **The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells.** *Nat. Immunol.*, **9**, 810-819.
- Lovett, B.D., Lo Nigro, L., Rappaport, E.F., Blair, I.A., Osheroff, N., Zheng, N., Megonigal, M.D., Williams, W.R., Nowell, P.C. and Felix, C.A. (2001) **Near-precise interchromosomal recombination and functional DNA topoisomerase II cleavage sites at MLL and AF-4 genomic breakpoints in treatment-related acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) translocation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**, 9802-9807.
- Mackereth, C.D., Schärpf, M., Gentile, L.N., MacIntosh, S.E., Slupsky, C.M. and McIntosh, L.P. (2004) **Diversity in structure and function of the Ets family PNT domains.** *J. Mol. Biol.*, **342**, 1249-1264.
- Magnusson, M., Brun, A.C., Lawrence, H.J. and Karlsson, S. (2007) **Hoxa9/hoxb3/hoxb4 compound null mice display severe hematopoietic defects.** *Exp. Hematol.*, **35**, 1421-1428.

- Mahdipour, E. and Mace, K.A. (2011) **Hox transcription factor regulation of adult bone-marrow-derived cell behaviour during tissue repair and regeneration.** *Expert Opin. Biol. Ther.*, **11**, 1079-1090.
- Mallena, S., Lee, M.P., Bailly, C., Neidle, S., Kumar, A., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2004) **Thiophene-based diamidine forms a "super" at binding minor groove agent.** *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 13659-13669.
- Mani, R.S., Iyer, M.K., Cao, Q., Brenner, J.C., Wang, L., Ghosh, A., Cao, X., Lonigro, R.J., Tomlins, S.A., Varambally, S. and Chinnaiyan, A.M. (2011) **TMPRSS2-ERG-mediated feed-forward regulation of wild-type ERG in human prostate cancers.** *Cancer Res.*, **71**, 5387-5392.
- Mann, J. (2002) **Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future.** *Nat. Rev. Cancer.*, **2**, 143-148.
- Mann, R.S., Lelli, K.M. and Joshi, R. (2009) **Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators.** *Curr. Top. Dev. Biol.*, **88**, 63-101.
- Marcucci, G., Baldus, C.D., Ruppert, A.S., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Whitman, S.P., Kowitz, J.E., Edwards, C.G., Vardiman, J.W., Powell, B.L., Baer, M.R., Moore, J.O., Perrotti, D., Caligiuri, M.A., Carroll, A.J., Larson, R.A., de la Chapelle, A. and Bloomfield, C.D. (2005) **Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study.** *J. Clin. Oncol.*, **23**, 9234-9342.
- Maroulakou, I.G. and Bowe, D.B. (2000) **Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network.** *Oncogene.*, **19**, 6432-6442.
- Mathis, A.M., Bridges, A.S., Ismail, M.A., Kumar, A., Francesconi, I., Anbazhagan, M., Hu, Q., Tanious, F.A., Wenzler, T., Saulter, J., Wilson, W.D., Brun, R., Boykin, D.W., Tidwell, R.R. and Hall, J.E. (2007) **Diphenyl furans and aza analogs: effects of structural modification on in vitro activity, DNA binding, and accumulation and distribution in trypanosomes.** *Antimicrob Agents Chemother.*, **51**, 2801-2810.
- Mathis, A.M., Holman, J.L., Sturk, L.M., Ismail, M.A., Boykin, D.W., Tidwell, R.R. and Hall, J.E. (2006) **Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2185-2191.
- Mazur, S., Tanious, F.A., Ding, D., Kumar, A., Boykin, D.W., Simpson, I.J., Neidle, S. and Wilson, W.D. (2000) **A thermodynamic and structural analysis of DNA minor-groove complex formation.** *J. Mol. Biol.*, **300**, 321-337.
- McBryant, S.J., Baird, E.E., Trauger, J.W., Dervan, P.B. and Gottesfeld, J.M. (1999) **Minor groove DNA-protein contacts upstream of a tRNA gene detected with a synthetic DNA binding ligand.** *J. Mol. Biol.*, **286**, 973-981.
- McCauley, M.J., Zimmerman, J., Maher, L.J. 3rd and Williams, M.C. (2007) **HMGB binding to DNA: single and double box motifs.** *J. Mol. Biol.*, **374**, 993-1004.
- McLaughlin, F., Ludbrook, V.J., Cox, J., von Carlowitz, I., Brown, S. and Randi, A.M. (2001) **Combined genomic and antisense analysis reveals that the transcription factor Erg is implicated in endothelial cell differentiation.** *Blood.*, **98**, 3332-3339.
- Mdachi, R.E., Thuita, J.K., Kagira, J.M., Ngotho, J.M., Murilla, G.A., Ndung'u, J.M., Tidwell, R.R., Hall, J.E. and Brun, R. (2009) **Efficacy of the novel diamidine compound 2,5-Bis(4-amidinophenyl)-furan-bis-O-Methylamidoxime (Pafuramidine, DB289) against Trypanosoma brucei rhodesiense infection in vervet monkeys after oral administration.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 953-957.
- Mertz, K.D., Setlur, S.R., Dhanasekaran, S.M., Demichelis, F., Perner, S., Tomlins, S., Tchinda, J., Laxman, B., Vessella, R.L., Beroukhi, R., Lee, C., Chinnaiyan, A.M. and Rubin M.A. (2007) **Molecular characterization of TMPRSS2-ERG gene fusion in the NCI-H660 prostate cancer cell line: a new perspective for an old model.** *Neoplasia.*, **9**, 200-206.
- Metzeler, K.H., Dufour, A., Benthaus, T., Hummel, M., Sauerland, M.C., Heinecke, A., Berdel, W.E., Büchner, T., Wörmann, B., Mansmann, U., Braess, J., Spiekermann, K., Hiddeman, W., Buske, C. and Bohlander, S.K. (2009) **ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays.** *J. Clin. Oncol.*, **27**, 5031-5038.

- Miao, Y., Lee, M.P., Parkinson, G.N., Batista-Parra, A., Ismail, M.A., Neidle, S., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2005) **Out-of-shape DNA minor groove binders: induced fit interactions of heterocyclic dications with the DNA minor groove.** *Biochemistry*, **44**, 14701-14708.
- Midgley, I., Fitzpatrick, K., Taylor, L.M., Houchen, T.L., Henderson, S.J., Wright, S.J., Cybulski, Z.R., John, B.A., McBurney, A., Boykin, D.W., Trendler, K.L. (2007) **Pharmacokinetics and metabolism of the prodrug DB289 (2,5-bis[4-(N-methoxyamidino)phenyl]furan monomaleate) in rat and monkey and its conversion to the antiprotozoal/antifungal drug DB75 (2,5-bis(4-guanylphenyl)furan dihydrochloride).** *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 955-967.
- Milech, N., Gottardo, N.G., Ford, J., D'Souza, D., Greene, W.K., Kees, U.R. and Watt, P.M. (2010) **MEIS proteins as partners of the TLX1/HOX11 oncoprotein.** *Leuk. Res.*, **34**, 358-363.
- Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D. and Hess, J.L. (2002) **MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters.** *Mol. Cell.*, **10**, 1107-1117.
- Milne, T.A., Martin, M.E., Brock, H.W., Slany, R.K. and Hess, J.L. (2005) **Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hox a9 locus, promoting transcription and multiple histone modifications.** *Cancer Res.*, **65**, 11367-11374.
- Ming, X., Ju, W., Wu, H., Tidwell, R.R., Hall, J.E. and Thakker, D.R. (2009) **Transport of dicationic drugs pentamidine and furamide by human organic cation transporters.** *Drug. Metab. Dispos.*, **37**, 424-430.
- Moens CB, Selleri L. (2006) **Hox cofactors in vertebrate development.** *Dev. Biol.*, **291**, 193-206.
- Mohamed, A.A., Tan, S.H., Mikhailkevich, N., Ponniah, S., Vasioukhin, V., Bieberich, C.J., Sesterhenn, I.A., Dobi, A., Srivastava, S. and Sreenath, T.L. (2010) **Ets family protein, erg expression in developing and adult mouse tissues by a highly specific monoclonal antibody.** *J Cancer.*, **25**, 197-208.
- Mohamed, A.A., Tan, S.H., Sun, C., Shaheduzzaman, S., Hu, Y., Petrovics, G., Chen, Y., Sesterhenn, I.A., Li, H., Sreenath, T., McLeod, D.G., Dobi, A. and Srivastava, S. (2011) **ERG oncogene modulates prostaglandin signaling in prostate cancer cells.** *Cancer Biol. Ther.*, **11**, 410-417.
- Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L., and Saludes, J.P. (2009) **Drug development from marine natural products.** *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 69-85.
- Montecucco, A. and Biamonti, G. (2007) **Cellular response to etoposide treatment.** *Cancer Lett.*, **252**, 9-18.
- Moore, M.A., Chung, K.Y., Plasilova, M., Schuringa, J.J., Shieh, J.H., Zhou, P. and Morrone G. (2007) **NUP98 dysregulation in myeloid leukemogenesis.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1106**, 114-142.
- Moore, S.D., Offor, O., Ferry, J.A., Amrein, P.C., Morton, C.C. and Cin, P.D. (2006) **ELF4 is fused to ERG in a case of acute myeloid leukemia with a t(X;21)(q25-26;q22).** *Leuk Res.*, **30**, 1037-1042.
- Morgan, R. (2006) **Hox genes: a continuation of embryonic patterning?** *Trends Genet.*, **22**, 67-69.
- Morgan, R., Boxall, A., Harrington, K.J., Simpson, G.R., Gillett, C., Michael, A. and Pandha, H.S. (2012) **Targeting the HOX/PBX dimer in breast cancer.** *Breast Cancer Res. Treat.*, **136**, 389-398.
- Morgan, R., Pirard, P.M., Shears, L., Sohal, J., Pettengell, R. and Pandha, H.S. (2007) **Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma.** *Cancer Res.*, **67**, 5806-58013.
- Morgan, R., Plowright, L., Harrington, K.J., Michael, A. and Pandha, H.S. (2010) **Targeting HOX and PBX transcription factors in ovarian cancer.** *BMC Cancer.*, **10**, 89-97.
- Mosad, E., Abdou, M. and Zaky, A.H. (2012) **Rearrangement of the myeloid/lymphoid leukemia gene in therapy-related myelodysplastic syndrome in patients previously treated with agents targeting DNA topoisomerase II.** *Oncology.*, **83**, 128-134.
- Mrksich, M., Parks, M.E. and Dervan P.B. (1994) **Hairpin peptide motif : A new class of oligopeptides for sequence-specific recognition in the minor groove of double-helical DNA.** *J. Am. Chem. Soc.*, **1165**, 7983-7988.
- Mullighan, C.G., Kennedy, A., Zhou, X., Radtke, I., Phillips, L.A., Shurtleff, S. A. and Downing, J.R. (2007) **Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias.** *Leukemia*, **21**, 2000-2009.
- Munde, M., Ismail, M.A., Arafa, R., Peixoto, P., Collar, C.J., Liu, Y., Hu, L., David-Cordonnier, M.H., Lansiaux, A., Bailly, C., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2007) **Design of DNA minor groove binding**

- diamidines that recognize GC base pair sequences: a dimeric-hinge interaction motif.** *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 13732-13743.
- Munde, M., Kumar, A., **Nhili, R.**, Depauw, S., David-Cordonnier, M.H., Ismail, M.A., Stephens, C.E., Farahat, A.A., Batista-Parra, A., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2010) **DNA minor groove induced dimerization of heterocyclic cations: compound structure, binding affinity, and specificity for a TTAA site.** *J. Mol. Biol.*, **402**, 847-864.
- Muntean, A.G. and Hess, J.L. (2012) **The pathogenesis of mixed-lineage leukemia.** *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, **7**, 283-301.
- Muntean, A.G., Tan, J., Sitwala, K., Huang, Y., Bronstein, J., Connelly, J.A., Basrur, V., Elenitoba-Johnson, K.S. and Hess J.L. (2010) **The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis.** *Cancer Cell.*, **17**, 609-621.
- Murakami, K., Mavrothalassitis, G., Bhat, N.K., Fisher, R.J. and Papas, T.S. (1993) **Human ERG-2 protein is a phosphorylated DNA-binding protein: a distinct member of the ets family.** *Oncogene.*, **8**, 1559-1566.
- Nagel, S., Venturini, L., Marquez, V.E., Meyer, C., Kaufmann, M., Scherr, M., MacLeod, R.A. and Drexler, H.G. (2010) **Polycomb repressor complex 2 regulates HOXA9 and HOXA10, activating ID2 in NK/T-cell lines.** *Mol. Cancer.*, **9**, 151-162.
- Nakamura, T., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (1999c) **Identification of a new family of Pbx-related homeobox genes.** *Oncogene.*, **13**, 2235-2242.
- Nakamura, T., Largaespada, D.A., Lee, M.P., Johnson, L.A., Ohyashiki, K., Toyama, K., Chen, S.J., Willman, C.L., Chen, I.M., Feinberg, A.P., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Shaughnessy, J.D. Jr. (1996b) **Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia.** *Nat Genet.*, **12**, 154-158.
- Nakamura, T., Largaespada, D.A., Shaughnessy, J.D. Jr., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (1996a) **Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias.** *Nat. Genet.*, **12**, 149-153.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C.M. and Canaani, E. (2002) **ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation.** *Mol. Cell.*, **10**, 1119-1128.
- Nam, R.K., Sugar, L., Wang, Z., Yang, W., Kitching, R., Klotz, L.H., Venkateswaran, V., Narod, S.A. and Seth, A. (2007) **Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression.** *Cancer Biol. Ther.*, **6**, 40-45.
- Neely, L., Trauger, J.W., Baird, E.E., Dervan, P.B. and Gottesfeld, J.M. (1997) **Importance of minor groove binding zinc fingers within the transcription factor IIIA-DNA complex.** *J. Mol. Biol.*, **274**, 439-445.
- Nelson, S.M., Ferguson, L.R. and Denny, W.A. (2007) **Non-covalent ligand/DNA interactions: minor groove binding agents.** *Mutat. Res.*, **623**, 24-40.
- Neville, S.E., Baigent, S.M., Bicknell, A.B., Lowry, P.J. and Gladwell, R.T. (2002) **Hox gene expression in adult tissues with particular reference to the adrenal gland.** *Endocr. Res.*, **28**, 669-673.
- Ng, A.P., Loughran, S.J., Metcalf, D., Hyland, C.D., de Graaf, C.A., Hu, Y., Smyth, G.K., Hilton, D.J., Kile, B.T. and Alexander, W.S. (2011) **Erg is required for self-renewal of hematopoietic stem cells during stress hematopoiesis in mice.** *Blood.*, **118**, 2454-2461.
- Ng, P.Y., Tang, Y., Knosp, W.M., Stadler, H.S. and Shaw, J.T. (2007) **Synthesis of diverse lactam carboxamides leading to the discovery of a new transcription-factor inhibitor.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 5352-5355.
- Nguyen, B., Neidle, S. and Wilson, W.D. (2009) **A role for water molecules in DNA-ligand minor groove recognition.** *Acc. Chem. Res.*, **42**, 11-21.
- Nguyen, B., Tardy, C., Bailly, C., Colson, P., Houssier, C., Kumar, A., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2002) **Influence of compound structure on affinity, sequence selectivity, and mode of binding to DNA for unfused aromatic dications related to furamidine.** *Biopolymers*, **63**, 281-297.
- Nguyen, Ha Hoang, "Structural factors that influence the inhibition of type II restriction enzymes by minor groove binders" (2009). Chemistry Theses. Paper 17. [http://digitalarchive.gsu.edu/chemistry\\_theses/17](http://digitalarchive.gsu.edu/chemistry_theses/17).

- Nikolova-Krstevski, V., Yuan, L., Le Bras, A., Vijayaraj, P., Kondo, M., Gebauer, I., Bhasin, M., Carman, C.V. and Oettgen, P. (2009) **ERG is required for the differentiation of embryonic stem cells along the endothelial lineage.** *BMC Dev. Biol.*, **9**, 72-85.
- Nitiss, J.L. (2009) **Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy.** *Nat. Rev. Cancer.*, **9**, 338-350.
- Noyes, M.B., Christensen, R.G., Wakabayashi, A., Stormo, G.D., Brodsky, M.H. and Wolfe, S.A. (2008) **Analysis of homeodomain specificities allows the family-wide prediction of preferred recognition sites.** *Cell.*, **133**, 1277-1289.
- Nunn, M.F., Seeburg, P.H., Moscovici, C. and Duesberg, P.H. (1983) **Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene.** *Nature.*, **306**, 391-395.
- Nye, J.A., Petersen, J.M., Gunther, C.V., Jonsen, M.D. and Graves, B.J. (1992) **Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif.** *Genes Dev.*, **6**, 975-990.
- Obika, S., Reddy, S.Y. and Bruice, T.C. (2003) **Sequence specific DNA binding of Ets-1 transcription factor: molecular dynamics study on the Ets domain--DNA complexes.** *J. Mol. Biol.*, **331**, 345-359.
- O'Brien, M.M. and Lacayo, N.J. (2008) **Acute leukemia in children.** *Dis. Mon.*, **54**, 202-225.
- Olenyuk, B.Z., Zhang, G.J., Klco, J.M., Nickols, N.G., Kaelin, W.G. Jr. and Dervan, P.B. (2004) **Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence-specific hypoxia response element antagonist.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 16768-16773.
- O'Neil, J. and Look, A.T. (2007) **Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation.** *Oncogene.*, **26**, 6838-6849.
- Ordóñez, J.L., Osuna, D., Herrero, D., de Alava, E. and Madoz-Gúrpide, J. (2009) **Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead?** *Cancer Res.*, **69**, 7140-7150.
- Owczarek, C.M., Portbury, K.J., Hardy, M.P., O'Leary, D.A., Kudoh, J., Shibuya, K., Shimizu, N., Kola, I. and Hertzog, P.J. (2004) **Detailed mapping of the ERG-ETS2 interval of human chromosome 21 and comparison with the region of conserved synteny on mouse chromosome 16.** *Gene.*, **324**, 65-77.
- Owens, B.M. and Hawley, R.G. (2002) **HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis.** *Stem Cells.*, **20**, 364-379.
- Pan, J., Zou, J., Wu, D.Y., Roberson, R.S., Hennings, L.J., Ma, X., Yared, M., Blackburn, M.L., Chansky, H.A. and Yang, L. (2008) **TLS-ERG leukemia fusion protein deregulates cyclin-dependent kinase 1 and blocks terminal differentiation of myeloid progenitor cells.** *Mol. Cancer Res.*, **6**, 862-872.
- Patel, M., Simon, J.M., Iglesia, M.D., Wu, S.B., McFadden, A.W., Lieb, J.D. and Davis, I.J. (2012) **Tumor-specific retargeting of an oncogenic transcription factor chimera results in dysregulation of chromatin and transcription.** *Genome Res.*, **22**, 259-270.
- Paulo, P., Barros-Silva, J.D., Ribeiro, F.R., Ramalho-Carvalho, J., Jerónimo, C., Henrique, R., Lind, G.E., Skotheim, R.I., Lothe, R.A. and Teixeira, M.R. (2012) **FLI1 is a novel ETS transcription factor involved in gene fusions in prostate cancer.** *Genes Chromosomes Cancer.*, **51**, 240-249.
- Peixoto, P., Liu, Y., Depauw, S., Hildebrand, M.P., Boykin, D.W., Bailly, C., Wilson, W.D. and David-Cordonnier, M.H. (2008) **Direct inhibition of the DNA-binding activity of POU transcription factors Pit-1 and Brn-3 by selective binding of a phenyl-furan-benzimidazole dication.** *Nucleic Acids Res.*, **36**, 3341-3353.
- Pelton, J.G. and Wemmer, D.E. (1989) **Structural characterization of a 2:1 distamycin A.d(CGCAAATTGGC) complex by two-dimensional NMR.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 5723-5727.
- Petrovics, G., Liu, A., Shaheduzzaman, S., Furusato, B., Sun, C., Chen, Y., Nau, M., Ravindranath, L., Chen, Y., Dobi, A., Srikantan, V., Sesterhenn, I.A., McLeod, D.G., Vahey, M., Moul, J.W. and Srivastava, S. (2005) **Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome.** *Oncogene.*, **24**, 3847-3852
- Phelan, M.L., Rambaldi, I. and Featherstone, M.S. (1995) **Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif.** *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3989-3997.
- Pimanda, J.E., Chan, W.Y., Donaldson, I.J., Bowen, M., Green, A.R. and Göttgens, B. (2006) **Endoglin expression in the endothelium is regulated by Fli-1, Erg, and Elf-1 acting on the promoter and a -8-kb enhancer.** *Blood.*, **107**, 4737-4745.

- Pineault, N., Abramovich, C., Ohta, H. and Humphries, R.K. (2004) **Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1.** *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 1907-1917.
- Pineault, N., Buske, C., Feuring-Buske, M., Abramovich, C., Rosten, P., Hogge, D.E., Aplan, P.D. and Humphries, R.K. (2003) **Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1.** *Blood.*, **101**, 4529-4538.
- Pineault, N., Helgason, C.D., Lawrence, H.J. and Humphries, R.K. (2002) **Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny.** *Exp. Hematol.*, **30**, 49-57.
- Plowright, L., Harrington, K.J., Pandha, H.S. and Morgan, R. (2009) **HOX transcription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOX genes in lung cancer).** *Br. J. Cancer.*, **100**, 470-475.
- Pommier, Y. (2006) **Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond.** *Nat. Rev. Cancer.*, **6**, 789-802.
- Pommier, Y. and Marchand, C. (2011) **Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes.** *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 25-36.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H. and Marchand, C. (2010) **DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs.** *Chem. Biol.*, **17**, 421-433.
- Poon, G.M. and Macgregor, R.B. Jr. (2003) **Base coupling in sequence-specific site recognition by the ETS domain of murine PU.1.** *J. Mol. Biol.*, **328**, 805-819.
- Popovic, R., Erfurth, F. and Zeleznik-Le, N. (2008) **Transcriptional complexity of the HOXA9 locus.** *Blood Cells Mol. Dis.*, **40**, 156-159.
- Price, M.A. and Tullius, T.D. (1993) **How the structure of an adenine tract depends on sequence context: a new model for the structure of TnAn DNA sequences.** *Biochemistry*, **32**, 127-136.
- Purfield, A.E., Tidwell, R.R. and Meshnick, S.R. (2009) **The diamidine DB75 targets the nucleus of Plasmodium falciparum.** *Malar. J.*, **8**, 104-112.
- Quéré, R., Karlsson, G., Hertwig, F., Rissler, M., Lindqvist, B., Fioretos, T., Vandenberghe, P., Slovak, M.L., Cammenga, J. and Karlsson, S. (2011) **Smad4 binds Hoxa9 in the cytoplasm and protects primitive hematopoietic cells against nuclear activation by Hoxa9 and leukemia transformation.** *Blood.*, **117**, 5918-5930.
- Rahimian, M., Kumar, A., Say, M., Bakunov, S.A., Boykin, D.W., Tidwell, R.R., Wilson, W.D. (2009) **Minor groove binding compounds that jump a gc base pair and bind to adjacent AT base pair sites.** *Biochemistry*, **48**, 1573-1583.
- Rainis, L., Toki, T., Pimanda, J.E., Rosenthal, E., Machol, K., Strehl, S., Göttgens, B., Ito, E. and Izraeli, S. (2005) **The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias.** *Cancer Res.*, **65**, 7596-7602.
- Rao, V.N., Huebner, K., Isobe, M., ar-Rushdi, A., Croce, C.M. and Reddy, E.S. (1989) **elk, tissue-specific ets-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints.** *Science.*, **244**, 66-70.
- Rao, V.N., Papas, T.S. and Reddy, E.S. (1987) **erg, a human ets-related gene on chromosome 21: alternative splicing, polyadenylation, and translation.** *Science.*, **237**, 635-639.
- Raskatov, J.A., Nickols, N.G., Hargrove, A.E., Marinov, G.K., Wold, B. and Dervan, P.B. (2012) **Gene expression changes in a tumor xenograft by a pyrrole-imidazole polyamide.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 16041-16045.
- Rawat, V.P., Humphries, R.K. and Buske, C. (2012) **Beyond Hox: the role of ParaHox genes in normal and malignant hematopoiesis.** *Blood.*, **120**, 519-527.
- Rawat, V.P., Thoene, S., Naidu, V.M., Arseni, N., Heilmeyer, B., Metzeler, K., Petropoulos, K., Deshpande, A., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S.K., Spiekermann, K., Hiddemann, W., Feuring-Buske, M. and Buske, C. (2008) **Overexpression of CDX2 perturbs HOX gene expression in murine progenitors depending on its N-terminal domain and is closely correlated with deregulated HOX gene expression in human acute myeloid leukemia.** *Blood.*, **111**, 309-319.
- Reddy, B.S., Sondhi, S.M. and Lown, J.W. (1999) **Synthetic DNA minor groove-binding drugs.** *Pharmacol. Ther.*, **84**, 1-111.
- Reddy, E.S., Rao, V.N. and Papas, T.S. (1987) **The erg gene: a human gene related to the ets oncogene.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 6131-6135.

- Rivera, R.R., Stuver, M.H., Steenbergen, R. and Murre, C. (1993) **Ets proteins: new factors that regulate immunoglobulin heavy-chain gene expression.** *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7163-7169.
- Romana, S.P., Radford-Weiss, I., Ben Abdelali, R., Schluth, C., Petit, A., Dastugue, N., Talmant, P., Bilhou-Nabera, C., Mugneret, F., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.J., Andrieu, J., Lai, J.L., Terre, C., Rack, K., Cornillet-Lefebvre, P., Luquet, I., Nadal, N., Nguyen-Khac, F., Perot, C., Van den Akker, J., Fert-Ferrer, S., Cabrol, C., Charrin, C., Tigaud, I., Poirel, H., Vekemans, M., Bernard, O.A. and Berger, R.; Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. (2006) **NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies: a study of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique.** *Leukemia.*, **20**, 696-706.
- Rosenberg, B., Vancamp, L., and Krigas, T. (1965) **Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode.** *Nature*, **205**, 698-699.
- Rostad, K., Mannelqvist, M., Halvorsen, O.J., Oyan, A.M., Bo T.H., Stordrange, L., Olsen, S., Haukaas, S.A., Lin, B., Hood, L., Jonassen, I., Akslén, L.A. and Kalland, K.H. (2007) **ERG upregulation and related ETS transcription factors in prostate cancer.** *Int. J. Oncol.*, **30**, 19-32.
- Rozovskaia, T., Feinstein, E., Mor, O., Foa, R., Blechman, J., Nakamura, T., Croce, C.M., Cimino, G. and Canaani, E. (2001) **Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality.** *Oncogene.*, **20**, 874-878.
- Rubin, M.A., Maher, C.A. and Chinnaiyan, A.M. (2011) **Common gene rearrangements in prostate cancer.** *J. Clin. Oncol.*, **29**, 3659-3668.
- Rutman, R.J., Cantarow, A. and Paschkis, K.E. (1954) **Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma.** *Cancer Res.*, **14**, 119-123.
- Salek-Ardakani, S., Smooha, G., de Boer, J., Sebire, N.J., Morrow, M., Rainis, L., Lee, S., Williams, O., Izraeli, S., Brady, H.J. (2009) **ERG is a megakaryocytic oncogene.** *Cancer Res.*, **69**, 4665-4673.
- Sauvageau, G., Lansdorp, P.M., Eaves, C.J., Hogge, D.E., Dragowska, W.H., Reid, D.S., Largman, C., Lawrence, H.J. and Humphries, R.K. (1994) **Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 12223-12227.
- Scheble, V.J., Braun, M., Beroukhim, R., Mermel, C.H., Ruiz, C., Wilbertz, T., Stiedl, A.C., Petersen, K., Reischl, M., Kuefer, R., Schilling, D., Fend, F., Kristiansen, G., Meyerson, M., Rubin, M.A., Bubendorf, L. and Perner, S. (2010) **ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor.** *Mod. Pathol.*, **23**, 1061-1067.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B. and Kuriyan, J. (2000) **Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase.** *Science.*, **289**, 1938-1942.
- Schröder, F., Crawford, E.D., Axcróna, K., Payne, H. and Keane, T.E. (2012) **Androgen deprivation therapy: past, present and future.** *BJU Int.*, **109**, Suppl 6, 1-12.
- Schwachtgen, J.L., Janel, N., Barek, L., Duterque-Coquillaud, M., Ghysdael, J., Meyer, D. and Kerbiriou-Nabias, D. (1997) **Ets transcription factors bind and transactivate the core promoter of the von Willebrand factor gene.** *Oncogene.*, **15**, 3091-3102.
- Seeman, N.C., Rosenberg, J.M. and Rich, A. (1976) **Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 804-808.
- Shah, C.A., Wang, H., Bei, L., Plataniás, L.C. and Eklund, E.A. (2011) **HoxA10 regulates transcription of the gene encoding transforming growth factor beta2 (TGFbeta2) in myeloid cells.** *J. Biol. Chem.*, **286**, 3161-3176.
- Shah, N. and Sukumar, S. (2010) **The Hox genes and their roles in oncogenesis.** *Nat. Rev. Cancer.*, **10**, 361-371.
- Shaikhibrahim, Z., Lindstrot, A., Ellinger, J., Rogenhofer, S., Buettner, R., Perner, S. and Wernert, N. (2012) **The peripheral zone of the prostate is more prone to tumor development than the transitional zone: is the ETS family the key?** *Mol. Med. Report.*, **5**, 313-316.
- Shangary, S. and Wang, S. (2009) **Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **49**, 223-241.

- Shapiro, T.A. and Englund, P.T. (1990) **Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 950-954.
- Shen, W.F., Chang, C.P., Rozenfeld, S., Sauvageau, G., Humphries, R.K., Lu, M., Lawrence, H.J., Cleary, M.L. and Largman, C. (1996) **Hox homeodomain proteins exhibit selective complex stabilities with Pbx and DNA.** *Nucleic Acids Res.*, **24**, 898-906.
- Shen, W.F., Montgomery, J.C., Rozenfeld, S., Moskow, J.J., Lawrence, H.J., Buchberg, A.M. and Largman, C. (1997) **AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins.** *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6448-6458.
- Shen, W.F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Köm ves, L.G., Lawrence, H.J. and Largman, C. (1999) **HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells.** *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3051-3061.
- Shi, A., Murai, M.J., He, S., Lund, G., Hartley, T., Purohit, T., Reddy, G., Chruszcz, M., Grembecka, J. and Cierpicki, T. (2012) **Structural insights into inhibition of the bivalent menin-MLL interaction by small molecules in leukemia.** *Blood.*, **120**, 4461-4469.
- Shing, D.C., McMullan, D.J., Roberts, P., Smith, K., Chin, S.F., Nicholson, J., Tillman, R.M., Ramani, P., Cullinane, C. and Coleman N. (2003) **FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors.** *Cancer Res.*, **63**, 4568-4576.
- Skipper, H.E., Thomson, J.R., Elion, G.B., and Hitchings, G. (1954) **Observations on the anticancer activity of 6-mercaptopurine.** *Cancer Res.*, **14**, 294-298.
- Slupsky, C.M., Gentile, L.N., Donaldson, L.W., Mackereth, C.D., Seidel, J.J., Graves, B.J. and McIntosh, L.P. (1998) **Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 12129-12134.
- Smith, R., Owen, L.A., Trem, D.J., Wong, J.S., Whangbo, J.S., Golub, T.R. and Lessnick, S.L. (2006) **Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma.** *Cancer Cell.*, **9**, 405-416.
- Sobulo, O.M., Borrow, J., Tomek, R., Reshmi, S., Harden, A., Schlegelberger, B., Housman, D., Doggett, N.A., Rowley, J.D. and Zeleznik-Le, N.J. (1997) **MLL is fused to CBP, a histone acetyltransferase, in therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;16)(q23;p13.3).** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 8732-8737.
- Soeiro, M.N., De Souza, E.M., Stephens, C.E. and Boykin, D.W. (2005) **Aromatic diamidines as antiparasitic agents.** *Expert Opin. Investig. Drugs*, **14**, 957-972.
- Soller, M.J., Isaksson, M., Elfving, P., Soller, W., Lundgren, R. and Panagopoulos, I. (2006) **Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer.** *Genes Chromosomes Cancer.*, **45**, 717-719.
- Sorensen, P.H., Lessnick, S.L., Lopez-Terrada, D., Liu, X.F., Triche, T.J. and Denny, C.T. (1994) **A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG.** *Nat. Genet.*, **6**, 146-151.
- Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.M., Regnault, A., García-Peydró, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.L. and Sigaux, F. (2005) **HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL).** *Blood.*, **106**, 274-286.
- Souza, W. (2008) **Electron microscopy of trypanosomes: a historical view.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **103**, 313-325.
- Speleman, F., Cauwelier, B., Dastugue, N., Cools, J., Verhasselt, B., Poppe, B., Van Roy, N., Vandesompele, J., Graux, C., Uyttebroeck, A., Boogaerts, M., De Moerloose, B., Benoit, Y., Selleslag, D., Billiet, J., Robert, A., Huguet, F., Vandenbergh, P., De Paepe, A., Marynen, P. and Hagemeijer, A. (2005) **A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias.** *Leukemia.*, **19**, 358-366.
- Sperone, A., Dryden, N.H., Birdsey, G.M., Madden, L., Johns, M., Evans, P.C., Mason, J.C., Haskard, D.O., Boyle, J.J., Paleolog, E.M. and Randi, A.M. (2011) **The transcription factor Erg inhibits vascular inflammation by repressing NF-kappaB activation and proinflammatory gene expression in endothelial cells.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31**, 142-150.
- Stankiewicz, M.J. and Crispino, J.D. (2009) **ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells.** *Blood.*, **113**, 3337-3347.



- Storti, P., Donofrio, G., Colla, S., Airoidi, I., Bolzoni, M., Agnelli, L., Abeltino, M., Todoerti, K., Lazzaretti, M., Mancini, C., Ribatti, D., Bonomini, S., Franceschi, V., Pistoia, V., Lisignoli, G., Pedrazzini, A., Cavicchi, O., Neri, A., Rizzoli, V. and Giuliani, N. (2011) **HOXB7 expression by myeloma cells regulates their pro-angiogenic properties in multiple myeloma patients.** *Leukemia.*, **25**, 527-537.
- Strebhardt, K. and Ullrich, A. (2008) **Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress.** *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 473-480.
- Strissel, P.L., Strick, R., Rowley, J.D. and Zeleznik-Le, N.J. (1998) **An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region.** *Blood*, **92**, 3793-3803.
- Sturk, L.M., Brock, J.L., Bagnell, C.R., Hall, J.E. and Tidwell, R.R. (2004) **Distribution and quantitation of the anti-trypanosomal diamidine 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan (DB75) and its N-methoxy prodrug DB289 in murine brain tissue.** *Acta Trop.*, **91**, 131-143.
- Sun, C., Dobi, A., Mohamed, A., Li, H., Thangapazham, R.L., Furusato, B., Shaheduzzaman, S., Tan, S.H., Vaidyanathan, G., Whitman, E., Hawksworth, D.J., Chen, Y., Nau, M., Patel, V., Vahey, M., Gutkind, J.S., Sreenath, T., Petrovics, G., Sesterhenn, I.A., McLeod, D.G. and Srivastava S. (2008) **TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation.** *Oncogene.*, **27**, 5348-5353.
- Szymczynska, B.R. and Arrowsmith, C.H. (2000) **DNA binding specificity studies of four ETS proteins support an indirect read-out mechanism of protein-DNA recognition.** *J. Biol. Chem.*, **275**, 28363-28370.
- Takahashi, Y., Hamada, J., Murakawa, K., Takada, M., Tada, M., Nogami, I., Hayashi, N., Nakamori, S., Monden, M., Miyamoto, M., Katoh, H. and Moriuchi T. (2004) **Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system.** *Exp. Cell. Res.*, **293**, 144-153.
- Takaku, M., Kainuma, T., Ishida-Takaku, T., Ishigami, S., Suzuki, H., Tashiro, S., van Soest, R.W., Nakao, Y. and Kurumizaka, H. (2011) **Halenaquinone, a chemical compound that specifically inhibits the secondary DNA binding of RAD51.** *Genes Cells.*, **16**, 427-436.
- Takebayashi, Y., Pourquier, P., Zimonjic, D.B., Nakayama, K., Emmert, S., Ueda, T., Urasaki, Y., Kanzaki, A., Akiyama, S.I., Popescu, N., Kraemer, K.H. and Pommier, Y. (2001) **Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair.** *Nat. Med.*, **7**, 961-966.
- Takeda, A., Goolsby, C. and Yaseen, N.R. (2006) **NUP98-HOXA9 induces long-terms proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells.** *Cancer Res.*, **66**, 6628-6637.
- Tallman, M.S., Gilliland, D.G. and Rowe, J.M. **Drug therapy for acute myeloid leukemia.** *Blood.*, **106**, 1154-1163.
- Tanius, F.A., Hamelberg, D., Bailly, C., Czarny, A., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2004) **DNA Sequence Dependent Monomer-Dimer Binding Modulation of Asymmetric Benzimidazole Derivatives.** *J. AM. CHEM. SOC.*, **126**, 143-153.
- Tanius, F.A., Wilson, W.D., Wang, L., Kumar, A., Boykin, D.W., Marty, C., Baldeyrou, B. and Bailly, C. (2003) **Cooperative dimerization of a heterocyclic diamidine determines sequence-specific DNA recognition.** *Biochemistry*, **42**, 13576-13586.
- Taoudi, S., Bee, T., Hilton, A., Knezevic, K., Scott, J., Willson, T.A., Collin, C., Thomas, T., Voss, A.K., Kile, B.T., Alexander, W.S., Pimanda, J.E. and Hilton, D.J. (2011) **ERG dependence distinguishes developmental control of hematopoietic stem cell maintenance from hematopoietic specification.** *Genes Dev.*, **25**, 251-262.
- Taylor, H.S., Vanden Heuvel, G.B. and Igarashi, P. (1997) **A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes.** *Biol. Reprod.*, **57**, 1338-1345.
- Teitell, M.A. and Pandolfi, P.P. (2009) **Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia.** *Annu. Rev. Pathol.*, **4**, 175-198.
- Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M. and Ehninger, G. (2006) **Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML).** *Blood.*, **107**, 4011-4020.

- Thiollier, C., Lopez, C.K., Gerby, B., Ignacimoutou, C., Poglio, S., Duffourd, Y., Guégan, J., Rivera-Munoz, P., Bluteau, O., Mabialah, V., Diop, M., Wen, Q., Petit, A., Bauchet, A.L., Reinhardt, D., Bornhauser, B., Gautheret, D., Lecluse, Y., Landman-Parker, J., Radford, I., Vainchenker, W., Dastugue, N., de Botton, S., Dessen, P., Bourquin, J.P., Crispino, J.D., Ballerini, P., Bernard, O.A., Pflumio, F. and Mercher, T. (2012) **Characterization of novel genomic alterations and therapeutic approaches using acute megakaryoblastic leukemia xenograft models.** *J. Exp. Med.*, **209**, 2017-2031.
- Thoms, J.A., Birger, Y., Foster, S., Knezevic, K., Kirschenbaum, Y., Chandrakanthan, V., Jonquieres, G., Spensberger, D., Wong, J.W., Oram, S.H., Kinston, S.J., Groner, Y., Lock, R., MacKenzie, K.L., Göttgens, B., Izraeli, S. and Pimanda, J.E. (2011) **ERG promotes T-acute lymphoblastic leukemia and is transcriptionally regulated in leukemic cells by a stem cell enhancer.** *Blood.*, **117**, 7079-7089.
- Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H.J., Humphries, K. and Sauvageau, G. (2002) **Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion.** *Blood.*, **99**, 121-129.
- Thuita, J.K., Wang, M.Z., Kagira, J.M., Denton, C.L., Paine, M.F., Mdachi, R.E., Murilla, G.A., Ching, S., Boykin, D.W., Tidwell, R.R., Hall, J.E. and Brun, R. (2012) **Pharmacology of DB844, an orally active aza analogue of pafuramidine, in a monkey model of second stage human African trypanosomiasis.** *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **6**, e1734.
- Tomlins, S.A., Laxman, B., Varambally, S., Cao, X., Yu, J., Helgeson, B.E., Cao, Q., Prensner, J.R., Rubin, M.A., Shah, R.B., Mehra, R. and Chinnaiyan, A.M. (2008) **Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer.** *Neoplasia.*, **10**, 177-88.
- Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J.E., Shah, R.B., Pienta, K.J., Rubin, M.A. and Chinnaiyan, A.M. (2005) **Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer.** *Science.*, **310**, 644-648.
- Tootle, T.L. and Rebay, I. (2005) **Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily.** *Bioessays.*, **27**, 285-298.
- Trivedi, C.M., Patel, R.C. and Patel, C.V. (2008) **Differential regulation of HOXA9 expression by nuclear factor kappa B (NF-kappaB) and HOXA9.** *Gene*, **408**, 187-195.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N. and Liu, E.A. (2004) **In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2.** *Science.*, **303**, 844-848.
- Vijapurkar, U., Fischbach, N., Shen, W., Brandts, C., Stokoe, D., Lawrence, H.J. and Largman, C. (2004) **Protein kinase C-mediated phosphorylation of the leukemia-associated HOXA9 protein impairs its DNA binding ability and induces myeloid differentiation.** *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 3827-3837.
- Vijapurkar, U., Fischbach, N., Shen, W., Brandts, C., Stokoe, D., Lawrence, H.J. and Largman, C. (2004) **Protein kinase C-mediated phosphorylation of the leukemia-associated HOXA9 protein impairs its DNA binding ability and induces myeloid differentiation.** *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 3827-3837.
- Vijayaraj, P., Le Bras, A., Mitchell, N., Kondo, M., Juliaio, S., Wasserman, M., Beeler, D., Spokes, K., Aird, W.C., Baldwin, H.S. and Oettgen, P. (2012) **Erg is a crucial regulator of endocardial-mesenchymal transformation during cardiac valve morphogenesis.** *Development.*, **139**, 3973-3985.
- Vlaeminck-Guillem, V., Carrere, S., Dewitte, F., Stehelin, D., Desbiens, X. and Duterque-Coquillaud, M. (2000) **The Ets family member Erg gene is expressed in mesodermal tissues and neural crests at fundamental steps during mouse embryogenesis.** *Mech. Dev.*, **91**, 331-335.
- Walasek, M.A., van Os, R. and de Haan, G. (2012) **Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1266**, 138-150.
- Wall, M.E. and Wani, M.C. (1995) **Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture.** *Cancer Res.*, **55**, 753-760.
- Wang, G.G., Cai, L., Pasillas, M.P. and Kamps, M.P. (2007) **NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis.** *Nat. Cell. Biol.*, **9**, 804-812.
- Wang, G.G., Song, J., Wang, Z., Dormann, H.L., Casadio, F., Li, H., Luo, J.L., Patel, D.J. and Allis, C.D. (2009) **Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger.** *Nature.*, **459**, 847-851.

- Wang, H., Lu, Y., Huang, W., Papoutsakis, E.T., Fuhrken, P. and Eklund, E.A. (2007) **HoxA10 activates transcription of the gene encoding mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 (Mkp2) in myeloid cells.** *J. Biol. Chem.*, **282**, 16164-16176.
- Wang, J., Muntean, A.G. and Hess, J.L. (2012) **ECSASB2 mediates MLL degradation during hematopoietic differentiation.** *Blood.*, **119**, 1151-1161.
- Wang, J.C. (2002) **Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective.** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 430-440.
- Wang, K.C., Yang, Y.W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B.R., Protacio, A., Flynn, R.A., Gupta, R.A., Wysocka, J., Lei, M., Dekker, J., Helms, J.A. and Chang, H.Y. (2011) **A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression.** *Nature*, **472**, 120-124.
- Wang, L., Bailly, C., Kumar, A., Ding, D., Bajic, M., Boykin, D.W. and Wilson, W.D. (2000) **Specific molecular recognition of mixed nucleic acid sequences: an aromatic dication that binds in the DNA minor groove as a dimer.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 12-16.
- Wang, N., Kim, H.G., Cotta, C.V., Wan, M., Tang, Y., Klug, C.A. and Cao, X. (2006) **TGFbeta/BMP inhibits the bone marrow transformation capability of Hoxa9 by repressing its DNA-binding ability.** *EMBO J.*, **25**, 1469-1480.
- Wang, W.L., Patel, N.R., Caragea, M., Hogendoorn, P.C., López-Terrada, D., Hornick, J.L. and Lazar, A.J. (2012) **Expression of ERG, an Ets family transcription factor, identifies ERG-rearranged Ewing sarcoma.** *Mod. Pathol.*, **25**, 1378-1383.
- Wang, Y., Yabuuchi, A., McKinney-Freeman, S., Ducharme, D.M., Ray, M.K., Chawengsaksophak, K., Archer, T.K. and Daley, G.Q. (2008) **Cdx gene deficiency compromises embryonic hematopoiesis in the mouse.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 7756-7761.
- Warner, J.K., Wang, J.C., Takenaka, K., Doulatov, S., McKenzie, J.L., Harrington, L. and Dick, J.E. (2005) **Direct evidence for cooperating genetic events in the leukemic transformation of normal human hematopoietic cells.** *Leukemia.*, **19**, 1794-1805.
- Watson, D.K., McWilliams, M.J., Lapis, P., Lautenberger, J.A., Schweinfest, C.W. and Papas, T.S. (1988) **Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 7862-7866.
- Watson, D.K., Smyth, F.E., Thompson, D.M., Cheng, J.Q., Testa, J.R., Papas, T.S. and Seth, A. (1992) **The ERGB/Fli-1 gene: isolation and characterization of a new member of the family of human ETS transcription factors.** *Cell Growth Differ.*, **3**, 705-713.
- Wei, D., Wilson, W.D. and Neidle, S. (2013) **Small-molecule Binding to the DNA Minor Groove Is Mediated by a Conserved Water Cluster.** *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 1369-1377.
- Wei, G.H., Badis, G., Berger, M.F., Kivioja, T., Palin, K., Enge, M., Bonke, M., Jolma, A., Varjosalo, M., Gehrke, A.R., Yan, J., Talukder, S., Turunen, M., Taipale, M., Stunnenberg, H.G., Ukkonen, E., Hughes, T.R., Bulyk, M.L. and Taipale, J. (2010) **Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo.** *EMBO J.*, **29**, 2147-2160.
- Wellik, D.M. and Capecchi, M.R. (2003) **Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton.** *Science.*, **301**, 363-367.
- Wemmer, D.E. and Dervan, P.B. (1997) **Targeting the minor groove of DNA.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 355-361.
- Wenzler, T., Boykin, D.W., Ismail, M.A., Hall, J.E., Tidwell, R.R. and Brun, R. (2009) **New treatment option for second-stage African sleeping sickness: in vitro and in vivo efficacy of aza analogs of DB289.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 4185-4192.
- Whitmarsh, R.J., Saginario, C., Zhuo, Y., Hilgenfeld, E., Rappaport, E.F., Megonigal, M.D., Carroll, M., Liu, M., Osheroff, N., Cheung, N.K., Slater, D.J., Ried, T., Knutsen, T., Blair, I.A. and Felix, C.A. (2003) **Reciprocal DNA topoisomerase II cleavage events at 5'-TATTA-3' sequences in MLL and AF-9 create homologous single-stranded overhangs that anneal to form der(11) and der(9) genomic breakpoint junctions in treatment-related AML without further processing.** *Oncogene.*, **22**, 8448-8459.

- Willmott, C.J., Critchlow, S.E., Eperon, I.C. and Maxwell, A. (1994) **The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase.** *J. Mol. Biol.*, **242**, 351-363.
- Wilson, D.S. and Desplan, C. (1999) **Structural basis of Hox specificity.** *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 297-300.
- Wilson, W.D., Tanious, F.A., Mathis, A., Tevis, D., Hall, J.E. and Boykin, D.W. (2008) **Antiparasitic compounds that target DNA.** *Biochimie*, **90**, 999-1014.
- Witte, J.S. (2009) **Prostate cancer genomics: towards a new understanding.** *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 77-82.
- Wong, K.F., So, C.C. and Kwong, Y.L. (1999) **Chronic myelomonocytic leukemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98/HOXA9 fusion.** *Cancer Genet. Cytogenet.*, **115**, 70-72.
- Wong, P., Iwasaki, M., Somervaille, T.C., So, C.W. and Cleary, M.L. (2007) **Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential.** *Genes Dev.*, **21**, 2762-2774.
- Woźniak, K. and Błasiak, J. (2002) **Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts.** *Acta. Biochim. Pol.*, **49**, 583-596.
- Wu, C.C., Li, T.K., Farh, L., Lin, L.Y., Lin, T.S., Yu, Y.J., Yen, T.J., Chiang, C.W. and Chan, N.L. (2011) **Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide.** *Science*, **333**, 459-462.
- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.T., Liu, L.X., Jiang, W.Q., Liu, J., Zhang, J.Y., Wang, B., Frye, S., Zhang, Y., Xu, Y.H., Lei, Q.Y., Guan, K.L., Zhao, S.M. and Xiong, Y. (2011) **Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases.** *Cancer Cell*, **19**, 17-30.
- Yamatoji, M., Kasamatsu, A., Yamano, Y., Sakuma, K., Ogoshi, K., Iyoda, M., Shinozuka, K., Ogawara, K., Takiguchi, Y., Shiiba, M., Tanzawa, H. and Uzawa, K. (2010) **State of homeobox A10 expression as a putative prognostic marker for oral squamous cell carcinoma.** *Oncol. Rep.*, **23**, 61-67.
- Ye, B.H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D.M., Offit, K., Chaganti, R.S.K. and Dalla-Favera, R. (1993) **Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma.** *Science*, **262**, 747-750.
- Yekta, S., Tabin, C.J. and Bartel, D.P. (2009) **MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence.** *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 789-796.
- Yoshida, M., Banville, D.L. and Shafer, R.H. (1990) **Structural analysis of d(GCAATTGC)<sub>2</sub> and its complex with berenil by nuclear magnetic resonance spectroscopy.** *Biochemistry*, **29**, 6585-6592.
- Yu, J., Yu, J., Mani, R.S., Cao, Q., Brenner, C.J., Cao, X., Wang, X., Wu, L., Li, J., Hu, M., Gong, Y., Cheng, H., Laxman, B., Vellaichamy, A., Shankar, S., Li, Y., Dhanasekaran, S.M., Morey, R., Barrette, T., Lonigro, R.J., Tomlins, S.A., Varambally, S., Qin, Z.S. and Chinnaiyan, A.M. (2010) **An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression.** *Cancer Cell*, **17**, 443-454.
- Yuan, L., Le Bras, A., Sacharidou, A., Itagaki, K., Zhan, Y., Kondo, M., Carman, C.V., Davis, G.E., Aird, W.C. and Oettgen, P. (2012) **ETS-related gene (ERG) controls endothelial cell permeability via transcriptional regulation of the claudin 5 (CLDN5) gene.** *J. Biol. Chem.*, **287**, 6582-6591.
- Yuan, L., Nikolova-Krstevski, V., Zhan, Y., Kondo, M., Bhasin, M., Varghese, L., Yano, K., Carman, C.V., Aird, W.C. and Oettgen, P. (2009) **Antiinflammatory effects of the ETS factor ERG in endothelial cells are mediated through transcriptional repression of the interleukin-8 gene.** *Circ. Res.*, **104**, 1049-1057.
- Yuan, L., Sacharidou, A., Stratman, A.N., Le Bras, A., Zwiers, P.J., Spokes, K., Bhasin, M., Shih, S.C., Nagy, J.A., Molema, G., Aird, W.C., Davis, G.E. and Oettgen, P. (2011) **RhoJ is an endothelial cell-restricted Rho GTPase that mediates vascular morphogenesis and is regulated by the transcription factor ERG.** *Blood*, **118**, 1145-1153.
- Yung, E., Sekulovic, S., Argiropoulos, B., Lai, C.K., Leung, M., Berg, T., Vollett, S., Chang, V.C., Wan, A., Wong, S. and Humphries, R.K. (2011) **Delineating domains and functions of NUP98 contributing to the leukemogenic activity of NUP98-HOX fusions.** *Leuk. Res.*, **35**, 545-550.
- Zhang, Y., Morrone, G., Zhang, J., Chen, X., Lu, X., Ma, L., Moore, M. and Zhou, P. (2003) **CUL-4A stimulates ubiquitylation and degradation of the HOXA9 homeodomain protein.** *EMBO J.*, **22**, 6057-6067.

- Zhang, Y., Sicot, G., Cui, X., Vogel, M., Wuertzer, C.A., Lezon-Geyda, K., Wheeler, J., Harki, D.A., Muzikar, K.A., Stolper, D.A., Dervan, P.B. and Perkins, A.S. (2011) **Targeting a DNA binding motif of the EVI1 protein by a pyrrole-imidazole polyamide.** *Biochemistry.*, **50**, 10431-10441.
- Zhou, L., Lee, K., Thakker, D.R., Boykin, D.W., Tidwell, R.R. and Hall, J.E. (2002) **Enhanced permeability of the antimicrobial agent 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan across Caco-2 cell monolayers via its methylamidoidme prodrug.** *Pharm. Res.*, **19**, 1689-1695.
- Zhu, J., Zhou, J., Peres, L., Riaucoux, F., Honoré, N., Kogan, S. and de Thé, H. (2005) **A sumoylation site in PML/RARA is essential for leukemic transformation.** *Cancer Cell.*, **7**, 143-153.
- Zong, Y., Xin, L., Goldstein, A.S., Lawson, D.A., Teitell, M.A. and Witte, O.N. (2009) **ETS family transcription factors collaborate with alternative signaling pathways to induce carcinoma from adult murine prostate cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 12465-12470.

# VI. ANNEXES

Perin N., Kleiner I.M., **Nhili R.**, Laine W., David-Cordonnier M.-H., Vugrek O., Karminski-Zamola G., Kralj M., Hranjec M. **Synthesis, antiproliferative activity and DNA binding studies of novel biologically active benzimidazo[1,2-a]quinolines bearing different amino side chains.**  
*Soumis à Eur. J. Med. Chem.*

Racané L., Kraljević Pavelić S., **Nhili R.**, Depauw S., Constant C.-P., Ratkaj I., David-Cordonnier M.-H., Pavelić K., Tralić-Kulenović V., Karminski-Zamola G. (2013) **New anticancer active phenylene-bisbenzothiazoles: Synthesis, Antiproliferative Evaluation and DNA binding.** *Eur. J. Med. Chem.*, **63**, 882-891.



Genès C., Lenglet G., Depauw S., Nhili R., Prado S, David-Cordonnier M.-H., Michel S., Tillequin F., Porée F.-H. (2011) **Synthesis and Biological Evaluation of N-substituted benzo[c]phenanthrolines and benzo[c]phenanthrolinones as antiproliferative agents.** *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 2117-2131.

Racane L., Tralić-Kulenović V., Kraljević-Pavelić S, Peixoto P., **Nhili R.**, Depauw S., Hildebrand M.-P., David-Cordonnier M.-H., Pavelić K., Karminski-Zamola G. (2010) **Novel diamidino-substituted derivatives of phenyl-benzothiazolyl- and dibenzothiazolyl-furans and thiophenes: Synthesis, antiproliferative and DNA binding properties.** *J. Med. Chem.*, **53**, 2418-2432.